

VARIABILITATEA GENETICĂ INTRASPECIFICĂ LA SALVIA SCLAREA L.

Rodica MARTEA, Irina DOROȘ, Alexandru MANOLE

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

Analiza spectrelor electroforetice obținute în rezultatul PCR cu primerul RAPD - A3 pentru 28 genotipuri de salvie a permis constatarea unei heterogenități înalte a materialului ameliorativ studiat, care reflectă structura genotipică complexă a liniilor și hibridurilor incluse în cercetare. La nivelul genomului de salvie, cea mai înaltă frecvență a fost relevată în cazul fragmentelor A3₅₅₀, A3₇₅₀, A3₇₀₀ și A3₁₀₅₀. În același timp, o frecvență scăzută s-a atestat în cazul ampliconilor A3₄₀₀, A3₆₅₀, A3₈₀₀ și A3₁₄₅₀. În cadrul cercetării au fost evidențiate 4 ampliconi (A3₄₀₀, A3₄₅₀, A3₆₅₀ și A3₁₄₅₀) specifici hibridului [(K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄ x (0-57S5 x 0 - 21S4)F₈] F₂ și ampliconul A3₁₇₅₀ specific hibridului [(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇ x Cr.p. 160 S11] F₁, care ulterior pot fi utilizați în elaborarea markerilor moleculari.

Cuvinte-cheie: diversitate genetică, RAPD-A3, Salvia sclarea L.

INTRASPECIFIC GENETIC VARIABILITY OF SALVIA SCLAREA L.

Analysis of electrophoretic spectrum of RAPD - A3 primer for 28 genotypes of sage, has revealed a high heterogeneity, reflecting genotypic structure lines and hybrids included in the research. The highest frequency was observed for A3₅₅₀, A3₇₅₀, A3₇₀₀ și A3₁₀₅₀ amplicons, also, the low frequency in the case of A3₄₀₀, A3₆₅₀, A3₈₀₀ și A3₁₄₅₀ amplicons. The [(K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄ x (0-57S5 x 0 - 21S4)F₈] F₂ reveals 4 specific amplicons (A3₄₀₀, A3₄₅₀, A3₆₅₀ și A3₁₄₅₀) and one specific amplicons - A3₁₇₅₀ for [(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇ x Cr.p. 160 S11] F₁, which can then be used to develop molecular markers.

Keywords: genetic diversity, RAPD-A3, Salvia sclarea L.

Introducere

Polimorfismul genetic reprezintă diferențele genetice care stau la baza variațiilor în cadrul speciilor. În acest aspect, organisme cu genotipuri individuale, care se deosebesc după o serie de calități distincte, coexistă în cadrul unei populații, în calitate de membri egali. În practică este dificil să se cunoască frecvența cu care este menținută o anumită alelă prin mutație. Se consideră că există un polimorfism, dacă cea mai comună alelă pe un locus are o frecvență < 99%.

Utilizarea markerilor moleculari în ameliorare, inițial a proteinelor, iar mai târziu a ADN-ului, s-a dovedit a fi utilă în estimarea variabilității genetice [1]. Un marker genetic este un caracter cu transmitere ereditară cu alele ușor de cunoscut, care implică un polimorfism ce poate fi ușor detectabil [8]. Se consideră că markerii polimorfici sunt cei mai valoroși. Astfel, markerii moleculari au o importanță deosebită în aprecierea componentei ereditare a organismului și reprezintă principala forță motrice a ameliorării.

Analiza unui număr considerabil de loci în diferite regiuni ale genomului poate fi realizată prin analiza RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), care reprezintă o varietate a reacției PCR, cu utilizarea de primeri arbitrari. În general, se folosesc primeri cu 10 nucleotide și cu un conținut în GC de cel puțin 50%. Optimizarea protocolului RAPD poate fi o problemă dificilă; modificarea componentelor de reacție sau a programului utilizat la amplificare are consecințe imprevizibile [10].

Tehnica RAPD reprezintă o soluție relativ simplă și rapidă de relevare a variabilității genetice. RAPD este utilizat pentru screening-ul primar al materialului inițial de ameliorare [11] în scopul identificării de markeri moleculari, cu perspectivă în selecția caracterelor de interes economic [4,5]. În ultimul timp, metoda a fost folosită cu succes și în evidențierea polimorfismului intraspecific.

Markerii RAPD au un caracter dominant când sunt cercetați în descendență. Aceasta rezultă din faptul că un fragment amplificat este prezent în gel (ca o alelă dominantă A) sau absent (ca alelă recesivă a). În analiza descendenților, un fragment este observat în stare homozigotă (analog cu AA), fiind amplificat atât ADN-ul de la un părinte, cât și de la celălalt, sau în stare heterozigotă (analog cu Aa), când este amplificat numai ADN-ul provenit de la unul din părinți, celălalt prezentând un polimorfism caracterizat prin absența fragmentului. În stare heterozigotă, absența fragmentului de la unul din părinți este mascată de prezența benzii datorată fragmentului amplificat de la celălalt părinte. În cazul markerilor codominanți (în care fiecare părinte posedă o bandă distinctă, pe care celălalt nu o posedă), starea heterozigotă (AB) în descendență (prezența ambelor benzi în F₁) poate fi deosebită de stările homozigote (AA) și (BB) [2]. Cercetările au demonstrat că

95% din fragmentele RAPD se comportă ca markeri dominanți (un singur fragment amplificat distinctiv la unul sau la ambii părinți și descendenți) și sub 5% se comportă ca markeri codominanți [12].

În lucrarea de față s-a propus ca scop relevarea particularităților genetice pentru un șir de linii consanguinizate și hibridi de *Salvia sclarea* L. din colecția de plante medicinale și aromatice a IGFP, AȘM, prin aplicarea metodei RAPD-PCR.

Material și metode

Materialul de studiu reprezintă 13 hibridi de *Salvia sclarea* L. și formele parentale ale acestora [6]. Genotipurile au fost oferite de Centrul Genetica și Ameliorarea Plantelor Aromatice și Medicinale de la Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, AȘM.

Extracția ADN-ului din frunzulițe de salvie s-a realizat după metoda standard (CTAB). Amplificarea a fost efectuată cu primerul RAPD - A3 (5' CCCGTCAGCA 3') [7]. Aceasta s-a realizat într-un mediu de 15 μl, cu compoziția: 50 ng ADN, 200 μM dNTP de fiecare tip, 0,4 - 0,6 μM primer, 1 unități/pe reacție Dream Taq DNA Polymerase, în soluție tampon corespunzătoare și 2,5 mM MgCl₂ [7].

Pentru amplificare a fost utilizat următorul program [6]:

- predenaturare – 3 minute la 95°C, urmată de 35 de cicluri, fiecare incluzând etapele:
 - ✓ denaturare – 45 secunde la 95°C
 - ✓ fixarea primerilor – 1 minut la 34-36°C
 - ✓ extensie – 1 minut la 72°C
- extensia finală – 5 minute la 72°C.

Ampliconii s-au evidențiat prin electroforeză în gel de agaroză 1,4% și au fost notați conform primerului, asociat cu dimensiunea ampliconului.

Rezultate și discuții

În procesul de obținere a hibridilor cu productivitate înaltă, evaluarea polimorfismului genetic prezintă o importanță deosebită în scopul aprecierii diversității genetice și descrierii formelor parentale. Analiza RAPD a formelor cercetate a permis constatarea heterogenității materialului ameliorativ după numărul de locus-uri, dimensiune și conținut. Benzile polimorfe depistate la formele investigate, în baza primerilor arbitrari testați, pot fi analizate în scopul elaborării unor markeri moleculari pentru identificarea acestor genotipuri [4].

Dintre cele 28 genotipuri cercetate, primerul A3 a pus în evidență produse ale amplificării în cazul a 18 genotipuri, 9 hibridi și 10 forme parentale (Tab.1).

Tabelul 1

Rezultatele amplificării cu RAPD-A3 la formele cercetate

Nr. d/o	Primerul A3	Nr. benzi	Benzi atestate																	
			2100	2000	1750	1600	1500	1450	1050	950	850	800	750	700	650	550	500	450	400	350
FORME PARENTALE																				
1.	(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F ₇	11	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
2.	(M-55+130S4 x (K-44 x L-15)F ₂ x 0-47)F ₆	8	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
3.	(0-57S5 x 0-21S4)F ₈	6	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
4.	Cr.p. 11 S11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5.	Cr.p. 160 S11	6	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
6.	(K-36 x 0-41)F ₂₀₋₁₉ F ₁ x L-15)B ₅	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7.	(M-69 429-82 S3 x 0-40 S5)F ₇	9	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
8.	(K-50)F ₅ x S 1122(102+113)F ₂ x K-43)F ₄	12	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
9.	(K-36 x 0-41)F ₂ x 0-19)F ₁ x 0-22)B ₄ x L-15)	7	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
10.	(S-1122 528 S3 x (Rubin x S-786)F ₁ x (0-33 S3 x L-15)F ₇)F ₇	10	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1

		HIBRIZI																			
1.	[S.s.Turkmen/N S7 x (K-36 x0-41) F ₂ x 0-19)F ₁ x 0-22) B4 x L-15)F ₈] F ₁	7	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
2.	[S.s.Turkmen/N S7 x (S-1122 528 S3 x K-50) F ₁ x 0-48)F ₆] F ₁	6	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
3.	[S.s.Turkmen/N S7 x (Rubin x S1122 9S3)F ₁ x (0-56 x V-24) F ₁)] F ₇	5	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
4.	[(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F ₇ x (S1122 528S3 x S.s.Tian-Shan/sud) F ₅ x S.s.Tian-Shan/sud)B5]F ₁	6	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
5.	[(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F ₇ x Cr.p. 160 S11] F ₁	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6.	[M-69 655 S9 x (K-36 x0-41)F ₂₀₋₁₉)F ₁ x L-15)B5] F ₁	5	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
7.	[Cr.p. 11 S11 x (S.s.Turkmen/N S7) F ₁	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
8.	[(K-36 x 0-41) F ₂ x 0-19)F ₁ x 0-22) B4 x L-15)] F ₇ x (M-44S4 x L-15) F ₁ x L-15)] B6] F ₂	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
9.	[(K-50)F ₅ x S 1122(102+113)F ₂ x K-43)F ₄ x (0-57S5x0-21S4)F ₈] F ₂	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0

Numărul cel mai mare de ampliconi, în cadrul liniilor parentale, s-a constatat la (K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄, în cazul hibridilor la [S.s.Turkmen/N S7 x (K-36 x 0-41) F₂ x 0-19)F₁ x 0-22) B4 x L-15)F₈]F₁. Astfel, dintre fragmentele analizate, cea mai mare frecvență o prezintă ampliconii A₃₅₀, A₃₇₀₀, A₃₇₅₀, A₃₉₅₀ și A₃₁₀₅₀.

Un număr scăzut de fragmente de amplificare este atestat la hibridii [(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇ x Cr.p. 160 S11]F₁, [M-69 655 S9 x (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15)B5]F₁ și [(K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄ x (0-57 S5 x 0-21 S4)F₈]F₂. Aceste rezultate ar putea fi explicate prin faptul că majoritatea regiunilor amplificate de primerul A3 prezintă un caracter de tip codominant [3].

O particularitate deosebită a fost determinată de apariția a două benzi specifice (800 pb): prima în cazul hibridului [S.s.Turkmen/N S7 x (K-36 x 0-41)F₂ x 0-19)F₁ x 0-22) B4 x L-15)F₈] F₁ și a doua bandă specifică (400 pb) prezintă la forma parentală (K-36 x 0-41)F₂ x 0-19)F₁ x 0-22) B4 x L-15) F₈, care ulterior pot fi utilizați în elaborarea markerilor moleculari.

Rezultate complexe integrale au fost relevate pentru 3 grupuri genetice, care includ hibridii: [(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇ x Cr.p. 160 S11]F₁, [M-69 655 S9 x (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15)B5]F₁, [(K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄ x (0-57 S5 x 0-21 S4)F₈]F₂ și formele lor parentale. Acestea au fost cercetate sub aspectele privind polimorfismul genetic, moștenirea produselor de amplificare, precum și distanța genetică.

Polimorfismul genetic. Profilul hibridilor de salvie și al formelor parentale ale acestora, obținut cu primerul A3, a prezentat 18 ampliconi, care au fost puși în evidență de spectre electroforetice heterogene atât după dimensiune, care se includ în limita de valori ale greutateii moleculare 350-2100 pb, cât și după intensitatea fluorescenței, aceasta sugerând cantități diferite ale produsului de amplificare (Tab.1).

În baza analizei spectrelor electroforetice se constată că un nivel înalt al diversității genetice este atestat în cazul genotipului matern (V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇, M-69 655 S9 și patern (Cr.p. 160 S11, (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15)B5, (0-57 S5 x 0-21S4)F₈) – criteriu important în formarea combinațiilor hibride de perspectivă.

Rezultatele pentru hibridul [(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇ x Cr.p. 160 S11] F₁ și formele parentale prezintă 13 ampliconi cu masa moleculară de 350-2100 pb – linia maternă relevă 11 benzi, forma paternă – 6 benzi și F₁ – 2 ampliconi. A fost obținut un fragment specific de 1750 pb.

Analiza RAPD a hibridului [M-69 655 S9 x (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15)B5] F₁ și a formelor parentale a determinat prezența a 11 ampliconi cu masa moleculară cuprinsă între 450 și 2100 pb. Linia maternă prezintă 7 fragmente, un total de 3 benzi sunt în cazul formei paterne, hibridul – 5 ampliconi. La linia paternă lipsesc fragmentele de 160, 650, 500 și 450 pb, prezente la genotipul matern, iar la forma F₁ lipsesc componenții electroforetici de 1050 și 700 pb, prezenți la părinți.

Hibridul [(K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄ x (0-57 S5 x 0-21 S4)F₈] F₂ și formele sale parentale se caracterizează prin 14 componente polinucleotidice cu dimensiuni de la 350 la 2000 pb, linia maternă relevă 12 benzi, forma paternă – 6 benzi și 2 ampliconi – hibridul analizat. La linia paternă au lipsit ampliconii de 2000, 1500, 1450, 650, 500, 450, 400 și 350 pb, prezenți la genotipul matern, iar la forma hibridă au lipsit fragmentele de 1050, 950, 850 și 700 pb prezente la părinți. S-au evidențiat 4 ampliconi specifici: A₃₄₀₀, A₃₄₅₀, A₃₆₅₀ și A₃₁₄₅₀.

Moștenirea ampliconilor. Produsele amplificării ADN evidențiate în spectrele electroforetice obținute au fost studiate în descendență, fiind evidențiat modul de moștenire a fragmentelor identificate.

Cadrul de moștenire pentru hibridul [(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F₇ x Cr.p. 160 S11] F₁ și a formelor parentale (Tab.2.) evidențiază la genotipurile formelor parentale ale hibridului 5 ampliconi comuni de 1050, 700, 550, 500 și 350 pb, dintre care niciunul nu este moștenit de hibrid.

Tabelul 2

Moștenirea produselor amplificării ADN la salvie, cu A3

♀	♂	F1	[(V-24-86 809 S3 x 0-33 S6)F ₇ x Cr.p. 160 S11] F ₁	M-69 655 S9 x (K-36 x 0-41) F ₂₀₋₁₉)F ₁ x L-15)B5] F ₁	[(K-50)F ₅ x S 1122 (102+113)F ₂ x K-43)F ₄ x (0-57 S5 x 0-21 S4)F ₈] F ₂
+	+	-	5	2	4
-	-	+	1	4	0
+	-	+	1	0	0
-	+	+	0	0	2
+	-	-	5	4	8
-	+	-	1	0	0
+	+	+	0	1	0

Linia paternă prezintă lipsa fragmentului A₃₇₅₀, prezent la forma maternă, care a fost moștenit în F₁. De asemenea, în cazul liniei paterne au lipsit ampliconii de 2100, 2000, 1600 și 1500 pb, prezenți la genotipul matern. În același timp, hibridul a moștenit ampliconul A₃₈₅₀ de la forma paternă, acest fragment nefiind observat la linia maternă. De asemenea, se relevă ampliconul A₃₁₇₅₀, care nu este prezent la niciuna dintre formele parentale, dar care se manifestă la forma hibrid.

În cazul hibridului [M-69 655 S9 x (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15)B5] F₁ s-au identificat 2 fragmente de 1050 și 700 pb prezente la ambele forme parentale, care nu au fost moștenite de hibrid. În același timp, fragmentul de 850 pb prezent la ambele forme parentale este moștenit și de hibrid, care evidențiază 4 fragmente noi ce lipsesc la părinți, și anume: A₃₂₁₀₀, A₃₁₅₀₀, A₃₇₅₀ și A₃₅₅₀.

Analiza RAPD a hibridului [(K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43)F₄ x (0-57 S5 x 0-21 S4)F₈] F₂ și a formelor parentale (Tab.2) arată lipsa a două fragmente – A₃₅₅₀ și A₃₇₅₀ – la linia maternă, acestea fiind prezente la forma paternă, care au fost moștenite de forma hibridă. În același timp, 4 fragmente – A₃₇₀₀, A₃₈₅₀, A₃₉₅₀ și A₃₁₀₅₀ – prezente la părinți nu au fost remarcate la hibridul analizat.

Distanța genetică. Rezultatele obținute cu primerul RAPD-A3 au relevat un polimorfism pronunțat, determinat atât de genotip, cât și de modul de transmitere în descendență a ampliconilor. Astfel, pentru descrierea complexă a formelor de salvie cercetate, au fost calculate matricele similarității genetice.

În continuare, în baza instrumentului *Unweighted Pairwise Group Method with Arithmetic mean – UPGMA* (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>) [9], matricele au fost examinate prin analiza clusteriană. UPGMA permite construcția dendrogramelor prin combinarea genotipurilor (grupurilor de genotipuri) în baza valorilor distanței genetice.

Datele obținute au fost utilizate la elaborarea dendrogramelor de repartiție a genotipurilor de salvie în baza produselor amplificării (Fig.1).

Metoda de analiză se bazează pe calcularea coeficientului Jaccard (Tanimoto).

Studiul relațiilor intraspecifice în baza ampliconilor evidențiați prin RAPD-PCR la hibridii de salvie a relevat prezența a 2 clustere de bază (Fig.1).

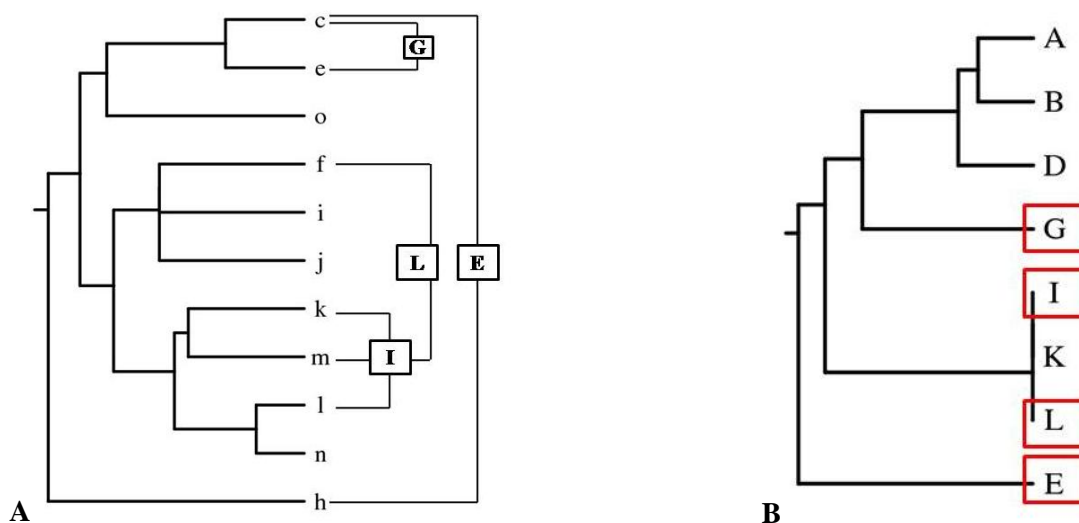


Fig.1. Dendrograma de repartiție a genotipurilor de salvie în baza produselor amplificării cu primerul RAPD-A3: (A) formele parentale, (B) hibrizi:

- c. $(V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7$
 e. $(M-55+130S4\ x\ (K-44\ x\ L-15)F_2\ x\ 0-47)F_6$
 f. $(0-57S5\ x\ 0-21S4)F_8$
 h. $(S1122\ 528S3\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)F_5\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)B_5$
 i. *Cr.p. 11 S 11*
 j. *Cr.p. 160 S11*
 k. $(K-36\ x\ 0-41)F_{20-19}F_1\ x\ L-15)B_5$
 l. $(M-69\ 429-82\ S3\ x\ 0-40\ S5)F_7$
 m. $(K-50)F_5\ x\ S\ 1122(102+113)F_2\ x\ K-43)F_4$
 n. $(K-36\ x\ 0-41)F_2\ x\ 0-19)F_1\ x\ 0-22)B_4\ x\ L-15)$
 o. $(S-1122\ 528\ S3\ x\ (Rubin\ x\ S-786)F_1\ x\ (0-33\ S3\ x\ L-15)F_7)F_7$

- A. $[S.s.Turkmen/N\ S7\ x\ (K-36\ x\ 0-41)\ F_2\ x\ 0-19)F_1\ x\ 0-22)B_4\ x\ L-15)F_8]F_1$
 B. $[S.s.Turkmen/N\ S7\ x\ (S-1122\ 528\ S3\ x\ K-50)\ F_1\ x\ 0-48)\ F_6]F_1$
 D. $[(V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7\ x\ (Rubin\ x\ S1122\ 9S3)F_1\ x\ (0-56\ x\ V-24)F_1)F_7]F_1$
 E. $[(V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7\ x\ (S1122\ 528S3\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)\ F_5\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)B_5]F_1$
 G. $[M-69\ 655\ S9\ x\ (S-1122\ 528\ S3\ x\ (Rubin\ x\ S-786)F_1\ x\ (0-33\ S3\ x\ L-15)\ F_7)\ F_7]F_1$
 I. $[M-69\ 655\ S9\ x\ (M-69\ 429-82\ S3\ x\ 0-40\ S5)F_7]F_1$
 K. $[(K-36\ x\ 0-41)\ F_2\ x\ 0-19)F_1\ x\ 0-22)B_4\ x\ L-15)]F_7\ x\ (M-44S4\ x\ L-15)\ F_1\ x\ L-15)]B_6]F_2$
 L. $[(K-50)F_5\ x\ S\ 1122(102+113)F_2\ x\ K-43)F_4\ x\ (0-57S5\ x\ 0-21S4)F_8]F_2$

Primul cluster este caracterizat prin prezența următorilor hibrizi: $[S.s.Turkmen/N\ S7\ x\ (K-36\ x\ 0-41)\ F_2\ x\ 0-19)F_1\ x\ 0-22)B_4\ x\ L-15)F_8]F_1$, $[S.s.Turkmen/N\ S7\ x\ (S-1122\ 528\ S3\ x\ K-50)\ F_1\ x\ 0-48)\ F_6]F_1$ și $[(V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7\ x\ (Rubin\ x\ S1122\ 9S3)F_1\ x\ (0-56\ x\ V-24)F_1)F_7]F_1$. Aceștia prezintă o similaritate genetică de 70-80%.

Clusterul 2 include $[M-69\ 655\ S9\ x\ (M-69\ 429-82\ S3\ x\ 0-40\ S5)F_7]F_1$, $[(K-36\ x\ 0-41)\ F_2\ x\ 0-19)F_1\ x\ 0-22)B_4\ x\ L-15)]F_7\ x\ (M-44S4\ x\ L-15)\ F_1\ x\ L-15)]B_6]F_2$ și $[(K-50)F_5\ x\ S\ 1122(102+113)F_2\ x\ K-43)F_4\ x\ (0-57S5\ x\ 0-21S4)F_8]F_2$, care prezintă o similaritate genetică de 100% (Fig.1).

În același timp, doi dintre hibrizi $[(V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7\ x\ (Rubin\ x\ S1122\ 9S3)F_1\ x\ (0-56\ x\ V-24)F_1)F_7]F_1$ și $[(V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7\ x\ (S1122\ 528S3\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)\ F_5\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)B_5]F_1$ sunt evidențiați în afara grupurilor obținute (Fig.1).

Rezultatele pentru liniile parentale de salvie au relevat prezența a 3 cluster (Fig.1).

Hibridul de prima generație $[M-69\ 655\ S9\ x\ (S-1122\ 528\ S3\ x\ (Rubin\ x\ S-786)F_1\ x\ (0-33\ S3\ x\ L-15)\ F_7)\ F_7]$ a demonstrat asemănări înalte cu formele sale parentale, ♀ $V-24-86\ 809\ S3\ x\ 0-33\ S6)F_7$ și ♂ $(S1122\ 528S3\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)F_5\ x\ S.s.Tian-Shan/sud)B_5$, care se evidențiază prin distanță genetică cea mai mare – 0,909, fiind situate la cea mai mare distanță.

Hibridul $[(K-50)F_5\ x\ S\ 1122(102+113)F_2\ x\ K-43)F_4\ x\ (0-57\ S5\ x\ 0-21\ S4)F_8]F_2$ prezintă asemănări înalte cu formele sale parentale, ♀ $(K-50)F_5\ x\ S\ 1122(102+113)F_2\ x\ K-43)F_4$ și ♂ $(0-57S5x0-21S4)F_8$. Acestea prezintă o distanță genetică de 0,7 și sunt evidențiate în cluster diferite.

Concluzii

Analiza spectrelor electroforetice ale ampliconilor RAPD-PCR la 28 genotipuri de salvie cu primerul RAPD-A3 a permis relevarea unei heterogenități înalte a materialului ameliorativ studiat.

Cel mai mare număr de fragmente de amplificare este pus în evidență la forma parentală $(K-50)F_5 \times S 1122 (102+113)F_2 \times K-43)F_4$, în cazul hibridizilor la $[S.s.Turkmen/N S7 \times (K-36 \times 0-41) F_2 \times 0-19)F_1 \times 0-22) B4 \times L-15)F_8]F_1$.

Cel mai mic număr de fragmente este atestat la hibridii $[(V-24-86 809 S3 \times 0-33 S6)F_7 \times Cr.p. 160 S11]F_1$, $[M-69 655 S9 \times (K-36 \times 0-41)F_{20-19})F_1 \times L-15)B5]F_1$ și $[(K-50)F_5 \times S 1122(102+113)F_2 \times K-43)F_4 \times (0-57 S5 \times 0-21 S4)F_8]F_2$. Aceste rezultate ar putea fi explicate prin faptul că majoritatea regiunilor amplificate de primerul A3 prezintă un caracter de tip codominant.

Au fost stabiliți 4 ampliconi RAPD ($A3_{400}$, $A3_{450}$, $A3_{650}$ și $A3_{1450}$) specifici hibridului $[(K-50)F_5 \times S 1122 (102+113)F_2 \times K-43)F_4 \times (0-57S5 \times 0 - 21S4)F_8]F_2$ și un amplicon – $A3_{1750}$, specific hibridului $[(V-24-86 809 S3 \times 0-33 S6)F_7 \times Cr.p. 160 S11]F_1$. Aceștia pot fi utilizați ulterior la elaborarea markerilor moleculari.

La nivelul genomului de salvie sunt evidențiați ampliconii $A3_{550}$, $A3_{750}$, $A3_{700}$ și $A3_{1050}$ cu cea mai înaltă frecvență. Ampliconii $A3_{400}$, $A3_{650}$, $A3_{800}$ și $A3_{1450}$ prezintă frecvență scăzută, sugerând în același timp asupra unui grad înalt de specificitate genotipică.

Bibliografie:

1. ARIF, I.A., BAKIR, M.A., KHAN, H.A. et al. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity, *Int. J. Mol. Sci.* 2010, no.11, p.2079-2096.
2. CARȘAI, T. C., VLAIC, A., COȘIER, V., BÂLTEANU, V.A. *Cercetări privind polimorfismul la locusul genei leptinei în scopul aplicării selecției asistate de markeri genetici la taurine*. ISBN 978-606-92029-6-8
3. DEVOS, K.M., GALE, M.D. The use of random amplified polymorphic DNA in wheat. In: *Theor. Appl. Genet.*, 1992, vol.84, p.567-572.
4. DUCA, M., CĂPĂȚANĂ, A., BARBACAR, N. Moștenirea ampliconilor ADN la diverse genotipuri de floarea-soarelui. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Seria „Științele vieții”*, 2006, nr.2, p.58-65.
5. DUCA, M., PORT, A., LEVIȚCHI, A. Characteristics of RAPD markers in breeding of *Cucumis sativus* L. In: *Roumanian Biotechnological Letters*, 2008, vol.13, no.4, p.3843-3850.
6. MARTEA, R. Evaluarea diversității genetice la *Salvia sclarea* L. în baza markerilor moleculari. În: *Simpozionul științific internațional „Agricultura modernă – realizări și perspective”* 9-11 octombrie, 2013, Chișinău. Lucrări științifice, 2013, vol.39, p.93. ISBN 978-9975-64-250-7. [631/635+574]:378.663(478-25)(082)=135.1=111=161.1 U 56
7. MARTEA, R., PORT, A., GONCEARIUC, M., DUCA, M. Estimarea diversității genetice la *Salvia sclarea* L. În: *Simpozionul național cu participare internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”*, 24-25 octombrie, 2013, Chișinău. Teze, 2013, p.164. ISBN 978-9975-56-7-111-2
8. NIU, L., MANTRI, N., LI, G. et al. Array-based techniques for fingerprinting medicinal herbs. In: *Chinese Medicine*, 2011, nr.6, p.18.
9. REGUANT, C., BORDONS, A. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. In: *J. Appl. Microbiol.*, 2003, no.95, p.344-353.
10. SAEZ, R., SANZ, Y., TOLDRA, F. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection on animal species in meat product. In: *Meat. Science*, 2004, no.66, p.659-665.
11. WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. In: *Nucleic Acids Res.*, 1990, vol.18, p.7213-7218.
12. WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res*, 1990, vol.18, nr.22. p.6531-6535.

Sincere mulțumiri și sentimente de recunoștință conducătorului științific Maria DUCA, profesor universitar, academician, pentru sprijinul științific și moral. Deosebite mulțumiri doamnelor Angela PORT, dr., conf. univ., și Tatiana ȘESTACOVA, drd., pentru indicațiile și sugestiile metodice utile în realizarea experiențelor.

Mulțumiri doamnei profesor Maria GONCEARIUC și colectivului Centrului Genetică și Ameliorarea Plantelor Aromatice și Medicinale, IGFP, AȘM, pentru materialul biologic pus la dispoziție.

Prezentat la 05.09.2013