

Caracterizarea morfologică și a diversității genetice prin utilizarea tehnicii SSR la unele genotipuri de măr

Iancu Adina, Chivu Mihai

Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Pitești-Mărăcineni, România

Cuvinte cheie: măr, *Venturia inaequalis*, rapăn, diversitate genetică, microsateliți, SSR, *Rvi2*, *Rvi8*, *Vr* (*Rvi2+Rvi8*).

Introducere

Analiza genotipurilor la nivel molecular prin utilizarea diferitelor tehnici de amprentare moleculară a genelor de interes are ca scop utilizarea mai eficientă a fondului de germoplasmă în folosul ameliorării. Obținerea unor soiuri cu rezistență durabilă la rapăn, cu fructe de calitate sub aspectul proprietăților organoleptice și a duratei de păstrare sunt obiective majore incluse în programelor de ameliorare a mărilor. Selecția asistată de markeri moleculari de tip SSR este utilizată cu succes pentru cartografierea genelor de interes. Pentru evidențierea genelor de rezistență la rapan s-au folosit diferiți markeri moleculari ca de exemplu: pentru gena *Rvi2* (CH02b10 și CH05e03) în studii realizate de: Bus și colab. (2005), Höfer M. și colab. (2021), Patocchi și colab. (2009), Gygax M. și colab. (2004), Hemmat și colab. (2002) (Tabel 3); pentru genele *Rvi8* și *Rvi11* (CH03d01) în studii realizate de: Gygax M. și colab. (2004), Bus și colab. (2005a), Höfer M. și colab. (2021) (Tabel 3) și, respectiv, pentru gena *Rvi5* (Hi07h02) în studii realizate de Patocchi și colab. (2005), Patocchi și colab., (2009), Cova și colab. (2015) (tabel 3). Cu ajutorul markerilor moleculari de tip SSR poate fi evidențiat un grad ridicat de polimorfism care apare la nivelul clonelor soiurilor comerciale, ca de exemplu: Golden Delicious, Jonagold, Granny Smith și Idared (tabel 3). Prin utilizarea a șase markeri SSR (CH02b10, CH05e03, CH02d01, Hi07f01 și Hi07h02) s-a urmărit identificarea fragmentelor amplificate, corespunzătoare perechilor de baze asociate genelor de rezistență *Rvi2*, *Rvi8*, *Rvi5*, *Rvi11*, dar și analiza diversității intraspecifice la nivel molecular, precum și analiza secvențelor repetitive în tandem capabile să diferențieze genomul aparținând clonelor unui soi.

Material și metodă

Analizele moleculare privind izolarea și purificarea ADN s-au realizat conform protocolului de extracție recomandat de "ISOLATE II Plant DNA Kit", Biorad, iar amplificarea PCR-SSR prin utilizarea următorilor primeri CH02b10; CH05e03; CH02c06; CH03d01; Hi07f02; Hi07h02 (Tabel 2). Reacția de amplificare a ADN, pentru fiecare probă, s-a optimizat într-un volum de 15 μl, incluzând următoarele componente în concentrație finală: 11,7 μl MyTaq™ Red Mix, 0,3 μl primer (0,6 μM / μl în volumul final de reacție), 3 μl DNA (10 ng / μl).

Probele astfel pregătite au fost supuse următoarelor programe de amplificare (termocycler Fast Gene, model FG-TC01): denaturare inițială la 94°C (3 minute); urmată de 35 cicluri: 94°C (1 minut), 58°C (1 minut), 72°C (2 minute) și o extensie finală de 10 minute la 72°C pentru CH02b10; denaturare inițială la 94°C (4 minute); urmată de 45 cicluri: 94°C (50 sec.), 55°C (50 sec.), 72°C (50 sec.) și o extensie finală de 5 minute la 72°C pentru CH05e03; denaturare inițială la 94°C (2 minute); urmată de 40 cicluri: 94°C (1 minut), 55°C (1 minut), 72°C (2 minute) și o extensie finală de 10 minute la 72°C pentru CH02c06; denaturare inițială la 94°C (2 minute); urmată de 35 cicluri: 94°C (1 minut), 58°C (1 minut), 72°C (2 minute) și o extensie finală de 10 minute la 72°C pentru CH03d01; denaturare inițială la 94°C (2 minute); urmată de 35 cicluri: 94°C (30 sec.), 55°C (30 sec.), 72°C (1 minut) și o extensie finală de 10 minute la 72°C pentru Hi07f0.

Verificarea ampliconilor rezultați în urma reacției în lanț a polimerazei s-a realizat după migrarea probelor prin gelul de agaroză într-un sistem de electroforeză orizontală cu ajutorul unui sistem de imagistică, Essential V6, prin captarea imaginii de pe gel (Figura 1, Figura 2, Figura 3). Secvențierea produșilor PCR se va putea realiza după recuperarea din gel a fragmentelor de interes prin decuparea și purificarea acestora cu ajutorul kitului "Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit", Biorad. Etapa de secvențiere va fi un serviciu externalizat, întrucât laboratorul nostru nu este dotat cu un secvențiator genetic.

Rezultate și discuții

Rezultatele screening-ului molecular realizat pentru 22 de varietăți de măr la ICDP Pitești-Mărăcineni (Militaru și colab., 2020) au evidențiat gena *Vr* (*Rvi2+Rvi8*) la 13 soiuri prin segregarea markerului OPL19 cu locusul celor două gene, 5 dintre acestea fiind incluse și în acest studiu (Tabel 1). Prin urmare, pentru aceste 5 soiuri (Romus 3, Romus 5, Remar, Domnesc și Crețesc) ar trebui să putem identifica perechile de baze asociate genelor de rezistență *Rvi2* și *Rvi8* cu ajutorul microsateliților CH02b10, CH05e03 și CH03d01. Analiza profilului electroforetic a permis verificarea intervalelor de valori între care ar trebui să fie poziționate perechile de baze amplificate. Aprecierea acestor valori din imaginile obținute cu softul "UVitec v. 1.0." a fost posibilă prin utilizarea softului "Image Lab v. 6.1.", Biorad. Dimensiunea perechilor de baze evidențiate în studiul nostru corespunde unor intervale de valori asemănătoare cu cele obținute în diverse lucrări de specialitate (Tabel 2).

În acest moment am finalizat etapa de amplificare PCR pentru toți cei 6 markeri, urmând a se realiza etapa de optimizare a protocolului pentru electroforeza verticală astfel încât ampliconii de interes să poată fi recuperați și purificați din gel.

Tabel 1. Soiuri de măr introduse în studiu

Nr.crt.	Denumire soi	Genitori	Caracterizare fenotipică la rapăn
1	Romus 3	Hibrid interspecific F4	rezistent
2	Romus 5	Romus 3 x Prima	rezistent
3	Verzișoare	Soi local, România	sensibil
4	Parmain d'or	Genitori necunoscuți, Anglia	sensibil
5	Domnesc	Soi local, România	sensibil
6	Crețesc	Soi local, România	sensibil
7	Florina	Golden Delicious x (Rome Beauty x Malus Floribunda 82) x Starking Simpson's Giant Limb x Jonathan	rezistent
8	Remar	gamma radiation(5000 γ) of Prima seeds (o.p.)(Vf)(Vr)	rezistent
9	Generos	(Parmain d'or x M.Kaido) x (Jonathan x V 53-39-2) x (Frumos de Voinești x V 60-6-51)	sensibil
10	Valery	Golden Spur x Florina	rezistent
11	Rebra	Primax Florina	rezistență moderată
12	Rustic	Florina x Pionier	rezistență moderată
13	Idared	Jonathan x Wagener Premiat	sensibil
14	Pionier	(Jonathan x Verzișoare x Prima	rezistență moderată
15	Jonathan	Genitori necunoscuți, SUA	sensibil
16	Belle de Booskop	Genitori necunoscuți, Olanda	sensibil
17	Golden Delicious	Genitori necunoscuți, SUA	sensibil
18	Delicios de Voinești	Golden Delicious x Crețesc	tolerant
19	Rome Beauty	Genitori necunoscuți, SUA	sensibil
20	Wagner Premiat	Genitori necunoscuți, SUA	sensibil
21	Jonagold	Jonathan x Golden delicious	sensibil
22	Granny Smith	Hibrid din Malus sylvestris, Australia	sensibil
23	Crețesc auriu	Soi local, România	sensibil
24	Aura	Prima x BN 33/39	rezistent

Tabel 2. Intervalul de valori pentru ampliconi în diverse studii de cercetare

Nr. Crt.	Molecular marker	Secvența de nucleotide	Interval de valori	Referințe
1	CH02b10	F: 5'-CAAGGAATCATCAAGATTCAG-3'	122	Hemmat și colab., 2002
		R: 5'-CAAGTGGCTCGAGTAGTGT-3'	121-159	HIDRAS site
2	CH05e03	F: 5'-CGAATTTTCACTCACTGACTGGG-3'	124-172	Figura 2
		R: 5'-CAAGTGGCTCGAGTAGTGT-3'	158-190	Liebard și colab., 2002
			158-190	Gali Z. și colab., 2005
			153-193	Gasi F. și colab., 2010
			145-224	G. Marconi și colab., 2018
3	CH03d01	F: 5'-GCGACCAATCACTCACTC-3'	95-115	Gianfranceschi și colab., 1998
		R: 5'-AGAGTCAGAGCAGCAGCTC-3'	95-115	Lu și colab., 2010
4	Hi07f01	F: 5'-GGAGGGCTTACTGGGAAC-3'	204-220	HIDRAS site
		R: 5'-GTTGAGCTCACTCACTCC-3'	204-220	HIDRAS site
5	CH02c06	F: 5'-TGACGAATCACTCACTCAATGCA-3'	218-263	Gasi F. și colab., 2010
		R: 5'-GATTGGCGCTTTTAACAT-3'	204-264	Meland M. și colab., 2022
6	Hi07h02	F: 5'-CAAATGGCACTGGTCTG-3'	216-254	Gianfranceschi și colab., 1998
		R: 5'-GTTAGTGGAGGTAAGGGATG-3'	220-268	Figura 3
			246-276	Patocchi și colab., 2005
				HIDRAS site

Tabel 3. Diversitatea genetică exprimată prin tehnica SSR pentru specia măr

Cultivar	Markeri moleculari	Fragmente amplificate	Genă evidențiată	Referințe
Romus 3	OPL19	433-1200	Vr(Rvi2+Rvi8)	Militaru M. și colab., 2020
Romus 5	OPL19	433-1200	Vr(Rvi2+Rvi8)	Militaru M. și colab., 2020
Domnesc	OPL19	433-1200	Vr(Rvi2+Rvi8)	Militaru M. și colab., 2020
Florina	CH05e03	163-191		Gali Z. și colab., 2005
		163-198		AE Akpan et al., 2018
	CH02b10	133-135		Liebard R., 2003
	CH02c06	250		Liebard R., 2003
	CH03d01	111-113		Silfverberg-Dilworth și colab., 2006
	Hi07f01	206-220		Silfverberg-Dilworth și colab., 2006
	Hi07h02	246-256		Silfverberg-Dilworth și colab., 2006
Remar	OPL19	433-1200	Vr(Rvi2+Rvi8)	Militaru M. și colab., 2020
	OPL19	433-1200	Vr(Rvi2+Rvi8)	Militaru M. și colab., 2020
Prima	CH05e03	179-185		Gali Z. și colab., 2005
	Hi07f01	210-220		Silfverberg-Dilworth și colab., 2006
Hi07h02	248-274		Silfverberg-Dilworth și colab., 2006	
Parmain d'or	OPL19	433-1200	Vr(Rvi2+Rvi8)	Militaru M. și colab., 2020
Rome Beauty	CH02b10	130-130		M. Hemmat și colab., 2003
	CH05e03	172-185		Gali Z. și colab., 2005
Idared		171-183		G. L. Tania, 2012
	Hi07h02	202-202		Silfverberg-Dilworth et al., 2006
Jonathan	CH05e03	163-185		Gali Z. și colab., 2005
	CH05e03	179-185		Gali Z. și colab., 2005
Golden Delicious		174-181		Höfer M. și colab., 2021
		185-191		Patocchi și colab., 2009
		176-182		AE Akpan et al., 2018
	CH02b10	123-126		Höfer M. și colab., 2021
		126-130		Patocchi și colab., 2009
Jonagold		247-255		Höfer M. și colab., 2021
		251-259		Patocchi și colab., 2009
		248-256		Patocchi și colab., 2005
	CH3d01	113		Höfer M. și colab., 2021
	CH02c06	235-239		Höfer M. și colab., 2021
	CH05e03	163-179-185		Gali Z. și colab., 2005
		163-178-184		Gasi F. și colab., 2010
CH03d06	236-241-253		Gali F. și colab., 2010	
Granny Smith	CH05e03	168-181		Gali Z. și colab., 2005
		167-180		Gasi F. și colab., 2010
	CH02c06	230-236		Gasi F. și colab., 2010
TSR34715	CH05e03	163	Rvi11	Höfer M. și colab., 2021
		165		Bus și colab., 2005
	CH02b10	122-146	Rvi2	Höfer M. și colab., 2021
		125-152		Patocchi și colab., 2009
CH03d01	121		Bus și colab., 2005	
	119		Bus și colab., 2005	
TSR337239				

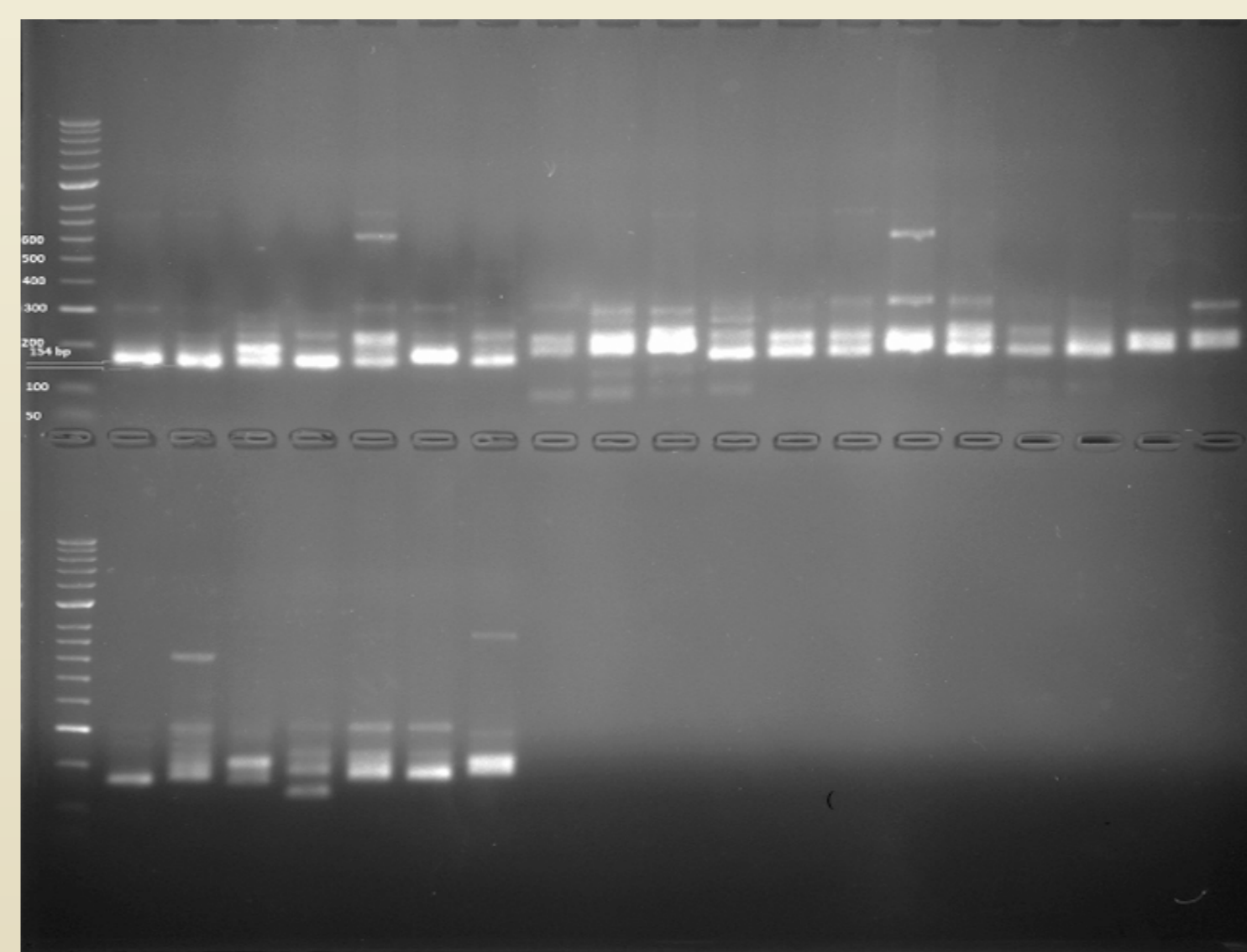


Figura 1. Profilul electroforetic pentru marker-ul CH05e03 (154-224)

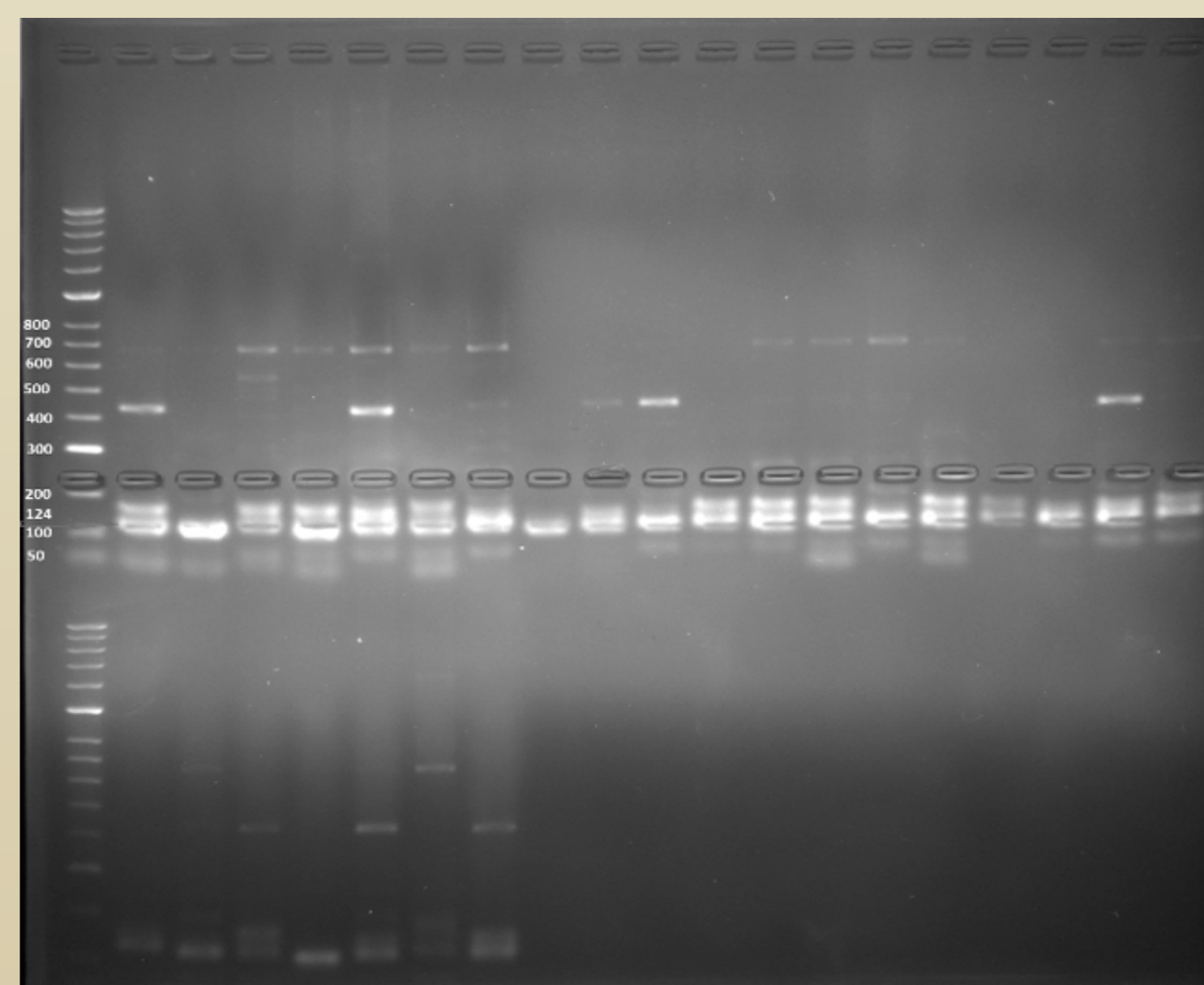


Figura 2. Profilul electroforetic pentru marker-ul CH02b10 (124-172)

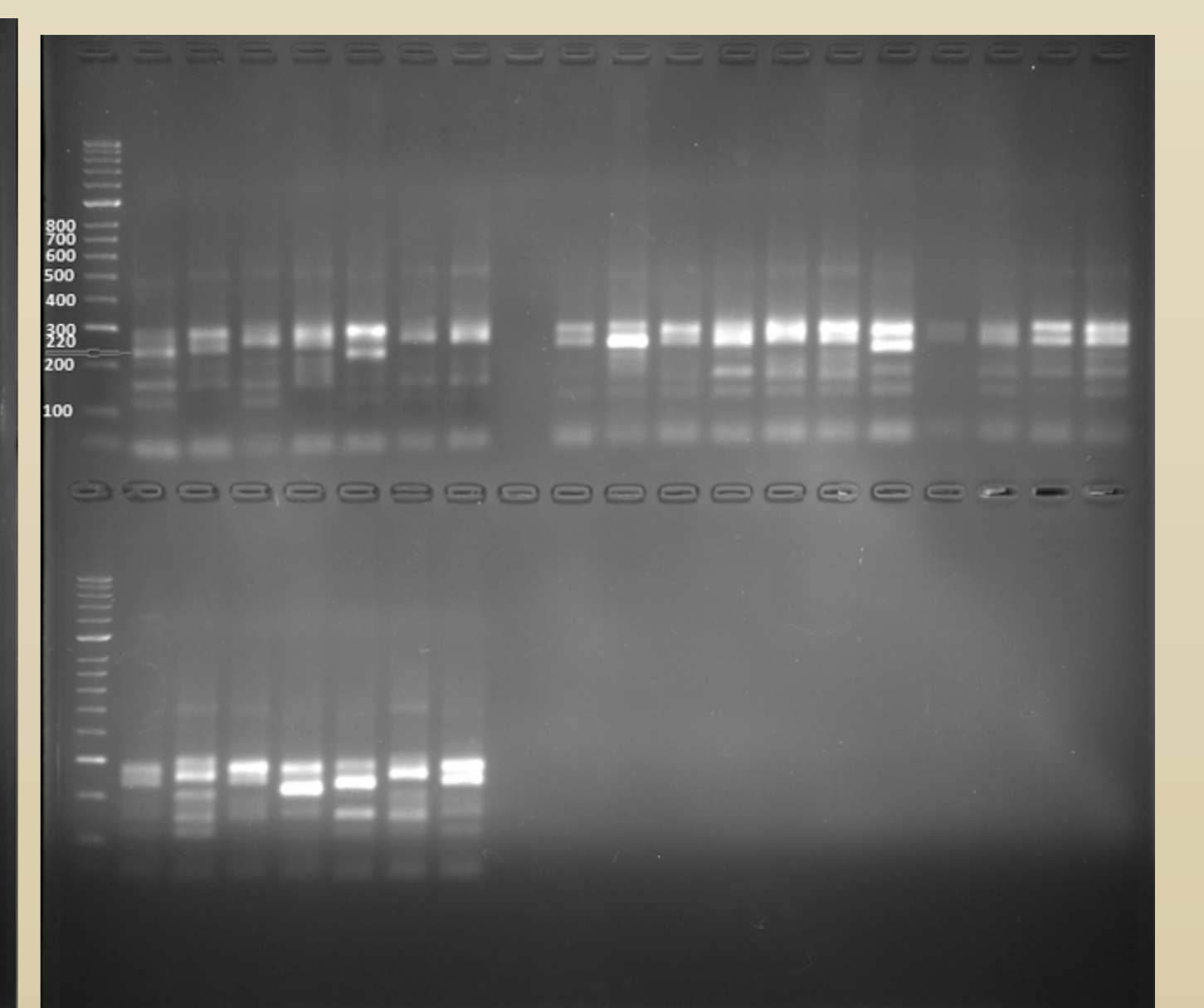


Figura 3. Profilul electroforetic pentru marker-ul CH02c06 (220-268)