

EVIDENȚIEREA POLIMORFISMULUI GENETIC AL FORMELOR M_6 DE NĂUT PRIN INTERMEDIUL ANALIZEI RAPD-PCR

Dorin CLICIUC

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

Using the gamma ray mutagenesis on chickpea new mutants were obtained with morfo-physiological treats that have been related to an improved productivity or quality of beans. An RAPD analysis was performed with various primers on these mutants. Only by using some RAPD primers were obtained polymorphic amplification fragments. More than 90% of the amplified fragments were identical for all mutants and the initial genotype and only one difference (a new polymorphic fragment or the lack of a common fragment for all other genotypes) could be obtained for specific genotype by using a given primer. These results attest that changes induced by the gamma irradiation affect reduced DNA sequences and may lead for identification of these mutations.

Introducere

Năutul (*Cicer arietinum L.*) este o plantă de cultură anuală din familia leguminoaselor, autogamă; cariotipul acestei specii conține 16 sau 22 cromosomi în celulele somatice. Originea acestei culturi este considerată Asia Mijlocie [1]. Această cultură este apreciată datorită calităților sale, în special datorită conținutului înalt de proteine în boabe, precum și rezistenței sale înalte la condiții nefavorabile de mediu (secete, arșițe, soluri sărace sau degradate etc.) [2]. Năutul a fost în trecut o cultură tradițională pentru Moldova, dar odată cu specializarea agriculturii ea a fost omisă din cercetare și producție. Din cauza condițiilor pedoclimatice specifice din ultimii ani în Republica Moldova, cultura năutului prezintă un interes deosebit pentru agricultură și necesită a fi reconsiderată [3]. Pentru reconsiderarea culturii năutului în țara noastră necesită a fi create soiuri performante, cu calități și caractere adecvate cerințelor specifice agriculturii și pieței noastre. Crearea soiurilor se soluționează prin cercetări ample în aspect genetic și ameliorativ, prin acumularea unui genofond corespunzător cerințelor actuale. O importanță deosebită prezintă crearea materialului inițial pentru ameliorare. Multiple progrese însemnate în crearea soiurilor noi au fost realizate prin metoda mutagenezei radiaționale. În ultimii 30 de ani, prin utilizarea mutagenezei radiaționale în lume au fost create peste 1700 soiuri de plante [4] și s-a obținut un valoros material ameliorativ.

În cercetările noastre anterioare [5,6], prin folosirea mutagenezei γ au fost obținute o serie de forme mutante de năut, cu caractere deosebite față de formele inițiale folosite pentru iradiere și care au păstrat aceste caractere pe parcursul a mai multor generații succesive. Aceste cercetări au fost efectuate pe parcursul a 8 ani, fiind selectate peste 400 plante M_2 cu caractere deosebite față de valorile medii ale caracterelor respective la formele inițiale. Spre regret, din aceste forme inițiale doar la o mică parte (sub 10%) caracterele evidențiate s-au transmis ereditar și s-au observat în generațiile ulterioare. Deoarece anii pe parcursul cărora au fost efectuate aceste cercetări au fost foarte variați în privința condițiilor de mediu, uneori cu condiții climaterice extreme, o parte considerabilă din formele cu caractere de interes pentru această cultură au fost pierdute. Cea mai mare parte a formelor selectate inițial au fost eliminate, deoarece la ele nu s-au păstrat caracterele evidențiate anterior. Caracterele ce formează productivitatea plantelor în mare parte sunt influențate de condițiile de mediu; astfel, pentru ca un genotip performant să-și manifeste calitățile, are nevoie de condiții de mediu optime [7,8], iar ca aceste rezultate să fie repetabile sunt necesare și condiții de mediu stabile, imposibil de realizat în condiții de câmp. Astfel, e posibil ca forme mutante valoroase să nu fie evidențiate din cauza condițiilor de mediu. Evidențierea formelor mutante este, de fapt, cea mai importantă și dificilă etapă în mutageneza experimentală la plante.

Drept un real ajutor în mutageneză ar servi metodele de utilizare a markerilor moleculari la diferite etape în experiențele de mutageneză. În prezent, folosirea markerilor moleculari capătă o răspândire tot mai largă. Aceștia pot servi la evidențierea polimorfismului genetic în cadrul speciilor și populațiilor; ei prezintă o serie de avantaje față de markerii biochimici, citogenetici, morfologici și ontogenetici. Folosirea lor permite evidențierea unor diferențe ale materialului genetic între indivizi în cadrul aceluiași specii, soiuri, populații, familii, indivizi înrudiți și chiar permite identificarea unui individ aparte în cadrul unui grup; de asemenea, aceștia sunt folosiți pentru identificarea legăturilor de înrudire între diferite genotipuri, la calcularea distanței genealogice, la determinarea provenienței unor populații, soiuri și chiar specii [9-10]. Evidențierea markerilor moleculari la studiul unui genotip nu depinde de influența condițiilor de mediu la care au fost expuse plantele studiate, rezultatele obținute sunt determinate doar de secvența nucleotidică a ADN-ului; plantele cu genotip identic prezintă aceiași markeri moleculari, indiferent de caracterele morfologice observate [11].

Scopul acestor cercetări a fost de a observa un polimorfism genetic la forme mutante de năut obținute prin folosirea iradierii γ folosind metoda RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) și de a evalua perspectiva utilizării metodei date la evidențierea noilor forme obținute în urma mutagenezei experimentale.

Material și metode

Pentru iradiere a fost utilizat genotipul 2/98 selectat pe baza unei linii locale din colecția de năut. Iradierea s-a efectuat la instalația PXM- γ -20 completată cu izotop Co^{60} . Dozele utilizate pentru iradiere au fost în intervalul de la 200 până la 300 Gy.

Pentru analiză au fost folosite plantule germinate în cești Petri de 12 forme M_6 . Aceste forme provin de la același genotip inițial 2/98 și au fost selectate datorită evidențierii unor caractere morfofiziologice, care s-au transmis ereditar pe parcursul a 4 generații succesive.

ADN-ul genomic a fost extras din țesut omogenizat în azot lichid folosind soluție tampon pentru extracție (Tris-HCl 133 mM, pH 7,8; Na_2EDTA 6,7 mM; NaCl 0,95 M; sarcosyl de Na 1,33%; mercaptoetanol 1,33%), izolat cu clorură formică (CH_3Cl /alcool izoamilic 24:1) și precipitat cu izopropanol. Operațiile de purificare a ADN-ului au fost realizate cu etanol 76%, ce conținea acetat de Na 0,2 M. ADN extras a fost dizolvat în 200 μl apă bidistilată. Analiza cantitativă și calitativă a ADN-ului a fost realizată prin electroforeză în gel de agaroză.

Pentru RAPD PCR s-a pregătit următorul amestec: ADN 0,1 mg/ml, soluție-tampon 10x (Tris-HCl 670 mM, pH 8,8; MgCl_2 67 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Tween 20 de 0,1%), amestec de nucleotide dNTP (2 mM de fiecare tip), primer 0,1 mM, Taq-polimeraza 1u/ μl . Amplificarea a fost efectuată utilizând un termociclu automat, Applied Biosystems thermal cycling, cu următoarele condiții:

- 1) denaturarea: 95°C – 5 min. (un ciclu);
- 2) 45 cicluri:
 - denaturarea: 95°C – 1 min.;
 - renaturarea: 37-42°C – 1-2 min.;
 - elongarea: 72°C – 2 min.;
- 3) elongarea specifică: 72°C – 7-10 min.

Rezultate și discuții

Evidențierea primerilor RAPD optimi este o sarcină importantă în aceste cercetări [12-14]. Specificul acestui studiu constă în evidențierea polimorfismului genetic la forme ce sunt foarte apropiate din punct de vedere genetic, deoarece provin de la același genotip inițial folosit pentru iradiere [15,16]. Astfel, materialul de studiu se prezintă ca foarte omogen din punctul de vedere al principalelor caracteristici morfologice, fiziologice, biochimice și genetice, excepție fiind doar unele caractere individuale datorită cărora au fost selectate aceste forme. Cercetări similare la specii leguminoase descriu evidențierea polimorfismului genetic la diferite forme mutante la folosirea a 3-4 primeri RAPD, dar aceste date nu prezintă clar proveniența acestor mutații. Studiind dendogramele publicate, observăm că aceștia provin de la linii și soiuri diferite [17,18].

Pentru a identifica primerii optimați acestei culturi, au fost efectuate câteva amplificări de probă utilizând ADN de năut extras din câte 3 linii genetice distincte, în câte 3 repetiții, și diverși primeri RAPD din seriile OPA, P și D ce se află în comercializare. La folosirea primerilor P2, P3, P6, P39, OPA8, OPA10, D3 s-a obținut un spectru optim al segmentelor de amplificare (până la 12 benzi de amplificare cu dimensiuni cuprinse între 400–3000 pb). Primii 4 dintre acești primeri au prezentat rezultate repetabile pentru 2-3 amplificări succesive și, totodată, au evidențiat un anumit polimorfism între liniile luate pentru studiu. Ulterior, acești primeri au fost folosiți pentru evidențierea polimorfismului genomic al formelor M_6 studiate.

În rezultatul reacției PCR, folosind primerul P3, s-a obținut un număr de 10-11 benzi de amplificare pentru fiecare genotip (Fig.1), 10 (91%) dintre aceștia sunt identici pentru toate genotipurile date și doar genotipurile nr.2 (FL1), 7(FL9) și 12(FL 14) prezintă câte un fragment polimorfic de aproximativ 1400 pb ce lipsește atât la genotipul inițial (treck-ul 1), cât și la celelalte forme.

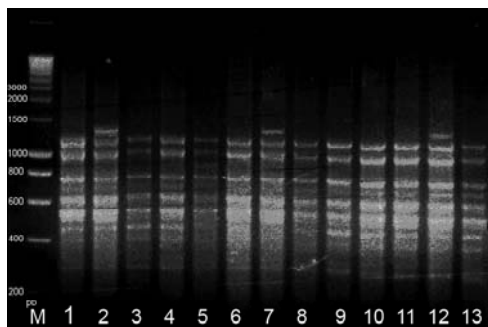


Fig.1. Electroforegrama produselor de amplificare RAPD al formelor M_6 de năut cu utilizarea primerului P3.

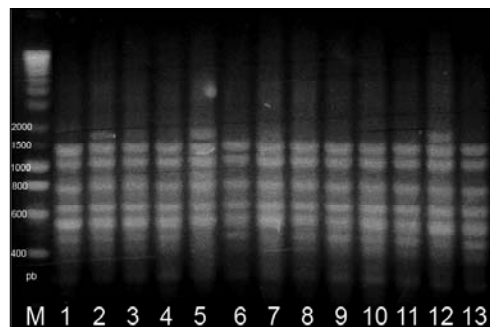


Fig.2. Electroforegrama produselor de amplificare RAPD al formelor M_6 de năut cu utilizarea primerului P6.

M – marcher „Smart” cu diferite dimensiuni de greutate;
 1 – ADN genotip inițial (linia 2/98); 2 – 13 ADN forme M_6 .

În cazul utilizării primerului P6 au fost obținute câte 8-10 fragmente de amplificare pentru fiecare genotip (Fig.2). Și în acest caz se constată un model asemănător de amplificare pentru majoritatea probelor studiate, 9 benzi de amplificare (90%) fiind identice pentru toate genotipurile studiate, cu excepția probei 5, la care se constată lipsa unui fragment de aproximativ 500 pb, iar la 3 genotipuri – 2 (FL1), 5 (FL6), 12 (FL14), este prezent câte un fragment polimorfic de aproximativ 1700 pb, care lipsește la celelalte genotipuri studiate.

În rezultatul analizei RAPD efectuate cu utilizarea primerului P39 (Fig.3) au fost obținute câte 11-12 benzi de amplificare pentru fiecare genotip, dintre care 11 sunt identice la toate genotipurile studiate (91,6%), cu excepția numărului 6 (FL7), la care lipsește un fragment de aproximativ 550 pb, iar la genotipurile 12 și 13 a fost evidențiat un fragment polimorfic de aproximativ 1450 pb.

În cazul utilizării primerului P2 (Fig.4) au fost obținute câte 8-10 benzi de amplificare distincte pentru fiecare genotip, 9 (90%) dintre fragmentele amplificate fiind identice pentru toate genotipurile, cu excepția numărului 6, la care lipsește fragmentul de aproximativ 500 pb, iar la numerele 12 și 13 se poate observa câte un fragment polimorfic de aproximativ 1400 pb.

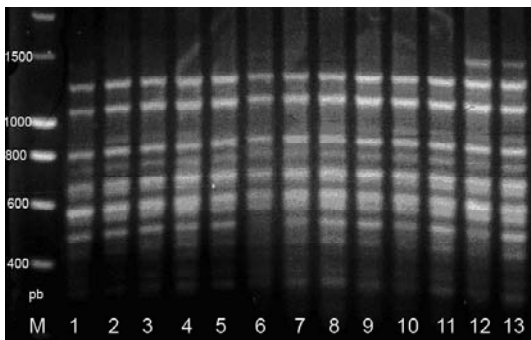


Fig.3. Electroforegrama amplificării RAPD al genotipurilor M_6 de năut la utilizarea primerului P39.

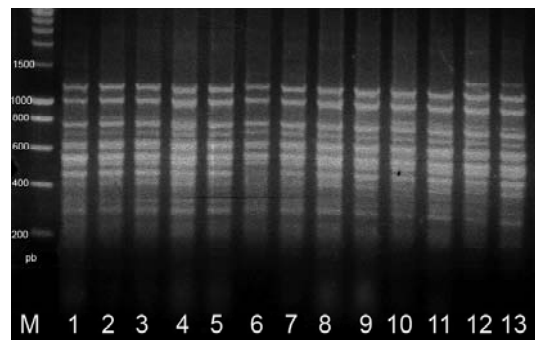


Fig.4. Electroforegrama produselor de amplificare RAPD al genotipurilor M_6 de năut cu utilizarea primerului P2.

Rezultatele obținute la folosirea primerilor P2 și P39 prezintă modele identice de amplificare pentru formele FL 14 (treck-ul 12) și FL15 (treck-ul 13); totodată, aceste 2 forme prezintă diferențe la amplificarea cu utilizarea primerilor P3 și P6. Conform observațiilor și măsurărilor biometrice, aceste forme au caractere morfofiziologice identice, de altfel în cadrul selecției în generațiile anterioare fiind presupuse a fi rezultatul aceleiași mutații sau al unei erori în timpul selecției și amplasării experiențelor în câmp. Astfel că, dacă nu ar fi fost evidențiată diferența conținutului de proteine în boabe, în generația M_5 , ar fi fost eliminată una din ele la aceste 2 forme. De asemenea, formele FL6 (treck-ul 5) și FL7 (treck-ul 6) din punctul de vedere al caracterelor morfofiziologice prezintă asemănări mari între ele, ambele fiind forme tardive și cu morfologia modificată a frunzelor. Rezultatele analizei RAPD la aceste două forme demonstrează diferențe ale modelului de amplificare la utilizarea diferiților primeri.

Concluzii

În urma încercării primerilor la RAPD P2, P3, P6 și P39, au fost obținute spectre polimorfice pentru ADN genomic la forme M_6 de năut. Utilizarea acestor primeri permite obținerea unui număr de 9-12 apliconi pentru fiecare genotip studiat, peste 91% dintre fragmentele de amplificare fiind identice pentru toate formele studiate. Totuși, au fost evidențiate fragmente de amplificare specifice pentru unele genotipuri. De menționat că la utilizarea unui anumit primer a fost obținut câte un singur fragment polimorf de amplificare pentru un genotip dat, ce poate corespunde unei diferențe discrete la nivelul secvențelor de ADN. La două dintre formele M_6 studiate (FL6 și FL7) s-a demonstrat absența a câte unui locus de amplificare în cazul utilizării primerilor P2, P6 și P39. Spectrele de apliconi obținuți în urma analizei RAPD indică la existența unor diferențe individuale la nivelul secvențelor de ADN la formele studiate. Astfel, la formele luate pentru cercetare s-a constatat că în urma tratamentului cu raze γ au fost induse modificări mici la nivelul materialului genetic al formelor studiate, care au afectat doar anumite sectoare ale secvențelor ADN al genotipurilor inițiale, cea mai mare parte a căreia s-a păstrat intactă.

Primerii utilizați nu au permis de a evidenția spectre polimorfice la toate formele cercetate. Totuși, ei au permis de a evidenția diferențe ale modelelor de amplificare la forme foarte apropiate după caracterele morfofiziologice și biochimice studiate anterior.

Referințe:

1. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. - Ленинград, 1964.
2. Awkland A.K. Breeding chickpea at ICRISAT; Induced Mutat. Improv. // Grain Legumes South East Asia, Vinoa. - 1977. - P.139-140.
3. Celac V., Budac A. Realizări și perspective în genetica și ameliorarea plantelor leguminoase pentru boabe // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. - 2002. - Nr.3(288) - P.70-78.
4. Brunner H. Radiation Induced Mutations for Plant Selection // Applied Radiation and Isotopes. - 1995. - Vol.46. - No6. - P.589-594.
5. Celac V. Efectul iradierii cu raze Gama asupra semințelor de năut (*Cicer arietinum L.*) în generațiile M_1 și M_2 . - În: Cercetări radiaționale în Republica Moldova (Materialele Conferinței internaționale științifico-practice). - Chișinău, 2000.
6. Cliciuc D. Obținerea mutațiilor utile la năut (*Cicer arietinum L.*) prin tratarea semințelor cu raze gamma. - În: Cercetări de genetică vegetală și animală, vol. IX, Fundulea, 2006, p.105-117.
7. Sorvaliya V.M., Goyal S.N. Corelations and causations in chickpea (*C.arietinum L.*) // Gujarat Agr. Univ. Res. J.-1994. - Vol.20. - No1. - P.66-69.
8. Singh V., Singh F. Selection criteria for yield in chickpea (*C.arietinum L.*) // Indian J. Agr. Sc. - 1989. - Vol.59. - No1. - P.32-35.
9. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acids Research. - 1990. - Vol.18. - No22. - P.6531-6535.
10. Захаров И.А., Никифоров В.С., Степанюк Е.В. // Гомология и эволюция генных порядков // Генетика. - 1997. - Том 33. - №1. - С.31-39.
11. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acids Research. - 1990. - Vol.18. - No22. - P.6531-6535.
12. Ibidem.
13. Ковеза О.В., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А., Гостимский С.А. // Выявление и картирование полиморфных RAPD - маркеров генома гороха (*Pisum sativum L.*) // Генетика. - 2005. - Том 3. - С.341-348.
14. Кокаева З.Г., Боброва В.К., Петрова Т.В. Генетический полиморфизм сортов, линий и мутантов гороха по данным RAPD - анализа // Генетика. - 1998. - Том 34. - №6. - С.771-777.
15. Celac V. Efectul iradierii cu raze Gama asupra semințelor de năut (*Cicer arietinum L.*) în generațiile M_1 și M_2 . - În: Cercetări radiaționale în Republica Moldova (Materialele Conferinței internaționale științifico-practice). - Chișinău, 2000.
16. Cliciuc D. Obținerea mutațiilor utile la năut (*Cicer arietinum L.*) prin tratarea semințelor cu raze gamma. - În: Cercetări de genetică vegetală și animală, vol. IX, Fundulea, 2006, p.105-117.
17. Ковеза О.В., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А., Гостимский С.А. // Выявление и картирование полиморфных RAPD-маркеров генома гороха (*Pisum sativum L.*) // Генетика. - 2005. - Том 3. - С.341-348.
18. Кокаева З.Г., Боброва В.К., Петрова Т.В. Генетический полиморфизм сортов, линий и мутантов гороха по данным RAPD - анализа // Генетика. -1998. - Том 34. - №6. - С.771-777.

Prezentat la 6.06.2008