

## POLIMORFISMUL GENETIC ÎN CADRUL UNOR GENOTIPURI DE CASTRAVEȚI ȘI DE FLOAREA-SOARELUI

*Maria DUCA, Ana BÎRSAN, Tatiana HOMENCO, Tatiana BĂTRĂNU,  
Mariana ROMANIUC, Dorina ARTENI, Dogan OZDEMIR*

*Catedra Biologie Vegetală*

The denaturation s processes kinetics of sunflower and cucumber of different genotypes DNA was studied. The thermal denaturation of DNA macromolecules have proved high melting temperatures at sunflower hybrids, in comparison with cucumber genotypes, this fact denotes the increased stability of DNA macromolecules. The level of heterogeneity has varied in dependence of genotype and it has correlated with the highest values of morphological and physiological parameters which determines the effect of hybrid vigor in studies of genotypes. The kinetics of denaturation processes, realized on two cucumber families, has proved that the first generation hybrids DNA macromolecules had the melting temperature higher, an increased content of G-C and a higher level of heterogeneity, in comparison with parental lines.

Polimorfismul genetic constituie un imens rezervor de variații ereditare discontinue, cu valoare selectivă ridicată, care permite o adaptare la condițiile noi de mediu sau la schimbările rapide care, de altfel, ar putea antrena existența speciei. Polimorfismul poate fi identificat la diverse niveluri de organizare a organismelor animale și vegetale prin analiza diferitelor caractere – morfologice, fiziologice, citogenetice, biochimice, moleculare etc. [1]. Analiza variațiilor existente în cadrul macromoleculilor de ADN la diverse genotipuri are o importanță deosebită în aprecierea polimorfismului genetic la diverse organisme.

Cantitatea de material genetic (ADN) și structura acestuia la organisme vii variază în limite mari. În general, la organisme evolute cantitatea de ADN și, respectiv, de informație genetică este mult mai mare comparativ cu organisme mai simple [1,2]. Studiul ADN-ului provenit de la diferite specii de procariote și eucariote denotă ca el suferă variații semnificative de la o specie la alta în ceea ce privește cantitatea diferitelor baze azotate și, mai ales, raportul dintre citozină și guanină, adenină și timină [2,3].

Majoritatea lucrărilor dedicate analizei variabilității din cadrul speciei la nivelul secvențelor polinucleotidice de ADN se referă la plante. Lucru determinat, probabil, de faptul că genomul acestora este cu mult mai variabil decât la animale [4-8]. Observațiile au demonstrat că variabilitatea genetică este foarte diferită la speciile înrudite [3]. În urma cercetărilor au fost determinate o serie de corelații între variabilitatea genetică și mărimea genomului [9].

În mod normal, macromoleculile de ADN se află sub formă dublu-elicooidală, bicatenară, menținută de 2 tipuri de forțe: *de legăturile de hidrogen* dintre perechile de baze dispuse perpendicular pe axa spiralei și *de interacțiunea stacking* dintre bazele succesive. Faptul că macromolecula de ADN e formată din două catene complementare îi mărește stabilitatea și îi asigură o structură regulată [10]. Între A-T există două legături de hidrogen, iar între G-C – trei legături de hidrogen, de unde rezultă că regiunile macromoleculii de ADN mai bogate în G-C prezintă o stabilitate mai mare comparativ cu cele bogate în A-T.

Molecula de ADN poate suferi modificări, poate fi denaturată sub acțiunea unor factori fizici sau chimici, ca: temperatura, expunerea la un pH ridicat, descreșterea constantei dielectrice a mediului apos sub influența alcoolului, cetonelor etc. [11]. Denaturarea moleculei de ADN mai este numită și topirea ADN, iar temperatura de topire corespunde momentului de denaturare a 50% din moleculă (corespunde punctului de mijloc al curbei de topire) și este specifică pentru fiecare tip de ADN [12-14]. Temperatura de topire a acizilor nucleici poate servi ca indicator al stabilității macromoleculilor de ADN, iar cercetarea proceselor de denaturare a ADN-ului la diverse genotipuri de plante poate furniza informații asupra compoziției în baze a diferitelor tipuri de ADN și asupra gradului de heterogenitate a materialului ereditar. Reieșind din cele menționate, în scopul stabilirii gradului de complexitate a genomului s-a determinat temperatura de topire a ADN și au fost studiate procesele generale ale cineticii de denaturare a moleculelor de ADN la diverse genotipuri de floarea-soarelui și de castraveți.

**Material și metode**

În calitate de material de cercetare au servit șapte hibridi  $F_1$  de floarea-soarelui și două familii de castraveți la care s-au studiat atât liniile, cât și hibridii din prima generație.

**Izolarea ADN-ului:** extragerea acizilor nucleici din materialul experimental s-a efectuat cu utilizarea extractului TrisOH 133mM, NaEDTA 6,7mM, NaCl 0,95M, sarcosil de Na 1,33%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,33%, pH=7,8 în raport de 1:3. Probele au fost incubate la 65°C timp de 60 min., cu inversarea periodică a acestora la fiecare 10 minute.

După ce probele au fost aduse la temperatura camerei, a fost adăugat un volum de soluție de cloroform cu alcool izoamilic în raport 24:1 și inversate lent până la apariția unei monofaze. Pentru colectarea acizilor nucleici, care se află în faza apoasă, se efectuează centrifugarea la 4 mii r/min., timp de 20 min., la 4°C. Precipitarea ADN-ului se înfăptuiește cu NaCl până la concentrația finală a acestuia de 0,2M. Apoi, se adaugă un volum de izopropanol, se agită lent prin inversare până la apariția precipitatului caracteristic sub formă de meduză. Probele se centrifughează timp de 5 min. la 5 mii r/min., la 4°C. La sedimentul obținut se adaugă 2 ml soluție alcool etilic 76% cu acetat de Na 0,2M. Probele se centrifughează timp de 5 min., 5 mii r/min., la 4°C. La sedimentul uscat s-a adăugat 100  $\mu$ l apă distilată. ADN-ul astfel obținut poate fi păstrat la temperatura -20°C [15].

**Denaturarea ADN-ului** se desfășoară într-un interval mic de temperatură și se reflectă în variațiile cardinale ale multor proprietăți fizice ale ADN-ului, cum ar fi, de exemplu, variația densității optice. Gradul de denaturare a ADN-ului poate fi analizat reieșind din modificarea intensității de absorbție a razelor cu  $\lambda=260$  nm de către soluția ce conține ADN denaturat, bazată pe efectul hiperchromic ce apare ca rezultat al despiralizării moleculei de ADN. La denaturarea ADN-ului se produce o creștere a absorbției luminii la 260 nm de cca 40%, în funcție de tipul de ADN [15].

Cantitatea totală de lumină absorbită de ADN denaturat este aproximativ egală cu cea absorbită de un număr echivalent de mononucleotide libere [12,13], iar creșterea absorbției la 260 nm, produsă de încălzirea soluției de ADN nativ, e direct dependentă de conținutul de perechi de baze A-T: cu cât proporția de perechi de baze A-T este mai mare, cu atât mai intens sunt absorbite razele UV ale luminii [16,17]. Reieșind din acest principiu, Marmuir și colaboratorii săi au pus bazele unei metode de determinare a conținutului de nucleotide de ADN conform  $T_t$  (temperatura de topire) [18].

ADN-ul preparat se dizolvă în soluția tampon SSC cu următorii componenți: 0,15M NaCl + 0,015M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ; pH=7,0. Cuvele se mențin în baia de apă timp de 10 min., la temperatura de 25°C, apoi se determină densitatea optică a soluției la  $\lambda=260$  nm și  $\lambda=320$  nm. Pentru cercetarea cineticii procesului de denaturare, temperatura se ridică la 50°C, unde cuvele se mențin timp de 10 min., apoi se determină densitatea optică a soluției. Temperatura se ridică treptat, de fiecare dată cu 2°C, și se lasă pe 10 minute pentru a obține echilibru, determinându-se densitatea optică la temperatura dată.

În baza rezultatelor obținute se alcătuiește graficul efectului hiperchromic. Pentru aceasta, pe axa absciselor se înscrie temperatura, iar pe axa ordonatelor – raportul dintre densitatea optică a soluției de ADN, determinată la o anumită temperatură, față de densitatea optică a soluției la  $t=25^\circ\text{C}$  ( $A_t/A_{25}$ ). Temperatura de topire corespunde momentului de denaturare a 50% de ADN și corespunde mijlocului curbei de topire.

Temperatura de topire ( $T_t$ ) crește liniar cu conținutul de perechi de baze G-C, care sunt mai stabile datorită prezenței celor trei legături de hidrogen [12,16,17]. În cazul în care după curbele de denaturare se determină compoziția în nucleotide, experiența se efectuează în condiții standard, pentru care se determină dependența empirică dintre conținutul de G-C și  $T_t$ . În soluția standard de SCC (0,15M NaCl + 0,015M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) această relație este următoarea [18]:

$$G+C = (T_t - 69,3) \cdot 2,44,$$

unde 2,44 – tg unghiului de înclinare a curbei, determină valoarea concretă a G-C.

Utilizând relația dată, se determină compoziția în nucleotide a soluției de ADN ce conține de la 30 de la 70% de G-C.

Conform acestei metode, putem determina nivelul de heterogenitate a soluției de ADN [19]:

$$2\sigma = (T_t - 30) \cdot 2,44$$

unde:  $2\sigma$  – nivelul de heterogenitate a ADN-ului;

$T_t$  – temperatura de topire, determinată după curba denaturării.

## Rezultate și discuții

Reieșind din faptul că temperatura de topire a moleculelor de ADN este specifică pentru fiecare tip de ADN, în scopul evidențierii heterogenității moleculelor de ADN la hibridii de floarea-soarelui și de castraveți s-a studiat cinetica proceselor de denaturare. Analiza datelor privitor la denaturarea moleculei de ADN la diferiți hibridi de floarea-soarelui a pus în evidență temperaturi de topire diferite pentru genotipurile cercetate. Valorile temperaturii de topire ale moleculelor de ADN au variat în funcție de genotip în limitele 67,7-89,0°C (Fig.1). Cea mai înaltă temperatura de topire s-a constatat la hibridul 11 (89,0°C), iar cea mai joasă – la hibridul 12 (67,7°C). Temperaturi înalte de topire s-au atestat, de asemenea, la hibridii 11, 17 și 18, demonstrând o stabilitate mai înaltă a moleculei de ADN și un număr mai mare de perechi de baze G-C în genomul dat.

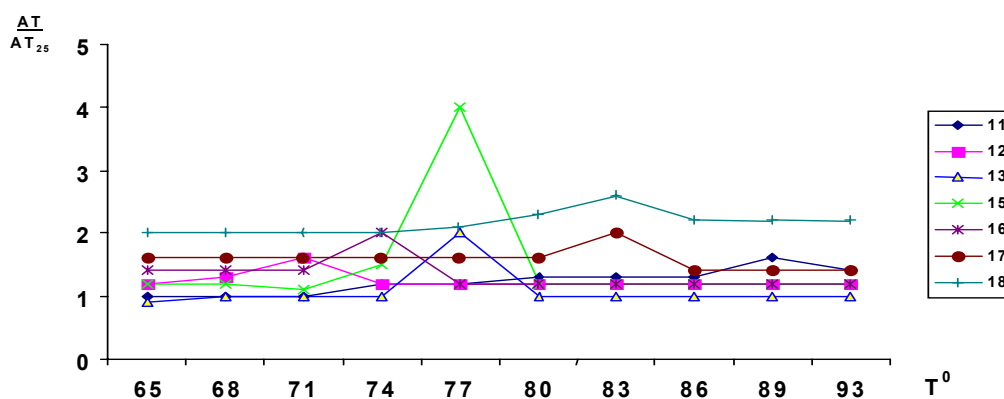


Fig.1. Cinetica procesului de denaturare a ADN-ului extras din diverse genotipuri de floarea-soarelui.

Datele din Tabelul 1 demonstrează că cel mai înalt conținut de G-C este caracteristic pentru hibridul 11 (44,408), iar cel mai scăzut – pentru hibridii 12 și 15 (14,884).

Tabelul 1

### Conținutul de G-C (%) și nivelul de heterogenitate ( $2\sigma$ %) la diferite genotipuri de floarea-soarelui

Hibridul	11	12	13	15	16	17	18
Conținutul G-C (%)	44,408	14,884	15,128	14,884	15,128	30,256	22,448
$2\sigma$ %	140,30	110,776	111,02	110,776	111,02	126,148	118,34

Nivelul maxim de heterogenitate a ADN-ului se observă la hibridii 11 și 17, iar nivelul minim de heterogenitate a ADN-ului – la hibridii 12 și 15.

Studiul comparativ al hibridilor de floarea-soarelui (date neprezentate în articol) a evidențiat la hibridii 11 și 17 valori maxime ale parametrilor morfofiziologici, ceea ce demonstrează heterozis pronunțat pentru aceste genotipuri. Astfel, gradul de heterogenitate mai înalt s-a stabilit la genotipurile cu heterozis pronunțat, care au avut și temperatura de topire mai înaltă a moleculelor de ADN.

Analiza comparativă a temperaturilor de topire a moleculelor de ADN în cadrul a două familii de castraveți, la care s-au studiat atât liniile parentale, cât și hibridii din prima generație, a pus în evidență temperaturi de topire care s-au încadrat în limitele de aproximativ 61-70°C (Fig.2). În cadrul genotipurilor de castraveți s-au constatat temperaturi de topire minime (61,5°C) la liniile maternă și paternă ale hibridului 1 și la linia paternă a hibridului 3, iar temperaturi de topire maxime s-au înregistrat la ambii hibridi (67,5 și 70,5°C). Astfel, hibridii din prima generație au avut temperaturi de topire mai înalte a moleculelor de ADN, comparativ cu liniile parentale.

Determinarea gradului de heterogenitate a ADN-ului (Tab.2) demonstrează că cel mai înalt nivel de heterogenitate este caracteristic hibridului 3, la care linia maternă a avut temperatura de topire mai mare ca linia paternă.

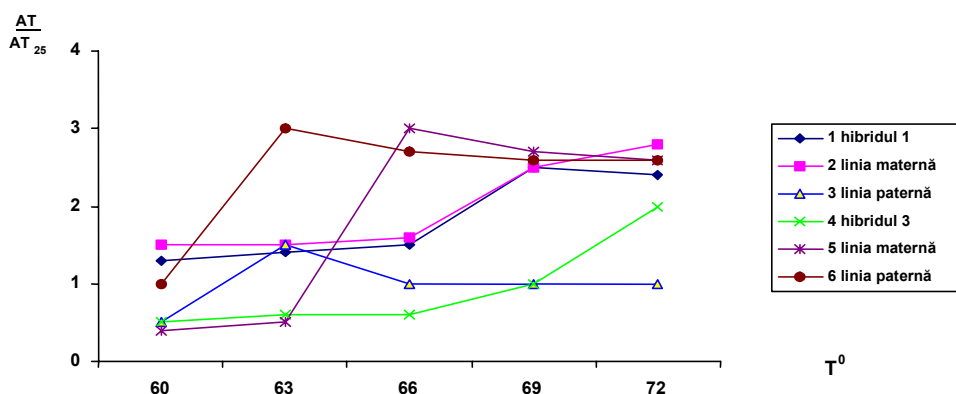


Fig.1. Cinetica procesului de denaturare a ADN-ului extras din diverse genotipuri de castraveți.

Tabelul 2

#### Nivelul de heterogenitate (2σ %) la diferite genotipuri de castraveți

Genotipul	Hibrid 1	♀ 1	♂ 1	Hibrid 3	♀ 3	♂ 3
2σ %	91,5	76,86	76,86	98,82	84,18	76,86

Astfel, analiza comparativă a parametrilor cercetați la diverse genotipuri de floarea-soarelui și castraveți a pus în evidență valori mai înalte ale temperaturilor de topire pentru moleculele de AND la floarea-soarelui comparativ cu genotipurile de castraveți. Aceasta demonstrând o stabilitate mai înaltă a moleculelor de AND la floarea-soarelui, determinată de prezența unui conținut sporit de G-C. De asemenea, gradul de heterogenitate a ADN-ului hibridilor de floarea-soarelui este mai mare decât la hibridii de castraveți, în timp ce liniile au avut valori mai mici comparativ cu hibridii.

#### Concluzii

1. Denaturarea termică a macromoleculelor de AND a demonstrat temperaturi maxime de topire la hibridii de floarea-soarelui, comparativ cu genotipurile de castraveți, ceea ce denotă stabilitatea mărită a macromoleculelor de AND. Gradul de heterogenitate a variat în dependență de genotip și a corelat cu valorile maxime ale parametrilor morfofiziologici ce determină efectul de heterozis la genotipurile cercetate.

2. Cinetica proceselor de denaturare, realizată în cadrul a două familii de castraveți, a demonstrat că hibridii din prima generație au avut temperatura de topire mai înaltă a moleculelor de ADN și grad de heterogenitate mai înalt, comparativ cu liniile parentale.

#### Referințe:

1. Фадеева Т.С., Соснихина С.П., Черкаева Н.М. Сравнительная генетика растений. - Ленинград, 1980. - 248 с.
2. Raicu P. Genetica. Vol. II. - București, 1997. - 238 p.
3. Pierce B.A., Mitton I.B. The relationship between genome size and genetic variation // Am. Nat. - 1980. - P.850-861.
4. Лобов В.П., Даскалюк А.П. Сравнительное исследование ДНК озимых и яровых форм пшеницы // Доклады АН СССР. - 1984. - Том 275. - №1. - С.218-221.
5. Даскалюк А.П., Остаплюк А.Н., Тищенко Е.Н., Лобов В.П. Свойства уникальных и повторяющихся последовательностей ДНК родственных яровых и озимых сортов пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. - 1982. - Том 14. - №2. - С.134-138.
6. Даскалюк А.П., Остаплюк А.Н., Тищенко Е.Н., Порох Л.С., Лобов В.П. Структура генома гибрида кукурузы Буковинский 15 и его родительских форм. - В кн: Нуклеиновые кислоты и хроматин растений. - Киев: Наукова Думка, - 1981. - С. 57-61.
7. Даскалюк А.П., Остаплюк А.Н., Тищенко Е.Н., Порох Л.С., Лобов В.П. Характеристика генома родственных сортов пшеницы. - В кн: Нуклеиновые кислоты и хроматин растений. - Киев: Наукова Думка, 1981, с.53-57.
8. Боброва В.К. О степени сродства нуклеотидных последовательностей ДНК хлоропластов растений. - В кн: Нуклеиновые кислоты и хроматин растений. - Киев: Наукова Думка, 1981, с.14-18.
9. Larson A. A reevaluation of the relationship between genome size and genetic variation // Am. Nat. - 1981. - P.119-125.

10. Santa Lucia J., Hatim T., Seneviratne P. Improved Nearest-Neighbor parameters for Predicting DNA duplex stability // *Biochemistry*. - 1996. - Vol. 35. - P.3555-3562.
11. Ussery D. W. DNA denaturation // *Academic Press*. - 2000. - 314 p.
12. Айала Ф.Д. Современная генетика. Том 2. - Москва: Мир, 1988. - 265 с.
13. Айала Ф.Д. Современная генетика. Том 1. - Москва: Мир, 1987. - 280 с.
14. Britten R.I., Graham O.B. Analysis repeating DNA sequences by reassociation // *Meth. Enzimol. E*. - 1974. - Vol.29. - P.363-418.
15. Murray M.G., Thompson W.F Rapid isolation of molecular weight DNA // *Nucleic Acids Research*. - 1980. - Vol.8. - No.19. - P.4321-4325.
16. Nover N. Melting computing the melting temperature of nucleic acid duplex // *Applications note*. - 2001. - Vol.17. - P.126-127.
17. Orlandini E., Bhattachacharjee S., Maritan A. Mechanical denaturation of DNA: existence of a low-temperature denaturation // *J. Physics A: Matematica land General*. - 2001. - Vol.34. - P.751-756.
18. Мандель М., Мармур Дж. Определение содержания гуанина и цитозина в ДНК с помощью кривых плавления. – В кн: Методы исследования нуклеиновых кислот, 1986, с.182-192.
19. Скрипка Л.В. Гетерогенность ДНК кукурузы. – В кн: Нуклеиновые кислоты и хроматин растений. - Киев: Наукова Думка, 1981, с.130-133.

*Prezentat la 29.01.2007*