

POLIMORFISMUL RAPD-PCR LA PLANTELE GENULUI MENTHA

Maria DUCA*, **Angela PORT***, **Svetlana REZINCIUC**, **Steliana CLAPCO***,
Vasile CIOBANU, **Maria PISOV**

Catedra Biologie Vegetală

**Centrul universitar de Biologie Moleculară, UnAȘM*

In this study, the genetic diversity of one wild-growing form of *Mentha spicata* and four hybrids from the collection of mint of Moldova State University has been evaluated with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. The highest level of molecular polymorphism was ascertained in wild-growing *Mentha spicata*. These results are important for the exploitation of new genetic materials of *Mentha* in plant amelioration and selection of genotypes with superior quality.

Valorificarea acelorasi linii parentale pentru obtinerea formelor hibride are ca efect epuizarea germoplasmei, corelată cu diverse efecte negative. În acest context, un obiectiv prioritar al amelioratorilor constă în diversificarea și conservarea germoplasmei prin utilizarea unui număr mai mare de genotipuri în calitate de linii parentale, fapt ce determină atât sporirea productivității, cât și o creștere a rezistenței formelor hibride la condiții nefavorabile, boli și dăunători [3-6].

Explorarea efectului de heterozis depinde în primul rând de cunoașterea fondului genetic disponibil și de selectarea formelor cu capacitate combinativă înaltă, care ar genera caractere noi valoroase. Surse de gene de interes cu un aport major în sporirea calității plantelor cultivate sunt formele spontane.

Speciile de *Mentha* prezintă interes economic ca materie primă pentru obținerea uleiurilor esențiale cu vaste aplicări practice (industria alimentară și cosmetică, farmaceutică, medicină) [10,13,14,18]. Ele sunt caracterizate printr-o variabilitate morfologică și biochimică impunătoare, producând o largă varietate de monoterpene specifice (carvonă, dihidrocarvonă, mentonă, mentol, linalol și linalilacetat), în diferite proporții și combinații [1,7,8,11,12]. Cunoașterea variabilității moleculare a plantelor de mentă este fundamentală pentru a obține resurse genetice noi, necesare selecției de genotipuri de calitate superioară.

O metodă rapidă și relativ simplă de identificare a variabilității genetice este tehnica RAPD (Random amplified polymorphic DNA) [3,4,6,16,17].

Scopul prezentei lucrări constă în relevarea unor particularități genetice specifice prin analiza polimorfismului RAPD-PCR la diverse genotipuri de mentă.

Material și metode

În calitate de material biologic au servit cinci genotipuri de mentă: *Mentha spicata* – întâlnită spontan în regiunea raionului Ialoveni (Mileștii Mici) și patru forme hibride, notate convențional – La-21 (selectată din descendența generativă F₁ a *M. longifolia*), MS41-M4 (*M. sachalinensis* x *M. incana*), 120-11 [(*M. piperita* F₃ x *M. incana*)F₂] și 11P-310 [(*M. sachalinensis* x *M. royleana*)F₂ x *M. piperita* F₃ x *M. spicata*].

ADN-ul a fost izolat din materialul vegetal în azot lichid, cu DNazol (Gibco BRL) conform protocolului propus de producător. Conținutul a fost cuantificat prin electroforeză și măsurare spectrofotometrică [9].

Mediul de reacție PCR (25μl) a inclus: 50 ng ADN, dNTP, 200μM de fiecare tip, 1 μM de primer (decameri, MWG-Biotech AG, Germania), 1,25 unități/pe reacție GoTaq Flexi ADN-polimeraza în soluția tampon corespunzătoare cu pH 8,5 și MgCl₂ 2,5 mM. Programul de amplificare: denaturarea la 95°C – 3 min. urmată de 45 cicluri: 95°C – 1 min., 36°C – 1 min., 72°C – 2 min. și elongarea finală 72°C – 5 min. Ampliconii au fost analizați prin electroforeză în gel de agaroză 1,6% în prezența bromurii de etidiu 0,5 μg/ml în soluție tampon de migrare 1x TAE la intensitatea de 93 V în camera de electroforeză Biocom (Rusia). Pentru determinarea maselor moleculare relative ale produselor de amplificare au fost utilizate probe cu martori – 100 bp DNA Ladder (Promega). Ampliconii obținuți au fost notați conform primerului asociat cu dimensiunea ampliconului, de ex.: P36₈₀₀ – amplicon de 800 pb obținut în rezultatul PCR-ului cu primerul P36. Au fost utilizați șapte primeri arbitrari cu un conținut înalt al bazelor G și C de 60–90%: P28 (GACCGCTTGT), P36 (CCGAATTCGC), P37 (CTGACCAGCC), P44 (GGACCCCGCC), P46 (GGTTGGGGAG), P48 (GCGGTGCTCG), P49 (GACAGCCTA).

Rezultate și discuții

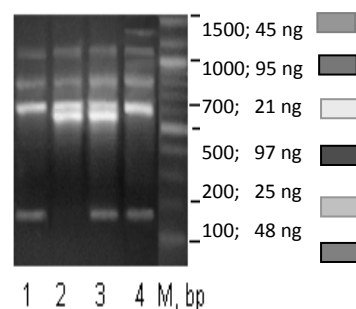
Analiza produselor RAPD cu primerii: P28, P36, P37, P44, P46, P48 și P49 a pus în evidență profile electroforetice heterogene atât după greutatea moleculară a ampliconilor, cât și după intensitatea fluorescenței, sugerând cantități diferite ale produsului de amplificare. Primerii testați au generat un număr variabil de ampliconi (Fig. 1,2).

Analiza spectrelor RAPD cu primerul P28: 5'-GACCGCTTGT-3' a pus în evidență atât benzi polimorfe, cât și benzi nespecifice, cu o fluorescență variată și cu o masă diferită a produselor de amplificare (Fig. 1A). Profilul genotipurilor studiate în urma reacției PCR a generat 17 ampliconi cu lungimi de 180-1300 pb și cu o masă de 95-21 ng. Astfel, la toate genotipurile analizate s-au obținut 3 benzi comune (P28₁₀₀₀, P28₉₀₀, P28₇₀₀), două dintre care de o fluorescență medie și, respectiv, o bandă cu fluorescență mare.

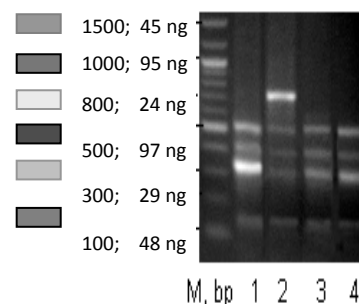
Genotipul La-21 se caracterizează printr-o bandă polimorfă cu o fluorescență medie (P28₁₃₀₀). Restul 16 produse de amplificare cu acest primer au prezentat un polimorfism estimat prin prezența/absența și cantitate.

A.

P28: 5'-GACCGCTTGT-3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp
				1300
				1000
				900
				700
				600
				180

**B.**

P36: 5'-CCGAATTCGC-3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp
				700
				500
				400
				300
				180

**C.**

P37: 5'-CTGACCAGCC-3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp
				1000
				900
				800
				700
				600
				500
				400
				300
				200
				100

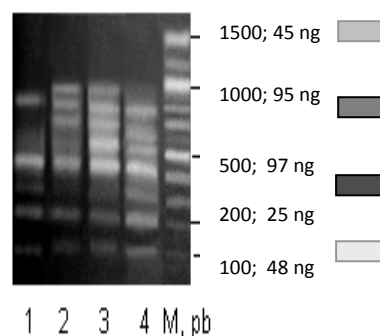


Fig.1. Profilul electroforetic generat de primerii P28 (A), P36 (B), P37 (C) și reprezentarea schematică RAPD.

Spectrele electroforetice obținute în rezultatul PCR cu primerul P36 5'-CCGAATTCGC-3' au prezentat un polimorfism mai pronunțat (Fig. 1B). Acest primer a generat 17 componente polinucleotidice cu dimensiuni de 180-700 pb, variabili după intensitate, cu o masă de 21-97 ng. Benzile P36₅₀₀, P36₄₀₀ și P36₃₀₀ la *M. spicata* au intensitatea maximă a fluorescenței, în cazul 11P-310 și La-21 intensitatea fluorescenței este medie, iar la MS41-M4 – minimă. Primerul P36 conține o bandă P36₁₈₀ cu o fluorescență medie comună pentru toate genotipurile și, în cazul genotipului MS4-MS4, o bandă polimorfă P36₇₀₀ cu o fluorescență mare.

La PCR cu primerul P37: 5'-CTGACCAGCC -3' s-a determinat un polimorfism mai pronunțat (Fig. 1C). Acest primer a generat 33 componente polinucleotidice cu dimensiuni de 100-1000 pb, variabili în conținut și cu o masă de 21-97 ng. Profiluri RAPD ale primerului P37 au demonstrat cinci produși de amplificare comuni cu o intensitate și masă diferită: P37₁₀₀, P37₂₀₀, P37₃₀₀, P37₄₀₀ și P37₈₀₀. Genotipurile MS41-M4 și 11P-310 au 4 benzi comune identice după intensitatea fluorescenței și a masei (P37₇₀₀, P37₈₀₀, P37₉₀₀ și P37₁₀₀₀). Un tablou analog se urmărește în cazul genotipurilor La-21 și 11P-310 care au o bandă comună (P37₆₀₀). Pentru genotipurile 11P-310 și La-21 este caracteristică banda P37₅₀₀ cu intensitate maximă, iar pentru genotipul MS41-M4 – aceeași bandă cu o intensitate medie.

Spectrele electroforetice obținute în rezultatul PCR cu primerul P44: 5'-GGACCCCGCC -3 au prezentat un polimorfism mai puțin pronunțat (Fig. 2A). Acest primer a generat 12 componente polinucleotidice cu dimensiuni de 150-400 pb variabili în conținut și cu o masă de 25-38 ng.

Analiza spectrelor RAPD a genotipurilor studiate cu primerul P44 a pus în evidență separarea a două benzi electroforetice polimorfe P44₄₀₀ și P44₃₀₀ la *M. spicata* și la MS41-M4, precum și două benzi nespecifice prezente la toate genotipurile studiate. Toate benzile obținute au aceeași intensitate a fluorescenței.

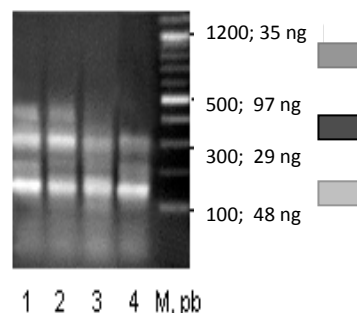
Primerul P46: 5'-GGTTGGGGAG -3' a generat trei benzi nespecifice cu o intensitate a fluorescenței variată (Fig. 2B). La genotipul *M. spicata* este prezentă o bandă polimorfă caracteristică doar acestui genotip.

În cazul analizei spectrelor electroforetice generate de primerul P48: 5'-GCGGTGCTCG -3' se observă benzi cu o fluorescență variată (Fig. 2C). Trei benzi dintre cele generate sunt caracteristice tuturor genotipurilor, doar că au o fluorescență diferită. Cel mai polimorf este genotipul *M. spicata*, având trei benzi polimorfe. Genotipurile La-21 și MS 41-M4 au generat câte o bandă polimorfă.

La analiza spectrelor electroforetice generate de primerul P49: 5'-GACAGCCTA -3' s-au relevat patru benzi nespecifice cu o fluorescență variată: mare, medie și mică, în total 19 (Fig. 2D). Banda P49₆₀₀ prezentă la toate genotipurile are intensitatea fluorescenței mare, benzile P49₂₀₀ și P49₁₀₀ au intensitatea benzilor medie și mică. Banda P49₅₀₀ a fost înregistrată la trei genotipuri, cu excepția MS41-M4.

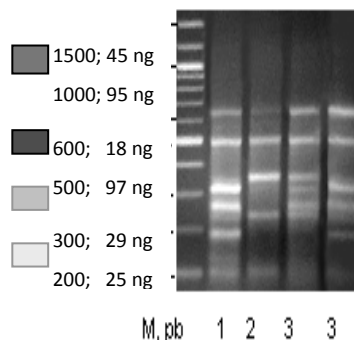
A.

P44: 5'-GGACCCCGCC -3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp/m
				400
				300
				200
				150



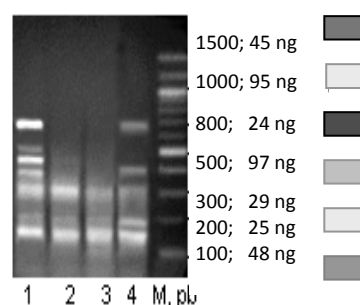
B.

P46: 5'-GGTTGGGGAG -3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp/m
				600
				5007
				420
				300
				280
				260
				200
				150
				100



C.

P48: 5'- GCGGTGCTCG -3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp/m
				700
				500
				450
				400
				300
				200
				150
				100



D.

P49: 5'- GACAGCCTA -3'				
<i>M. spicata</i>	MS41-M4	11P-310	La-21	Mr, bp/m
				600
				500
				450
				200
				100

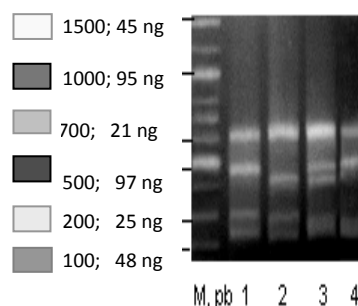


Fig.2. Profilul electroforetic generat de primerii P44 (A), P46 (B) P48 (C), P49 (D) și reprezentarea schematică RAPD: M – martor; 1 – *M. spicata*; 2 – MS41-M4; 3 – 11P-310; 4 – La-21.

Generalizând rezultatele obținute, putem constata că nivelul polimorfismului diferă de la un genotip la altul, cel mai înalt grad al diversității genetice înregistrându-se la forma spontană *Mentha spicata*. Conform numărului total de ampliconi nespecifici, cei mai informativi sunt primerii P36, P37 și P48.

Referințe:

- Al-Rawashdeh I. Molecular Taxonomy Among *Mentha spicata*, *Mentha longifolia* and *Ziziphora tenuior* Populations using the RAPD Technique // *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2011, vol.4, no 2, p.63-70.
- Duca M., Savca E., Port A. Fiziologia vegetală. Tehnici speciale de laborator. -Chișinău, 2001.
- Fenwick A.L., Ward S.M. Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Cultivar Identification in Mint // *Hortscience*, 2001, vol. 36, p.761-764.
- Jeya Prakash S.P., Biji K.R., Michael Gomez S., Ganesa Murthy K. Genetic diversity analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L Moench) accessions using RAPD markers // *Indian J. Crop Science*, 2006, vol.1, no 1-2, p.109-112.
- Kumar P., Gupta V., Misra A. et al. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology // *Plant Omics Journal*, 2009, vol.2, no 4, p.141-162.
- Leal A.A., Mangolin C.A. et al. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines // *Genet. Mol. Res.*, 2010, vol. 9, no 1, p.9-18.
- Massimo M. Plasticity and genotypic variation in some *Mentha × verticillata* hybrids // *Biochemical Systematics and Ecology*, 1990, vol.8, no 7-8, p.493-502.
- Mosnyanski S., Ball T., Sink K. Somatic hybridization in mint: identification and characterization of *Mentha piperita x M. spicata* hybrid plants // *Theor. Appl. Genet.*, 1998, vol.96, p.683-687.
- Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. II. 3th edition. - New-York, 2001.
- Sharafi S., Rasooli I., Owlia P. et al. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials // *Pharmacogn. Mag.*, 2010, vol.6, no 23, p.147-153.
- Shasany A.K., Darokar M.P., Dhawan S., Gupta A.K., Gupta S., Shukla A.K., Patra N.K., Khanuja S.P.S. Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of *Mentha* // *Journal of Heredity*, 2005, vol.96, no 5, p.542-549.

12. Shinwari Zabta Khan, Sidra Sultan, Tariq Mahmood. Molecular and morphological characterization of selected mentha species // Pak. J. Bot, 2011, vol.43, no 3, p.1433-1436.
13. Soković M., Vukojević J., Marin P., Brkić D., Vajs V. Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities // Molecules, 2009, vol.14, p.238-249.
14. Sousa P., Linard C., Azevedo-Batista D., Oliveira A.C. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice // Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2009, vol. 42, p.655-659.
15. Sutour S., Bradesi P., Casanova J., Tomi F. Composition and chemical variability of *Mentha suaveolens ssp. suaveolens* and *M. suaveolens ssp. insularis* from Corsica // Chem. Biodivers., 2010, vol.7, no 4, p.1002-1008.
16. Verma N., Koche V., Tiwari K.L., Mishra S.K. RAPD analysis reveals genetic variation in different populations of *Trichodesma indicum* – A perennial medicinal herb // African Journal of Biotechnology, 2009, vol.8, no 18, p.4333-4338.
17. Williams J., Kubelik A. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acid, 1990, p.6220–6229.
18. Zineb E. et al. GC/MS Analysis and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Mentha Pulegium* // Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010, vol.6, no 3, p.191-198,

Prezentat la 07.07.2012