

CZU 633.15..631.524.85

## POLIMORFISMUL FRAGMENTELOR AMPLIFICATE DE DNA LA GENOTIPURILE DE PORUMB CONTRASTE DUPĂ REZISTENȚA LA STRESUL SECETEI

D. BADICEAN

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

**Abstract.** Was performed RAPD screening of 20 maize genotypes, from the germplasm collection of the Institute of Genetics and Plant Physiology of ASM, with 10 random primers. There were identified the amplified DNA fragments polymorphism for maize genotypes contrasted by drought tolerance and also several specific amplified fragments for drought resistant maize genotypes. The article also contains 1 table, 8 figures and 11 bibliographic sources.

**Key words:** DNA fragments, Drought resistance, Maize genotypes, Polymorphism.

### INTRODUCERE

Porumbul ocupă locul 3, după orez și grâu, în producția globală și este cultivat atât în zonele temperate, cât și în cele aride. În toate zonele de creștere seceta reprezintă unul din principalii factori abiotici ce cauzează o reducere substanțială a recoltei. Deoarece resursele de apă pentru irigare sunt limitate, crearea liniilor și hibridurilor cu o rezistență sporită la stresul secetei a devenit o problemă foarte importantă și primordială pentru agricultură la nivel global. De aceea, sporirea toleranței și rezistenței la stresul secetei a culturilor agricole, inclusiv a porumbului, are o importanță economică enormă. Accentul se pune pe crearea unor genotipuri de porumb cu capacitatea de a produce o recoltă stabilă sub diverse regimuri hidrice. În scopul dezvoltării noilor concepții și abordării acestei probleme o atenție deosebită este necesar de acordat evidențierii mecanismelor moleculare ce stau la baza rezistenței la stresul secetei a plantelor de cultură.

În cercetările efectuate ne-am propus să identificăm polimorfismul fragmentelor amplificate de DNA la genotipurile de porumb contraste după rezistența la stresul secetei prin tehnica RAPD. Analiza respectivă se utilizează atât pentru pașaportizarea diferitor genotipuri, cât și pentru caracterizarea lor, deoarece atunci când un marker RAPD este asociat genetic cu un anumit caracter, există posibilitatea că el se află în vecinătatea genei de interes (A. Tores et al., 1993). Tehnica RAPD permite analiza diferitelor regiuni genomice în dependență de primerii selectați. Încercetările date au fost selectați pentru analiza genomului de porumb 10 primeri din grupele OPA, D, P conform datelor din literatura de specialitate (B. Baumet al., 1997; A., Menkiret et al., 1997; J. Rafalski et al., 1997; S. Molnar et al., 2000; V. Subramanian et al., 2000).

### MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru experiență au fost utilizate plante de porumb (*Zea Mays*) din colecția Institutului de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM, liniile: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, și hibridii: 10.MK01xRF7, 11.092xRF7, 12.XL12xM1, 13.M1xRF7, 14.RF7xDH1, 15.XL12xMf, 16.DH1x092, 17.DH1xMK01, 18.M1x092, 19.(XL12xMf)xMf, 20.(M6xRF7)xM6, 21.(XL12xM1)xM1. Extragerea probelor de DNA și prepararea soluțiilor s-au efectuat conform recomandărilor D. Dreiper et al. (1992) și J. Sambrook et al. (1989). Pentru efectuarea analizei RAPD cu genotipurile alese de porumb am utilizat primeri din grupele OPA, D și P cu următoarele secvențe:

OPA1	5'- CAG GCC CTT C -3'
OPA2	5'- TGC CGA GCT G -3'
OPA3	5'- AGT CAG CCA C -3'
OPA6	5'- GAA CGG ACT C-3'
OPA8	5'- GTG ACG TAG G -3'
OPA10	5'- GTG ATC GCA G -3'
OD8	5'- GTG TGT CCC CA -3'
P2	5'- GAC AGA CAG ACA -3'
P6	5'- GAG CAA GTT CAG CCT G -3'
P8	5'- CAG GAA ACA GCT GAC -3'

Amplificarea DNA-ului a fost efectuată conform recomandărilor J. Williams et al. (1990) cu unele modificări. Componentele unei reacții: 50ng DNA genomic, 10pM praimer, 299μM dNTP, 10x soluție tampon (670mM Tris HCl, pH 8.8; 67mM MgCl<sub>2</sub>; 116mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.1% Ten 20) și Taq-polimeraza 1U într-un volum total de 30μl. Amplificarea s-a efectuat la aparatul Ependorf Mastercycler 5330 sub următorul program termic:

- 1 ciclu: denaturarea DNA-ului la +94°C timp de 4 min.
- 45 cicluri:
  - denaturarea DNA-ului la +94°C timp de 1 min.
  - alinierea primerului la (+39°C)-(+45°C), în dependență de praimer, timp de 1 min.
  - elongarea la +72°C timp de 2 min.
- 1 ciclu: elongarea la +72°C timp de 10 min.

Temperatura de aliniere a primerilor s-a calculat după formula:  $[4(C+G)+2(T+A)]-5$ , unde A,T,C,G sunt cele patru tipuri de nucleotide (K. Deivis, 1990).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Amplificarea cu fiecare praimer a fost repetată de 3 ori pentru verificarea reproducerii datelor experimentale. Rezultatul analizei electroforetice a demonstrat că numărul de fragmente amplificate și intensitatea lor pentru toate genotipurile de porumb sînt diferite în dependență de primerul utilizat.

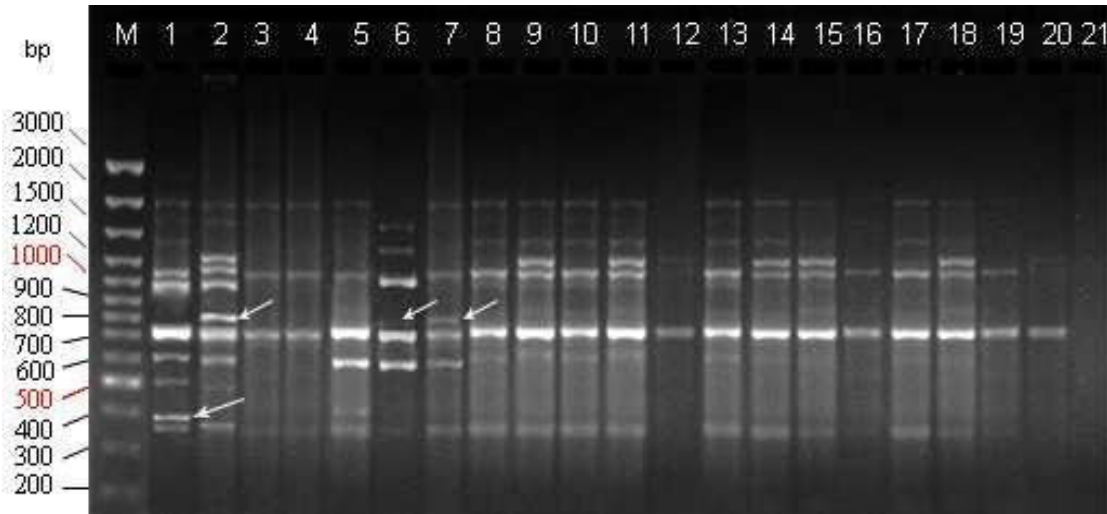


Fig. 1. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA cu ajutorul primerului OPA1: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, 10.MK01xRF7, 11.XL12xM1, 12.M1xRF7, 13.RF7xDH1, 14.XL12xMf, 15.DH1xMK01, 16.M1x092, 17.DH1x092, 18.(XL12xMf)xMf, 19.(M6xRF7)xM6, 20.(XL12xM1)xM1, 21.Martor. M – marcherul greutății moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

Numărul fragmentelor amplificate variază între 3-13, în dependență de genotip, iar după dimensiune acestea variază între 2000-300pb. În cazul utilizării primerului OPA1 s-au obținut 125 fragmente amplificate de diferite talii și intensități. Practic, la toate genotipurile se evidențiază două fragmente amplificate cu aceeași intensitate diferită cu dimensiunile de 700pb și 1100pb (fig. 1). La genotipul RF7, rezistent la secetă, s-a evidențiat un fragment specific cu talia de 390pb, ce lipsește la celelalte genotipuri, iar pentru genotipurile XL12, 092, MK01 s-a mai înregistrat o banda amplificată specific de 800pb (fig. 1, fragmentele sunt indicate prin săgeți).

La utilizarea primerului OPA2 s-a obținut un spectru mai variat de fragmente amplificate. În total s-au amplificat 7-9 fragmente, în dependență de genotip. E de remarcat faptul că la toate genotipurile sunt prezente 2 fragmente, cu dimensiunea de 1500pb și 600pb. Fragmente de dimensiunea respectivă, practic nu s-au amplificat în cazul primerului OPA1 (fig. 2).

În spectrul variat de fragmente amplificate sunt prezente și câteva benzi specifice doar pentru unele

genotipuri. La genotipurile XL12 și (XL12xM1)xM1, linie cu rezistență scăzută la stresul secetei și hibrid cu o rezistență medie, s-a amplificat un fragment specific cu dimensiunea de 250pb (fig. 2, fragmentele sunt indicate prin săgeată), iar în cazul hibridului DH1x092 (nerezistent la stresul secetei) s-a amplificat un fragment specific, prezent doar la acest genotip, cu dimensiunea de 300pb. Rezultatele electroforezei sunt prezentate în figura 2.

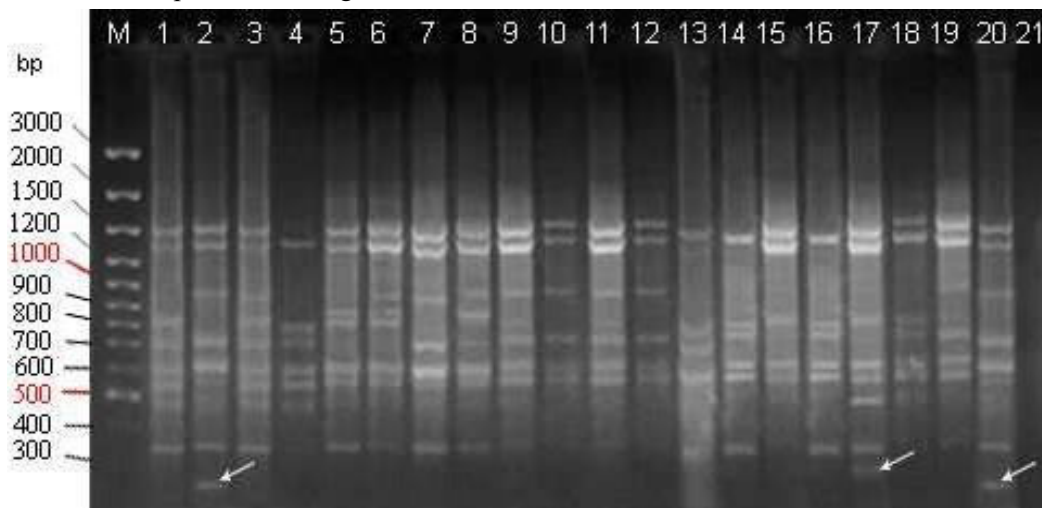


Fig. 2. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA cu ajutorul praimerului **OPA2**: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, 10.MK01xRF7, 11.XL12xM1, 12.M1xRF7, 13.RF7xDH1, 14.XL12xMf, 15.DH1xMK01, 16.M1x092, 17.DH1x092, 18.(XL12xMf)xMf, 19.(M6xRF7)xM6, 20.(XL12xM1)xM1, 21.Martor. M – marcherul greutateii moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

În cazul amplificării cu primerul OPA6 s-a obținut cel mai mare număr de fragmente amplificate pentru fiecare genotip. Numărul de fragmente amplificate este cuprins între 7-13. Spectrul polimorf în cazul acestui primer se caracterizează prin prezența unui fragment intens amplificat de mărimea 800pb (fig. 3). Pentru genotipurile XL12 și (XL12xM1)xM1 s-a amplificat un fragment specific cu dimensiunea 1900pb, iar pentru genotipul MK01 (linie cu rezistență sporită la stresul secetei) se evidențiază un fragment specific de 2100pb.

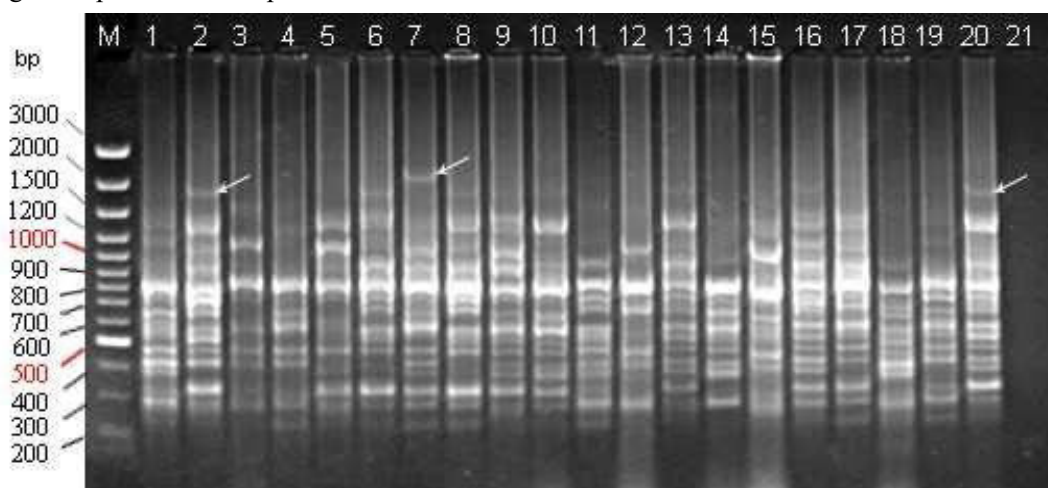


Fig. 3. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA cu ajutorul praimerului **OPA6**: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, 10.MK01xRF7, 11.XL12xM1, 12.M1xRF7, 13.RF7xDH1, 14.XL12xMf, 15.DH1xMK01, 16.M1x092, 17.DH1x092, 18.(XL12xMf)xMf, 19.(M6xRF7)xM6, 20.(XL12xM1)xM1, 21.Martor. M – marcherul greutateii moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

În baza analizei RAPD cu primerul OPA8 s-au obținut 5-9 fragmente amplificate, în dependență de genotip. În acest caz, practic, pentru toate genotipurile sunt caracteristice trei fragmente intens amplificate cu dimensiunea de 1200pb, 400pb și 300pb. Fragmentele de AND, amplificate specific în prezența acestui primer, au fost identificate în cazul a patru genotipuri: RF7, P346 (linii cu o rezistență sporită la secetă) – un fragment amplificat specific de dimensiunea 780pb; MK01, DH1xMK01 (genotipuri cu o rezistență sporită la secetă) - un fragment amplificat specific de dimensiunea 900pb și doar pentru linia MK01 prezența fragmentului de 480pb. Aceste rezultate sunt prezentate în figura 4.

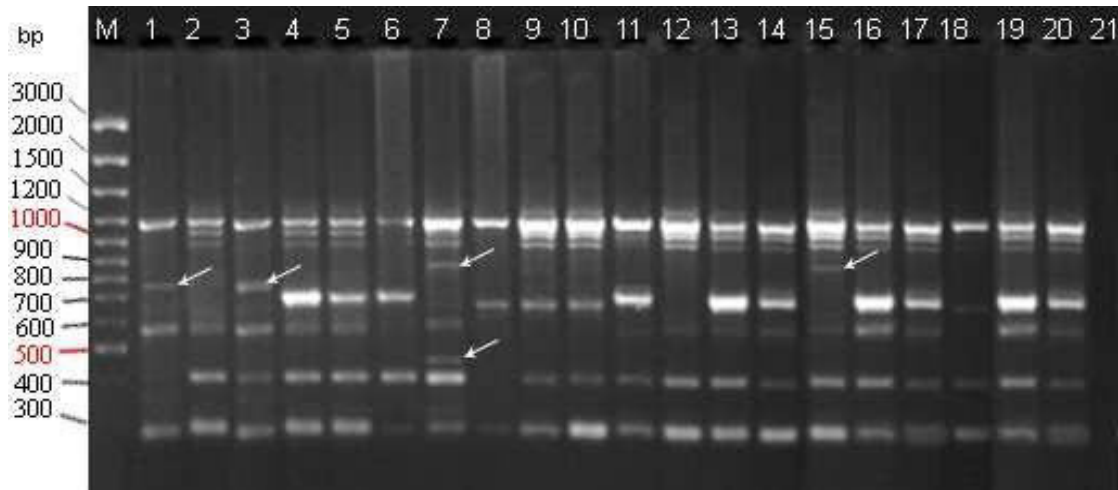


Fig. 4. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA cu ajutorul praimerului **OPA8**: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, 10.MK01xRF7, 11.XL12xM1, 12.M1xRF7, 13.RF7xDH1, 14.XL12xMf, 15.DH1xMK01, 16.M1x092, 17.DH1x092, 18.(XL12xMf)xMf, 19.(M6xRF7)xM6, 20.(XL12xM1)xM1, 21. Martor. M – marcherul greutateii moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

În cazul utilizării primerului OPA10 s-a obținut un spectru polimorfic uniform pentru toate genotipurile analizate. Tuturor genotipurilor le sunt specifice patru fragmente intens amplificate cu dimensiunile de 650pb, 930pb, 1400pb și 1600pb. În pofida uniformității spectrului polimorfic obținut, am identificat și 3 fragmente amplificate specific pentru doua genotipuri: Mf – 470pb, 510pb și XL12xMf – 470pb (fig. 5).

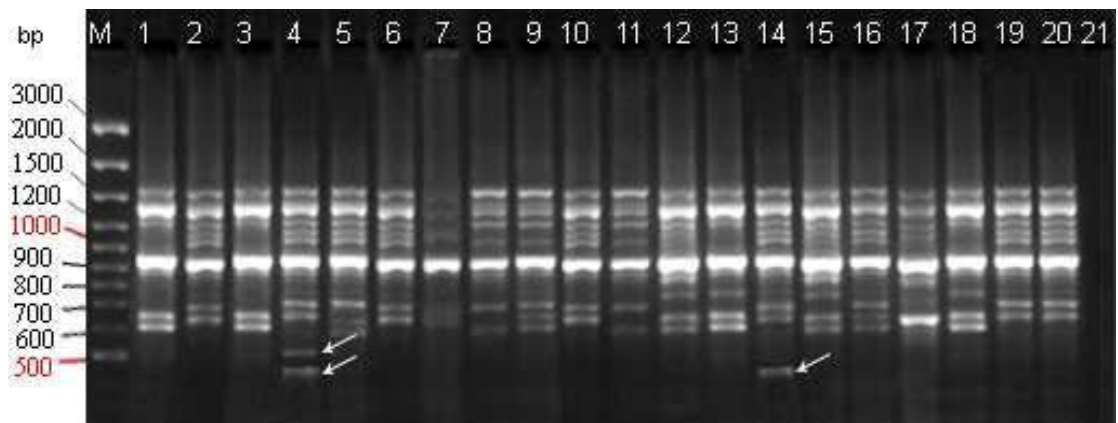


Fig. 5. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA cu ajutorul praimerului **OPA10**: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, 10.MK01xRF7, 11.XL12xM1, 12.M1xRF7, 13.RF7xDH1, 14.XL12xMf, 15.DH1xMK01, 16.M1x092, 17.DH1x092, 18.(XL12xMf)xMf, 19.(M6xRF7)xM6, 20.(XL12xM1)xM1, 21. Martor. M – marcherul greutateii moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

În screeningul molecular al liniilor și hibridilor de porumb, efectuat de noi prin intermediul tehnicii RAPD, s-a utilizat un singur primer din grupul OD și anume OD8. Analiza electroforetică a produselor de amplificare cu acest primer a evidențiat un spectru uniform și un număr de 7-9 fragmente amplificate pentru fiecare genotip (spectrul electroforetic nu e prezentat). Un alt grup de primeri ce prezintă interes în aspectul diversității fragmentelor amplificate a fost grupul P. În cazul utilizării primerilor respectivi am obținut mai puține fragmente amplificate, comparativ cu primerii grupului OPA. Una din cauze este și faptul că acești primeri sunt mai mari, lungimea lor variază între 12-16pb. Utilizarea primerului P2 permite identificarea a 42 fragmente amplificate. Se evidențiază un fragment comun pentru toate genotipurile cu dimensiunea de 0.55kb. De asemenea, pentru genotipul MK01 (linie cu o rezistență sporită la stresul secetei) s-a obținut o bandă amplificată specific cu dimensiunea de 1.3kb (spectrul electroforetic nu e prezentat). În cazul amplificării cu primerul P6 am obținut fragmente de ADN cu dimensiuni între 2000bp – 600bp. Spectrul lor polimorfic este mai simetric decât în cazul primerului P2. Pentru toate genotipurile sunt prezente mai multe fragmente intens amplificate cu dimensiunile de 1500bp, 1000bp, 600bp. La genotipurile DH1x092 și (M6xRF7)xM6 – primul nerezistent, iar al doilea cu o rezistență medie la stresul secetei s-a înregistrat un fragment amplificat specific cu dimensiunea de 900bp. E de remarcat faptul, că spectrul fragmentelor fiecărui genotip se mai deosebește prin două fragmente amplificate cu dimensiunea de 2000bp și 1800bp. Aceste două benzi lipsesc complet la unele genotipuri și în cazul unor hibridi este prezentă doar o bandă (fig. 6).

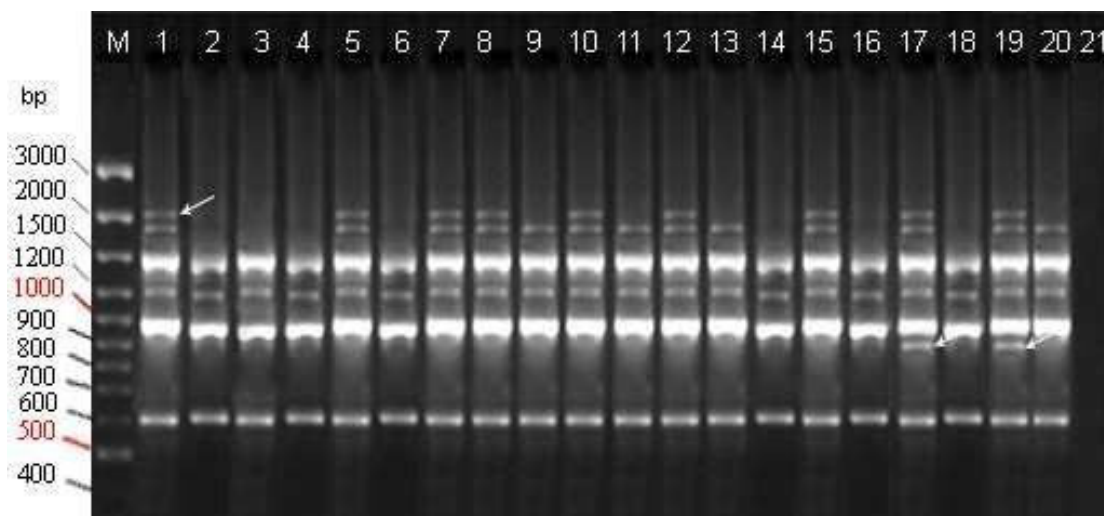


Fig. 6. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA cu ajutorul primerului P6: 1.RF7, 2.XL12, 3.P346, 4.Mf, 5.DH1, 6.092, 7.MK01, 8.W47, 9.M1, 10.MK01xRF7, 11.XL12xM1, 12.M1xRF7, 13.RF7xDH1, 14.XL12xMf, 15.DH1xMK01, 16.M1x092, 17.DH1x092, 18.(XL12xMf)xMf, 19.(M6xRF7)xM6, 20.(XL12xM1)xM1, 21.Martor. M – marcherul greutății moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

În cazul utilizării primerului P8 a fost obținută o gamă de 10 fragmente amplificate cu diferite intensități. Spectrul de amplificare obținut este uniform și nu s-au evidențiat fragmente amplificate specific (spectrul electroforetic nu e prezentat).

În scopul aprecierii purității liniilor de porumb în cadrul unui genotip s-a efectuat analiza RAPD cu 5 probe individuale la câteva genotipuri selectate la întâmplare. În urma analizei electroforetice am constatat un spectru identic pentru toate 5 probe individuale, diferă doar intensitatea de amplificare a anumitor benzi pentru unele genotipuri (fig. 8). Uniformitatea spectrului polimorfic obținut ne demonstrează faptul că liniile de porumb sunt pure și polimorfismul secvențelor de DNA, identificate de noi, se datorează deosebirilor genetice între linii.

În urma amplificărilor cu toate zece perechi de primeri rezultatele obținute au fost sumate în tabelul 1. Acest tabel reflectă numărul fragmentelor amplificate cu fiecare primer în dependență de genotip. Cele mai multe fragmente au fost obținute în cazul primerului OPA6 – 198 de fragmente, iar pentru un genotip - 78, în cazul liniilor XL12 și M1.

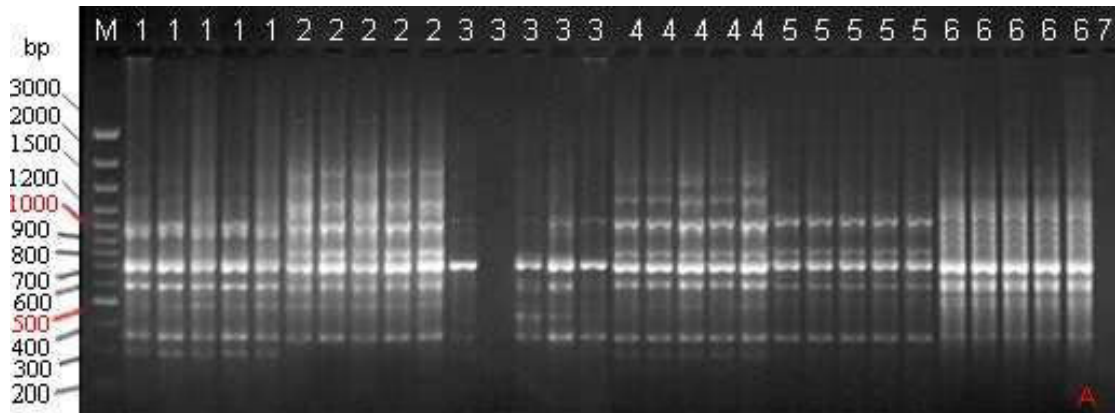


Fig. 7. Rezultatele analizei electroforetice a fragmentelor amplificate de DNA a probelor individuale cu ajutorul praimerului **OPA1**: 1. RF7, 2. XL12, 3. DH1, 4. 092, 5. MK01, 6.M1, 7. Martor. M – markerul greutateii moleculare GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

Tabelul 1

Rezultatele obținute prin analiza RAPD a diferitor genotipuri de porumb

Genotipul	Numărul de fragmente amplificate										Suma
	OPA1	OPA2	OPA3	OPA6	OPA8	OPA10	D8	P2	P6	P8	
1. RF7	12	9	7	8	4	6	4	5	6	10	71
2. XL12	10	9	9	11	6	8	9	4	4	8	78
3. P346	6	10	5	7	5	6	8	5	4	10	66
4. Mf	6	7	5	7	7	10	8	4	4	4	62
5. DH1	7	8	6	7	7	9	8	6	6	10	74
6. 092	8	8	4	10	5	8	8	5	4	2	62
7. MK01	6	7	5	11	7	6	9	5	6	10	72
8. W47	8	8	5	10	3	9	6	6	6	3	64
9. M1	9	8	5	13	6	9	9	5	5	9	78
10. MK01xRF7	10	6	6	11	6	8	9	6	6	6	74
11. XL12xM1	7	8	6	10	7	8	9	4	5	6	70
12. M1xRF7	3	7	6	6	6	9	6	4	6	7	60
13. RF7xDH1	9	6	6	11	7	7	9	5	5	6	71
14. XL12xMf	8	6	7	8	7	9	9	5	4	6	69
15. DH1xMK01	8	6	4	9	7	10	4	5	6	6	65
16. M1x092	4	6	3	13	7	9	7	4	4	3	60
17. DH1x092	7	8	5	13	7	10	8	5	7	4	74
18. XL12xMf)xMf	8	7	5	11	4	7	8	6	4	4	64
19. M6xRF7)xM6	3	7	4	9	7	9	6	5	7	11	68
20. (XL12xM1)xM1	3	8	6	13	7	9	8	4	5	10	73
suma	142	149	109	198	122	166	152	98	104	135	

Tehnica RAPD permite identificarea rapidă a diverselor spectre polimorfe ale fragmentelor de DNA la diferite organisme. Există posibilitatea de transformare a markerilor RAPD în markeri SCAR (N. Msomi, C. Frederik). Astfel de analize moleculare permit pașaportizarea și evidențierea unui lincaj dintre spectrele polimorfe ale fragmentelor de DNA și însușirile agronomice valoroase.

### CONCLUZII

1. S-a identificat polimorfismul secvențelor amplificate de DNA prin intermediul tehnicii RAPD la genotipurile de porumb contrastate după rezistența la stresul secetei.
2. Pentru unele genotipuri de porumb rezistente la stresul secetei au fost identificate fragmente amplificate specific.

### BIBLIOGRAFIA

1. Baum, B. R., Nevo, E., Johnson, D. A. et al. Genetic diversity in wild barley (*Hordeum Spontaneum*) in the Near East: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genet. Resources CropEvol., 1997, 44:147-157.

2. Dreiper J., Scott, P., Armitidj F. et al. Gennaâ inženeriâ rastenij. Laboratornoe rukovodstvo // Moskva, Mir, 1992.
3. Devis, K. Analiz genoma. Metody. Moskva, Mir, 1990, s. 247.
4. Molnar, S. J., James, L. E., Kasha, K. J. Inheritance and RAPD tagging of multiple genes for resistance to net blotch in barley. *Genome*, 2000, 43:224-231.
5. Msomi, N., Frederik, C. Conversion of RAPD markers for fibre in Sugarcane to Sequence Characterised Amplified Regions. [www.8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-5d-198.html](http://www.8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-5d-198.html)
6. Menkir, A., Goldsbrough, P., Ejeta, G. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorgum. *Crop Science*, 1997, 37:564-569.
7. Rafalski, J.A., Gizinska, M. and Wisniewska, I. PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds. *Gent. Biot. and Breed. Maize and Sorghum.* (Tsaftaris, A.S.Ed.), Royal Soc. Chem. Cambridge U.K. (1997)106-111.
8. Subramanian, V., Gurtu, S., Negaswara et al. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome* 43, 2000, 656-660.
9. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition.* // Cold Spring Harbor, NY, 1989.
10. Torres, A.M., Weeden, N.F., Martin, A. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 1993, 935-945.
11. Williams, J.C.K., Kubelik, A.P., Livak, K.J. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids*, 1990, 18:6531-6535.

Data prezentării articolului – **16.06.2009**