

GENETICA, BIOLOGIA MOLECULARĂ ȘI AMELIORAREA

POLIMORFISMUL IMUNOLOGIC ȘI MOLECULAR AL UNOR GENOTIPURI ȘI POPULAȚII PERSPECTIVE DE TOMATE

**Rotaru Ludmila, Bondarenco Ecaterina, Barbacar Nicolae,
Lupașcu Galina, Belousova Galina**

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei

Conform unor date, la tomate au fost detectați mai mulți loci particulari de rezistență pentru *Fusarium* spp., unii din ei, prin aceeași locație cromozomială, prezentând origini evoluționiste comune [7]. S-au găsit markeri moleculari ADN care corelează specific cu rezistența la ofilirea fuzariană [12] sau la fuzarioza radiculară [2]. Majoritatea studiilor consacrate identificării bazei genetice a caracterelor complexe nu iau în calcul interacțiunile *genotip x mediu* [10] și *genice*, datorită cărui fapt efectul fenotipic al unui locus depinde de genotipul altui locus, a câtorva sau mai multor loci. În contextul vizat, este deosebit de importantă punerea în evidență a dependențelor sau legăturilor asociative între potențialul fenotipic al caracterelor cantitative, inclusiv, a celor de rezistență și componentele genetice de variație a locilor majori [6, 9]. În cazul caracterelor cantitative, epistaziile prezintă situația generală, în care fenotipul unui

genotip al locusului nu poate fi prezis doar în baza însumării efectelor locilor separați [1]. Interacțiunile complexe ale alelelor cu mediul intern și extern fac ca pronosticul comportamental al acestora să fie destul de rezervat [11]. Scopul prezentelor cercetări a constat în stabilirea legăturilor asociative între reacția imunologică a plantelor de tomate la izolatele virulente de *F.oxysporum* și particularitățile polimorfismului ADN.

Material și metode

Material. În cercetare s-au utilizat genotipurile/populațiile de tomate: 1 – Mestnâi (430), 2 – Costral (431), 3 – BC₃ (Costral x Mestnâi) x Mestnâi (432), 4 – BC₃ (Costral x Mestnâi) x Costral (433), 5 – F₄ Costral x Mestnâi (434), 6 – Burnley Metrou (435), 7 – Saladette (436), 8 – BC₃ (Burnley Metro x Saladette) x Saladette (437), 9 – BC₃ (Burnley Metro x Saladette) x Burnley Metrou (438), 10 – F₄ Burnley Metro x Saladette (439), 11 – Noviciok (440), 12 – Balkan (441), 13 – BC₃ (Noviciok x Balkan) x Balkan (442), 14 – BC₃ (Noviciok x Balkan) x Noviciok (443), 15 – F₄ Noviciok x Balkan (444), 16 – F₄ Sunmark x Mestnâi (445), 17 – Sunmark (446). **Cercetări imunologice.** În legătură cu faptul că manifestarea fuzariozei radiculare este mai pronunțată pe fundal de temperatură joasă nefavorabilă, s-a procedat la testarea reacției unui set de genotipuri/populații perspective de tomate la filtratele de cultură (FC) ale 3 izolate virulente de *F.oxysporum* var. *orthoceras* în condiții de climocameră, la temperatura 10°C (stresantă pentru tomate), timp de 21 zile, la etapa de germinație. Pentru combinațiile backcross s-a aplicat alternanța de temperatură a câte 2 zile: 23/10/23°C în scopul inițierii creșterii (23°C), acțiunii factorului stresant (10°C) și, ulterior, asigurării proceselor reparatorii (23°C). **Analiza moleculară a genotipurilor de tomate.** Genotipurile de tomate și populațiile de tomate au fost analizate molecular prin metoda ISSR-PCR (*Inter-Simple Sequence Repeat – Polymerase Chain Reaction*) [5, 8]. Metoda ISSR permite estimarea integrală a variabilității genomului (prin amplificarea regiunilor intermicrosatelitice) și se caracterizează prin reproductibilitate înaltă, dar nu presupune cunoașterea regiunilor flancante, ceea ce este foarte util în cazul genomurilor, a căror date despre structura primară sunt limitate. Succesiunea nucleotidică a primerilor ISSR utilizați este prezentată în tab.1.

Tabelul 1. Lista primerilor ISSR

Nr.	Denumirea primerului	Sucesiune nucleotidică	Lungime (b.a.)
1	M3	5' - GAGAGAGAGAGAGAGA(C/T)C	21
2	M4	5' - AGAGAGAGAGAGAGAG(C/T)C	21
3	M7	5' - CAGCAGCAGCAGCAG	15
4	M14	5' - GACAGACAGACAGACA	16

Extragerea ADN. S-a efectuat din 17 genotipuri de tomate (*pooling* din 5 plantule individuale ale fiecărui genotip). Izolarea ADN s-a realizat în conformitate cu protocolul Murray, Thompson (1980) [4] și unele modificări elaborate în lab. **Genetică moleculară.** ADN a fost dizolvat în apă distilată tratată cu DEPC (dietilpirocarbonat) sau în Tris.HCl (pH 8; 1M) + EDTA (acid etilendiamintetraacetic, 0.5M). Analiza calității probelor de ADN s-a efectuat prin electroforeză în geluri de agaroză de 1% și

soluție tampon 1xTAE (Tris-acetat-EDTA). *Amplificarea ADN*. Reacțiile PCR au fost realizate pe *Applied Biosystems 2720 thermal cycler*. Amestecul de reacție a inclus: 0.5U/ μ l Taq-polymerază (DreamTaq, Fermentas); 1x soluție tampon pentru PCR (cu conținut de Mg^{2+}); dNTP (2,5 mM fiecare); primeri (concentrația reaccională egală cu 1 μ M); matriță; apă deionizată până la volumul final de 20 μ l. *Programul de amplificare*: I – 94°C – 1 min. 30 sec.; II – 94°C – 40 sec., 58°C – 45 sec., 72°C – 1 min. 30 sec. x 50 cicluri; III – 94°C – 40 sec., 56°C – 45 sec., 72°C – 1 min. 30 sec.; VI – 72°C – 5 min. *Vizualizarea rezultatelor amplificării*. S-a efectuat prin electroforeză în gel de agaroză de 2,5% în soluție tampon 1 x TAE, la o tensiune de 10 V/cm, în UV, cu lungimea de undă de 305 nm, la transiluminator. Pentru introducerea probelor în gel, s-au utilizat 1/10 volume 10x amestec de bromfenol albastru.

Acțiunile și interacțiunile genice au fost calculate conform modelului Gamble [3]. Analiza statistică a datelor obținute s-a efectuat în pachetul de soft STATISTICA 7.

Rezultate și discuții

La majoritatea genotipurilor/populațiilor de tomate testate s-au constatat diminuări ale lungimii rădăcinii în variantele cu FC *F.oxysporum var.orthoceras*. În cercetările anterioare, s-a stabilit o dependență pronunțată între lungimea rădăcinii, nivelul de germinație (indice al rezistenței genotipurilor la temperaturi diminuate – 10°C) și fuzarioză radiculară la etapă timpurie a ontogenezei. Astfel, lungimea rădăcinii poate fi considerată nu doar o particularitate genotipică, ci și un test-obiect al rezistenței la acești 2 factori – biotic (FC) și abiotic (10°C) stresanți. După cum rezultă din datele prezentate în figura 1, genotipurile/populațiile 5, 6, 8, 10, 11, 15 au manifestat sensibilitate la toate cele 3 FC ale izolatelor *F.oxysporum var.orthoceras*.

Prin analiză bifactorială a varianței, s-a constatat că cea mai mare pondere în sursa de variație a lungimii rădăcinii a prezentat factorul genotipic, ceea ce are importanță practică în vederea perspectivei de elucidare a genotipurilor cu rezistență complexă la fuzarioză și temperatură joasă nefavorabilă la etape timpurii ale ontogenezei (tab.2).

Conform datelor prezentate (tab.3), acțiunile (*a* – aditive, *d* – dominante) și interacțiunile (tip *aa* – *aditiv x aditiv*, *ad* – *aditiv x dominant*, *dd* – *dominant x dominant*) genice implicate în reacția genotipurilor/populațiilor la condiții abiotice nefavorabile (23/10/23°C) și acțiunea asociată a acestora cu FC au fost diferite după nivel și orientare – în direcția măririi (+) sau micșorării (-) caracterului. Aceste particularități au depins atât de condiții, cât și de combinație. În majoritatea cazurilor, genele dominante, interacțiunile epistatice de tip *aa*, *ad* și forțele aditive (detașat diminuate) au prezentat factorii care au contribuit la mărirea valorilor lungimii rădăcinii, adică a rezistenței.

De menționat că soiul Mestnâi, cu capacitate de transmitere ereditară a rezistenței la fuzarioza radiculară a prezentat o manifestare mai eficientă pe fundalul genetic al soiului Costral, decât pe cel al soiului Sunmark, ceea ce relevă implicarea epistaziilor în formarea caracterului de rezistență. Testele moleculare au demonstrat că genotipurile și populațiile aflate în studiu au prezentat un polimorfism pronunțat în baza primerilor ISSR (tab.4, fig.2).

Pentru a stabili capacitatea diferențiatoră a primerilor ISSR utilizați, s-a aplicat analiza clusteriană (metoda *k*-medii), pentru clasificarea genotipurilor/populațiilor în 3 categorii, în baza numărului de ampliconi – mic, mediu, mare.

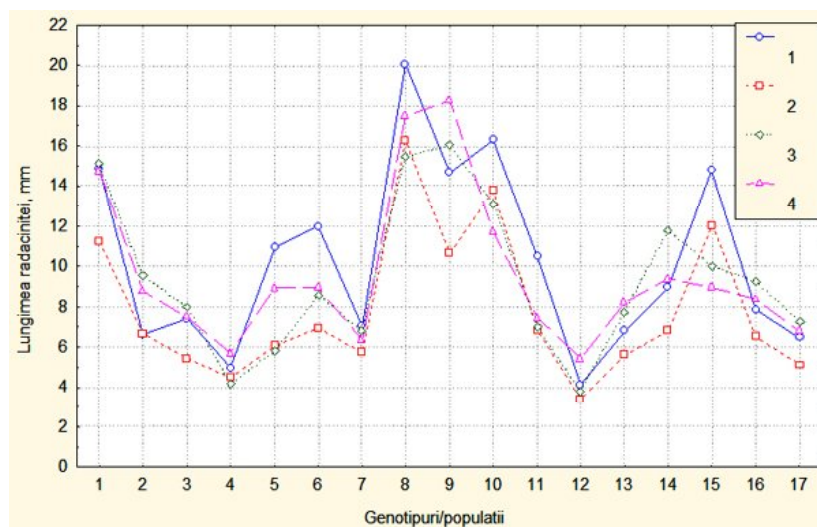


Fig.1. Lungimea rădăcinii la genotipuri și populații hibride de tomate sub influența FC *Foxysporum var.orthoceras*, la temperatura 10°C. Pe orizontală: 1 – 430; 2 – 431; 3 – 432; 4 – 433; 5 – 434; 6 – 435; 7 – 436; 8 – 437; 9 – 438; 10 – 439; 11 – 440; 12 – 441; 13 – 442; 14 – 443; 15 – 444; 16 – 445; 17 – 446. Pe verticală în dreapta: 1 – martor; 2 – FC 1; 3 – FC 2; 4 – FC 3.

Tabelul 2. Analiza factorială a relațiilor genotip de tomate x izolate *Foxysporum var. orthoceras* la temperatura 10°C

Sursă de variație	Grade de libertate	Suma medie a pătratelor	Contribuția sursei de variație (%)
Genotipul plantei	16*	4348,7*	81,1
Izolată	3*	809,4*	15,1
Genotip x izolată	48*	203,3*	3,8

* – suport statistic al testului F.

Tabelul 3. Efectele genice implicate în creșterea rădăcinii de tomate în diferite condiții, biotice și abiotice

Combi-nația backcross	a	d	aa	ad	dd
<i>Martor (23/10/23°C)</i>					
Sunmark x Mestnâi	1,0±3,2	21,6±0,1*	38,0±2,1*	24,3±2,9*	-128,0±2,4*
Costral x Mestnâi	4,8±2,4*	46,0±1,7*	46,2±1,7*	33,9±2,3*	-56,0±2,0*
B. Metro x Saladette	6,7±1,5*	5,3±1,0*	0,6±1,0	14,5±1,4*	-2,9±1,1*
Noviciok x Balcan	1,9±1,3	-9,0±1,5*	-17,7±1,4*	18,8±1,5*	57,7±1,5*
<i>23/10/23°C + FC Foxysporum var.orthoceras</i>					
Sunmark x Mestnâi	20,2±1,4*	26,6±0,8*	33,3±0,8*	-7,6±1,4*	-60,8±1,0*
Costral x Mestnâi	1,9±1,7	14,5±0,8*	16,6±0,8*	13,9±1,6*	-16,0±1,2*
B.Metro x Saladette	7,5±1,5*	10,4±0,7*	12,1±0,8*	15,9±1,4*	-12,3±1,0*
Noviciok x Balcan	-0,6±1,2	-17,2±1,0*	-18,0±1,0*	4,8±1,1*	14,8±1,0*

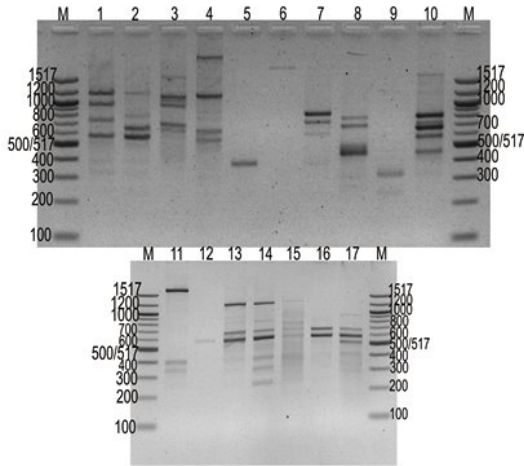
* - suport statistic al testului F.

Tabelul 4. Polimorfismul ADN la diverse genotipuri și populații de tomate

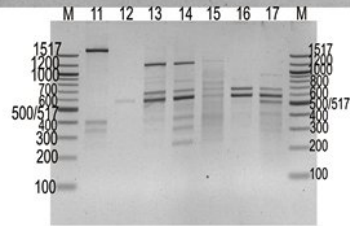
Nr.	Genotipuri/populații	Numărul ampliconilor generați de primerii:			
		M3	M4	M7	M14
1	430	1	4	8	7
2	431	0	4	6	8
3	432	4	6	8	5
4	433	1	4	8	7
5	434	2	1	5	0
6	435	4	1	4	0
7	436	3	4	9	8
8	437	2	4	4	0
9	438	0	2	7	0
10	439	4	6	4	5
11	440	3	3	6	9
12	441	1	1	4	3
13	442	1	5	8	7
14	443	1	7	4	3
15	444	1	6	4	4
16	445	1	2	4	3
17	446	1	5	5	7

După cum rezultă din datele obținute, cea mai distinctă deosebire între clustere, s-a produs în cazul primerilor M14 și M4, urmată fiind de primerul M7. Primerul M3, practic, n-a diferențiat genotipurile/populațiile, adică acestea au fost, relativ, similare (Fig.3). Examinând datele din tab. 4, se vede că numărul ampliconilor obținuți în baza acestui primer a variat în limitele 0...4 – număr mai restrâns decât în cazul altor primeri.

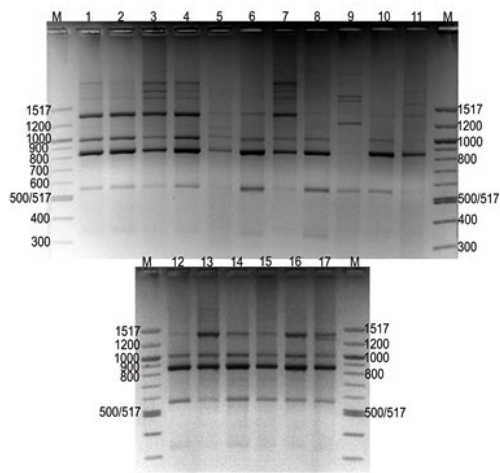
În legătură cu aceasta, pentru cercetarea gradului de asemănare a genotipurilor/populațiilor în baza markerilor ISSR și corelarea acestuia cu similitudinea reacției fenotipice la izolatele *F.oxysporum* var.*orthoceras*, s-a procedat la excluderea acestui primer din analizele ulterioare. Prin compararea dendrogramelor de distribuție (Fig.4) a formelor luate în studiu în baza numărului de fragmente ADN amplificate și lungimii rădăciniței, s-a constatat că 8 genotipuri/populații (1, 2, 3, 4, 7, 13, 14, 17) din 11, adică 72,7% se caracterizează prin omologie înaltă în ceea ce privește amplificarea mai frecventă a fragmentelor de ADN în baza primerilor ISSR (M4, M7, M14) au format cluster comun în baza valorilor înalte ale lungimii rădăciniței la acțiunea celor 3 FC *F.oxysporum* var.*orthoceras*, adică a rezistenței. Necoincidența totală a repartiției în baza criteriilor analizate, ar putea fi explicată prin fenomenul de interacțiune genică. De exemplu, populațiile cu participarea unui genitor comun – Mestnâi: F₄ Costral x Mestnâi (5) și F₄ Sunmark x Mestnâi (16) au prezentat similitudine în baza numărului de fragmente amplificate, dar s-au deosebit în ceea ce privește lungimea rădăciniței.



A



B



C

Fig. 2. Rezultatele amplificării ISSR cu ajutorul primerilor M4 (A), M7 (B), M14 (C).

M – 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs).

Genotipurile/populațiile: 1 – 430; 2 – 431; 3 – 432; 4 – 433; 5 – 434; 6 – 435; 7 – 436; 8 – 437; 9 – 438; 10 – 439; 11 – 440; 12 – 441; 13 – 442; 14 – 443; 15 – 444; 16 – 445; 17 – 446.

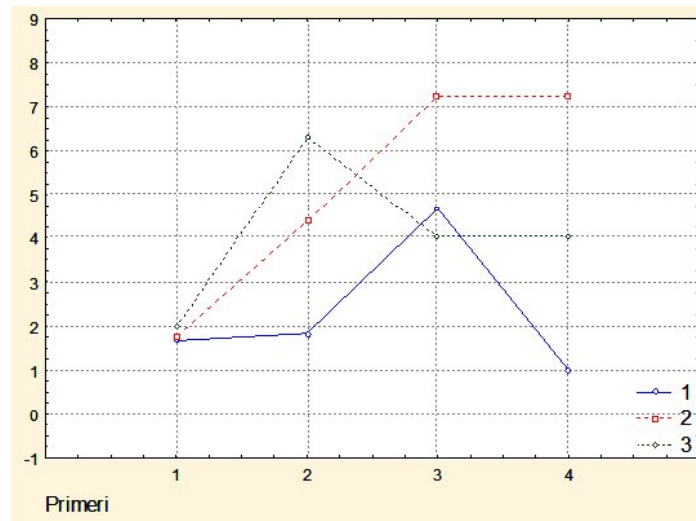


Fig.3. Analiza clusteriană (metoda k -medii) a capacității primerilor ISSR de diferențiere a genotipurilor/populațiilor de tomate. Pe orizontală: 1 – M3; 2 – M4; 3 – M7; 4 – M14. Pe verticală 1, 2, 3 - membrii clusterului 1: 5, 6, 8, 9, 12, 16; 2: 1, 2, 3, 4, 7, 11, 13, 17; 3: 10, 14, 15.

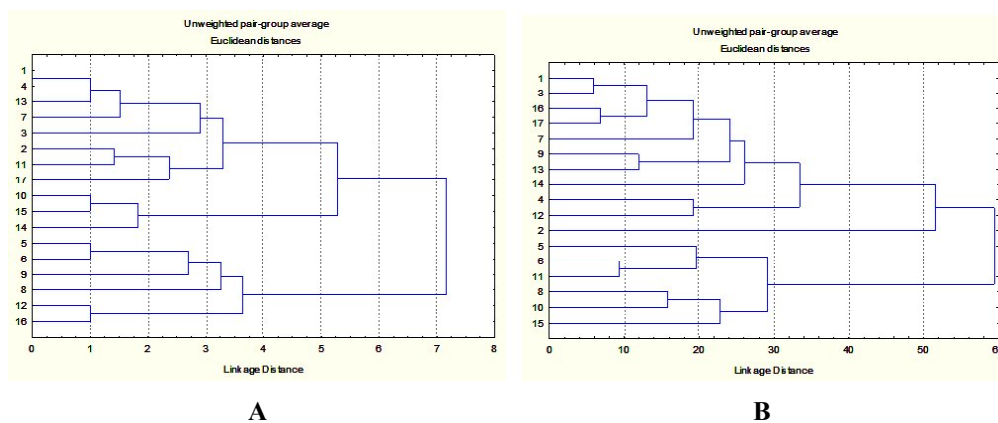


Fig.4. Dendrograma de repartiție a genotipurilor/populațiilor de tomate în baza polimorfismului ADN (A) și lungimii rădăcinii sub acțiunea FC *Foxysporum* var. *orthoceras*, la temperatura 10°C. 1 – 430, 2 – 431, 3 – 432, 4 – 433, 5 – 434, 6 – 435, 7 – 436, 8 – 437, 9 – 438, 10 – 439, 11 – 440, 12 – 441, 13 – 442, 14 – 443, 15 – 444, 16 – 445, 17 – 446.

Aceasta ar putea fi explicată prin acțiunea diferită a fundalului genetic (soiul Costral sau Sunmark) asupra activității genelor soiului Mestnâi, ceea ce relevă manifestarea fenomenelor epistatice în controlul reacției la fuzarioza radiculară.

Concluzii

Prin analiză factorială s-a constatat rolul prioritar (81,1%) al factorului genotipic în reacția plantelor de tomate la filtratul de cultură *Foxysporum* var. *orthoceras* și temperatură joasă (10°C).

Genele dominante, interacțiunile epistatice de tip *aa*, *ad* și acțiunile aditive (detașat diminuate) au prezentat factorii care au contribuit la mărirea rezistenței la *F.oxysporum* var.*orthoceras* în condiții controlate.

S-a constatat o legătură asociativă pronunțată (72,7%) între rezistența genotipurilor/populațiilor selectate de tomate la fuzarioza radiculară, temperatură joasă (10°C) și polimorfismul markerilor ISSR (M4, M7, M14) care poate fi utilizată în *screening*-ul imunologic.

Analiza clusteriană prin metoda *k*-medii oferă oportunități înalte de identificare a primerilor ISSR care posedă înalte capacități de diferențiere a genotipurilor de tomate. În acest scop pot fi utilizați primerii ISSR M4, M7, M14.

Fundalul genetic poate modifica activitatea unor gene care controlează rezistența tomatelor la fuzarioza radiculară și temperatură joasă, ceea ce relevă importanța epistaziilor în controlul rezistenței la acești factori asociați.

Bibliografie:

1. Carlborg O., Kerje S., Schutz K., et al. A global search reveals epistatic interaction between QTLs for early grown in the chicken. *Genome Res.*, 2003, N13, P.413-421.
2. Fazio G., Stevens M.R., Scott J.W. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (Fr1) in tomato. *Euphytica*, 1999, N105(3), P.205-210.
3. Gamble E. E. Gene effects in corn (*Zea mays* L.). I. Separation and relative importance of gene effects for yield. *Can. J. Plant Sci.*, 1962, N42, P.339-348.
4. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research.*, 1980, Vol. 8, N.19, P.4321-4326.
5. Nagaraju J.G. Novel FISSR-PCR primers and methods of identifying genotyping diverse genomes of plant and animal systems including rice varieties, a Kit thereof. Patent nr. US, 2003/0194730 A1.
6. Paran I, Zamir D. Quantitative traits in plants: beyond the QTL. *Trends Genet.*, 2003, N19(6), P.303-306.
7. Sela-Buurlage M.B., Budai-Hadrian O., Pan Q. et al. Genome-wide dissection of Fusarium resistance in tomato reveals multiple complex loci. *Mol. Genet. Genomics*, 2001, N265, P. 1104-1111.
8. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, N 20, P.176-183.
9. Антошкин А.А. Особенности идентификации некоторых количественных признаков у томата. Автореф. дис. ... канд. с-х наук ВНИИ селекции и семеновод. овощ. культур. Пос. ВНИИССОК (Моск. обл.). 2005, 26 с.
10. Кильчевский А.В. Генетико-экологические основы селекции растений. *Инф. Вестн. ВОГиС*, 2005, 9, № 4, с. 518-526.
11. Колесникова М.А. Использование молекулярных маркеров для картирования генов устойчивости (QTL) к ложной мучнистой росе у жемчужного проса. Автореф. дис. ... канд. наук. М., 2001. 20 с.
12. Фесенко И.А., Куклев М.Ю., Карлов Г.И. Создание ДНК-маркера гена устойчивости томата к фузариозному увяданию. *Изв. ТСХА*, 2007, № 1, с. 66-72.

Mulțumiri. Sinteza primerilor a fost posibilă datorită colaborării în cadrul Fondului Rus de Cercetări Fundamentale nr. 08.820.04.20RF cu Dna dr.Kokieva E.Z., căreia autorii îi aduc sincere mulțumiri.