

POLIMORFISMUL RAPD-PCR LA PLANTELE DE *CUCUMIS SATIVUS L.*

Duca Maria, Port Angela, Homenco Tatiana

Universitatea de Stat din Moldova

Introducere

Identificarea polimorfismului genetic în scopul aprecierii diversității genetice, selectării formelor parentale și a caracterelor calitative și cantitative prezintă o importanță deosebită în procesul de obținere a hibrizilor înalt productivi. Polimorfismul poate fi identifi cat la diverse nivele de organizare prin analiza caracterelor morfo fiziologice [4, 18, 19], biochimice [11, 12], citogenetice [5, 6, 9], moleculare [7, 10, 12, 13] etc. În aspect fundamental, cercetarea variabilității caracterelor ce determină polimorfismul poate contribui la identificarea markerilor genotipici utilizați în analiza genetică și filogenetică [16, 17]. În aspect practic, analiza polimorfismului genetic este primordială pentru rezolvarea problemelor de conservare a biodiversității [10, 15], ameliorarea la heterozis asistată de markeri moleculari [11, 13, 15], etc.

Fenomenul de heterozis este larg răspândit în natură și rămâne a fi în continuare una dintre cele mai actuale probleme ale geneticii și ameliorării contemporane. Succesul selecției la heterozis este determinat de identificarea și studierea însușirilor valoroase, inclusiv analiza polimorfismului și evidențierea caracterelor complexe [1, 2, 8, 11].

Scopul lucrării constă în relevarea unor particularități genetice specifice prin analiza polimorfismului RAPD-PCR la diverse genotipuri de castraveți - linii, soiuri și hibrizi F_1 cu diferită productivitate și corelarea acestora cu vigoarea hibridă și efectul de heterozis.

Material și metode

Investigațiile au fost efectuate pe parcursul anilor 2003-2007 în cadrul laboratorului Securitate biologică al catedrei Biologie Vegetală, USM. Materialul de cercetare - șase hibrizi de castraveți (*Cucumis sativus L.*) și formele parentale ale acestora a fost oferit de Institutul de legumicultură și irigație din Tiraspol (tab.1.). Experiențele s-au efectuat în trei repetări biologice și au inclus genotipuri care formează o schemă dialelă incompletă.

Tab.1. Liniile parentale și hibrizii de castraveți utilizați în cercetare.

Forma parentală	Hibrizi cu productivitate înaltă		Varianta martor		Hibrizi cu productivitate joasă	
	H 273	H 274	Vzglead	Epilog	H 6	H 7
♀	L 222	L 203	L 371	L 371	L 222	L 222
♂	L 203	L 316	Beregovoi	Favorit	Beregovoi	Favorit

ADN-ul a fost izolat cu DNAzol (GIBCO BRL) și cuantificat spectrofotometric [3]. Mediul de reacție PCR (25μl) a inclus: 50 ng ADN, dNTP 200μM de fiecare tip, primer 1 μM, 1,25 unități/pe reacție GoTaq ADN-polimeraza (Promega), MgCl₂ 2,5 mM. Programul de amplificare: 95°C - 3 min urmat de 45 cicluri: 95°C - 1 min., 36°C - 1

min., 72°C – 2 min. și 72°C – 5 min. Ampliconii s-au analizat prin electroforeză în gel de agaroză 1,6%, bromură de etidiu 0,5 μg/ml și au fost notați conform primerului asociat cu dimensiunea ampliconului, de ex.: P36₈₀₀ – amplicon de 800 pb obținut în reacția PCR cu P36. Au fost utilizați opt primeri: P28 (GACCGCTTGT), P36 (CCGAATTTCGC), P37 (CTGACCAGCC), P43 (AGTCAGCTGC), P44 (GGACCCCGCC), P46 (GGTTGGGGAG), P48 (GCGGTGCTCG), P49 (GACAGCCTA).

Rezultate

Relevarea organizării genetice a organismului în baza analizei ADN-ului ca unitate structurală a genei, evitând încrucișarea și acțiuni îndelungate de testări în câmp, rămâne a fi una dintre direcțiile de perspectivă în ameliorarea plantelor. Aceste argumente au motivat o serie de analize RAPD-PCR cu utilizarea a opt primeri arbitrari.

Toți primerii testați au participat la amplificarea, rezultând un număr variabil de ampliconi. Primerii P43, P46, P48, P49 au generat profile cu câte 1- 4 benzi comune pentru toate genotipurile homo- și heterozigote studiate: P43₄₇₀; P46₅₀₀; P46₂₉₀; P46₁₈₀; P48₄₈₀; P48₂₉₀; P48₁₅₀; P49₉₂₀; P49₈₀₀; P49₇₅₀; P49₆₀₀ (g. 1. A; B; C; D), rezultate care ne-au determinat să le excludem din analizele ulterioare.

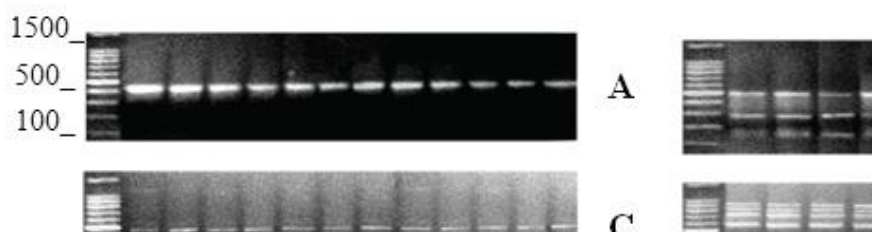


Fig. 1. Profilul ampliconilor RAPD obținuți cu primerii: P43 (A), P46 (B), P48 (C), P49 (D).

M-martor; 1- ♂L216; 2- H 274; 3- ♀/♂L203; 4-♀L 222; 5- ♂ Beregovoi; 6- Vzglead; 7- ♀L 371; 8- Epilog; 9- ♂Favorit; 10 -♀ L22; 11- H 6; 12- H 7.

Analiza polimorfismului genetic la hibridii cu productivitate înaltă. PCR -RAPD obținut cu P28, P36, P37 și P44 a pus în evidență spectre electroforetice heterogene atât după dimensiunea ampliconilor, cât și după intensitatea fluorescenței, sugerând cantități diferite ale produsului de amplificare.

Astfel, profilul hibridilor experimentali cu productivitate înaltă obținut cu *primerul P28* a prezentat 12 ampliconi cu dimensiuni de la 130 pînă la 830 pb (fig. 2). Genotipurile formelor parentale ale hibridilor H 274 și H 273 conțin trei ampliconi comuni: P28₄₈₀, P28₅₀₀ și P28₆₀₀, ultimii doi variind după intensitatea fluorescenței în funcție de genotip. Restul 9 produse de amplificare cu acest primer au prezentat un polimorfism estimat prin prezență/absență și inclusiv - luminozitate. Liniile, homozigote paternă și maternă, ale hibridului H 274 s-au caracterizat prin două (P28₁₃₀; P28₂₇₀) și respectiv una (P28₃₀₀) benzi polimorfe, toate trei fiind cu fluorescență slabă. Linia paternă a hibridului 273 este similară liniei materne a hibridului H 274 (L 203). Cealaltă linie parentală a acestui hibrid – L 222, conține două benzi polimorfe dintre care una similară după dimensiune cu linia paternă a hibridului H 274 (P28₂₇₀) și una cu greutate moleculară medie de 700 pb (g. 2).

Hibrizii H 274 și H 273 conțin șase și respectiv 4 locusuri polimorfe. Studiul polimorfismului molecular prin intermediul secvențelor de ADN amplificate arbitrar cu *primerul P36* a relevat prezența a 7 fragmente cu lungimea de 450-950 pb (fig. 2).

Diversitatea genetică în cadrul hibridilor omologați și formelor parentale.

Analiza RAPD a hibridului H 274 și a formelor parentale a constatat șase benzi cu masa moleculară cuprinsă între 550-850 pb. Similar primerului analizat – P28, trei ampliconi cu aceeași greutate moleculară, însă diferiți după conținut au fost comuni pentru formele homo- și heterozigote. Forma parentală 203 comună ambelor combinații de încrucișare nu conține ampliconi specifici. Celelalte două forme parentale ale hibridurilor analizate se deosebesc între ele atât prin numărul benzilor polimorfe, cât și după intensitatea fluorescenței. Linia paternă a hibridului H 274 conține două benzi polimorfe P36₈₀₀ și P36₉₀₀, iar cea maternă a hibridului H 273 o singură fracție – P36₉₀₀.

Primerul 37 a generat profile cu șase secvențe polinucleotidice dintre care două comune pentru toate genotipurile studiate: P37₂₈₀ și P37₁₃₀₀. Acești ampliconi se deosebesc între ei după conținut. P37₂₈₀ s-a remarcat printr-o fluorescență mai intensă comparativ cu ampliconul cu greutate moleculară mare - P37₁₃₀₀. Majoritatea benzilor polimorfe au fost de o intensitate medie a luminozității (fig. 2). Linia 203 s-a evidențiat printr-o singură bandă polimorfă (P37₄₈₀) care este moștenită și de hibridul H 274. Linia paternă a acestui hibrid conține doi ampliconi specifici P37₅₆₀ și P37₉₀₀ care de asemenea sunt regăsiți în profilul genotipului heterozigot. H 274 se deosebește de ambele linii parentale prin prezența produsului de amplificare P37₆₀₀. Electroforegramele hibridului 273 și formelor parentale au pus în evidență cinci benzi cu masa moleculară cuprinsă între 280-1300 pb. Forma maternă se deosebește de cea paternă prin prezența a două benzi polimorfe cu greutate moleculară medie: P37₅₆₀ și P37₉₀₀ cu o intensitate slabă a luminozității (fig. 2).

Spectrele electroforetice obținute cu *primerul P44* au prezentat un polimorfism mai pronunțat determinat atât de genotip (homo- sau heterozigot), cât și de modul de asociere în combinații de încrucișare. Acest primer a generat 12 componente polinucleotidice cu dimensiuni de 100 - 1000 pb variabili în conținut (fig.2). Profilele RAPD ale primerului P44 au demonstrat trei produși de amplificare comuni pentru formele parentale și hibrizii de prima generație - P44₁₀₀, P44₂₅₀ și P44₆₅₀. Linia paternă are două benzi polimorfe cu dimensiunea de 200 și 500 pb. Linia maternă este mai heterogenă, prezentând patru benzi polimorfe dintre care banda de 330 pb în lungime este specifică, lipsind la forma paternă și la hibrid. Linia maternă a hibridului H 273 de asemenea conține patru benzi polimorfe, însă nici una dintre ele nu este specifică. Toate secvențele sunt prezente și în genotipul homozigot patern (P44₂₀₀, P44₅₀₀) sau în cel heterozigot (P44₃₈₀, P44₄₀₀).

Analiza comparativă a spectrelor electroforetice a hibridurilor omologați Vzglead și Epilog, inclusiv a formelor parentale ale acestora demonstrează, că produsele de amplificare care a ADN-ului cu *primerul P28* s-au separat în șase și respectiv șapte componente electroforetice, dintre care patru au fost polimorfe. Lungimea fragmentelor de amplificare a fost cuprinsă în limitele 270-730 pb (fig. 3).

P36450 în cazul hibridului H 7 (fig. 4). La nivelul spectrelor obținute cu *primerul P37* s-a constatat prezența a două benzi nespecifice și trei secvențe de ADN polimorfe de 480 pb, 560 și 900 pb (fig.4). Analiza hibridilor H 6 și H 7 reprezintă similaritate la nivel tuturor produselor de amplificare, insumând ampliconii de la formele parentale. Proiectul RAPD generat de *primerul 44* a demonstrat aceeași heterogenitate comparativ cu ceilalți primeri, observată la analiza hibridilor cu productivitate înaltă (fig. 4).

Generalizând rezultatele obținute putem constata, că nivelul polimorfismului diferă de la un genotip la altul, cel mai înalt grad al diversității genetice a fost înregistrat la hibridii cu un heterozis superior, iar cel mai mic la hibridii cu productivitate scăzută în special la H 7. Tabloul general al analizei RAPD (tab. 2) a evidențiat un număr mai mic și aproape constant (în aproximativ 50% din cazuri) de benzi la linia maternă în comparație cea paternă și în special în raport cu F_1 . Cea mai mare heterogenitate s-a constatat la hibridii de prima generație, unde numărul de benzi a variat între 5 și 9 produse de amplificare. Mai informativi au fost primerii P28 și P44.

Tabloul 2. Numărul benzilor generate de primeri analizați prin RAPD-PCR.

Genotip	Primeri	Hibridi cu:					
		efect de heterozis superior		productivitate înaltă, omologați		productivitate scăzută	
		H 274	H 273	Vzglead	Epilog	H6	H7
F_1	P28	9	7	6	6	6	5
	P36	5	5	4	5	4	5
	P37	6	5	5	5	5	5
	P44	7	8	7	5	7	5
♂	P28	5	4	4	5	4	5
	P36	5	3	3	4	3	4
	P37	4	3	3	5	3	4
	P44	5	7	5	5	5	5
♀	P28	4	5	3	3	5	5
	P36	3	4	4	4	4	4
	P37	3	4	3	3	4	4
	P44	7	7	7	7	7	7

Concluzii

Analiza spectrelor electroforetice ale ampliconilor RAPD-PCR la 12 genotipuri de castraveți cu opt primeri arbitrari a permis să constatăm o heterogenitate înaltă a materialului ameliorativ, care reflectă structura genotipică a liniilor și hibridilor incluși în cercetare.

Patru primeri au pus în evidență 1-4 ampliconi identici pentru toate genotipurile, iar alți patru au evidențiat un înalt grad de polimorfism. Cel mai înalt grad al diversității genetice a fost relevat la H 273, iar cel mai mic la H 7. Cel mai înalt polimorfism molecular a fost relevat la analiza RAPD-PCR cu primerii P28 și P44.

Referințe

1. Goral H. Heterosis and Combining Ability in Spring Triticale (x Triticosecale, Wittm.). Plant Breed. Seed Sci., 1999, vol. 43, p. 25-34.
2. Lopez-sese A.I., Staub J.E., Gomez-guillamon M.L. Combining ability analysis of yield components in cucumber. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 2002, vol. 127, p. 931-937.
3. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual, V. II, New-York, 2001.
4. Smith O.S., Smith J.S.C., Bowen S.L., Tenborg R.A., Wall S.J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. Theor. Appl. Genet., 1990, vol. 80, p. 833-840.
5. Staub J.E., Sun Z., Chung S.M., Lower R.L. Evidence for colinearity among genetic linkage maps in cucumber. HortScience, 2007, vol. 42, p. 20-27.
6. Wilde P. Multi-stage selection for combining ability among pollen parent lines in hybrid rye breeding. Vortr. P. anzenzuchtg, 1996, vol. 35, p. 15-25.
7. Witkowicz J., Urbańczyk E., Przybecki Z. AFLP marker polymorphism in cucumber (Cucumis sativus L.) near isogenic lines differing in sex expression. Cellular & Molecular Biology Letters, 2003, vol. 8, Nr. 2, p. 375-381.
8. Гилязетдинов Ш.Я., Зимницкий А.Н. Состав популяции поли (А)-РНК в корнях гетерозисных гибридов кукурузы и их исходных линий. Физ. Раст., 1986, т. 33, вып. 4, с. 769-777.
9. Ермишин А.П., Савчук А.В., Калашникова Н.В. Влияние общей и специфической скрещиваемости родительских форм на эффективность гибридизации дигаплоидов картофеля. Весці АН Беларусі. Сер. Біял. Навук, 1997, № 3, с. 37-40.
10. Кириченко В. Теоретические основы селекции подсолнуха и практическое использование эффекта гетерозиса: Автореф. дис. д-ра с.-г. наук: УААН. Д., 2002, 33с.
11. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. Всесоюз. Акад. С.-х. Наук им В.И. Ленина. М., Колос, 1983, 320с.
12. Конарев В.Г. Биохимия и молекулярная генетика гетерозиса. В кн.: Гетерозис, Минск, 1982, с. 163-177.
13. Костышин С.С. Молекулярно-биологические аспекты «хлоропластного» гетерозиса у кукурузы. Молекулярная генетика и биофизика, 1984, вып. 9, с. 99-104.
14. Наумкина Т. Комбинационная способность сортов и линий гороха по симбиотическим признакам // Вопросы физ., селекции и техн. Возделыв. с.х. культур. Орел: 2001.с. 128-133.
15. Пивоваров В., Балашова Н.Н., Урсул С.В. Гетерозис с.х. растений: развитие теоретических аспектов и практическое применение. Матер. докл., Сообщ. Междунар. симп. Гетерозис с.-х. раст. М., 1997, с. 211.
16. Струнников А. В. Возникновение компенсационного гена: одна из причин гетерозиса. Общ. Биол., 1974, т. 35, № 5, с.666-678.
17. Струнников А.В. Генетические принципы гетерозиса и комбинационные способности. Генетика, 1986, т. 22, № 2, с.229-242.
18. Хотылева Л.В., Титок В.В. Динамика фосфорсодержащих соединений при прорастании семян кукурузы в связи с гетерозисом. Физиология растений, 1994, т. 41, № 1, с. 92-96.
19. Шахбазов В.Г. Гетерозис – явление общебиологическое. М., 1972, 32с.

Cercetarile au fost efectuate cu suportul financiar oferit de Moldavian esearch and Development Association (MRDA) și U.S. Civilian Research & Development Foundation (CRDF) prin grantul MERL-1300`.