



Institutul Național de
Cercetare-Dezvoltare
Agricolă Fundulea

Utilizarea markerilor moleculari pentru determinarea diversității genetice a unor specii sălbatice de floarea-soarelui

Conțescu Elena-Laura, Anton Florin Gabriel, Ciucă Matilda, Cristina Daniel, Turcu Alina-Gabriela, Ionescu Violeta

*Autor corespondent: contescu_elena_laura@yahoo.com

INCDA Fundulea, Str. Nicolae Titulescu, nr. 1, Fundulea, Călărași, 915200

Introducere

Floarea soarelui (*Helianthus annuus* L.) face parte din familia *Asteraceae*, una dintre cele mai diverse și extinse familii de plante cu flori. Genul *Helianthus* este format din 51 de specii și 19 subspecii, dintre care 14 sunt specii anuale și 37 sunt perene (Schilling și Heiser, 1981). Datorită importanței economice deosebite a culturii de floarea-soarelui, obținerea de noi linii și hibrizi cu caracteristici superioare și adaptabilitate mare este unul din obiectivele principale pentru ameliorarea acestei culturi. Baza genetică îngustă îngreunează însă atingerea acestui obiectiv, soluția putând fi infuzia de gene de la specii sălbatice, care pot fi surse de variabilitate genetică pentru speciile de floarea-soarelui cultivată.

Pe lângă adaptabilitatea la habitate diverse, speciile sălbatice sunt purtătoare ale unor gene de rezistență la factori abiotici și biotici, fiind practic un rezervor de gene utile pentru generațiile viitoare de floarea-soarelui. În ultimii ani, speciile sălbatice au fost utilizate pentru ameliorarea rezistenței florii-soarelui la: alternaria (*H. debilis*), făinare (*H. debilis*, *H. argophyllus*), Phomopsis (*H. debilis*, *H. argophyllus*, *H. maximiliani*), rugină (*H. maximiliani*, *H. argophyllus*), mană (*H. argophyllus*), Orobanche cumana (*H. debilis*, *H. maximiliani*), toleranța la secetă (*H. argophyllus*) etc., (Seiler G.J. și colab., 2017). Multe din aceste rezultate au fost obținute prin combinarea ameliorării clasice cu tehnici moderne, bazate pe utilizarea markerilor moleculari, obținându-se astfel informații valoroase referitoare la diversitatea speciilor sălbatice dar și a celor cultivate.

Dintre toate tehnicile moleculare, bazate pe utilizarea markerilor, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) este cea mai indicată pentru a detecta variațiile genetice datorită nivelului ridicat de polimorfism oferit de acest tip de analiză moleculară. Cercetări anterioare au utilizat cu succes tehnica ISSR pentru a evalua diversitatea genetică a: grâului (Polido P. și colab., 2020), porumbului (do Amaral Júnior A. și colab., 2011), orzului (Olgun M. și colab 2011), căpșunului (Hussein T.S. și colab., 2008), etc. dar și la floarea-soarelui (Darbani S. și colab., 2020; Dhutmal R., 2021; Garayalde A. și colab., 2011; Morsi M. și colab., 2020).

Material și metode

Materialul a constat în semințele a opt genotipuri de floarea-soarelui sălbatică, două linii și un hibrid comercial. Pentru izolarea ADN s-a utilizat un tampon de extracție pe bază de CTAB 2% (Ciucă și colab., 2020). Cuantificarea cantității și calității ADN s-a realizat prin metoda electroforetică (gel 0.8% agaroză; 0,5X soluție TBE) și spectrofotometrică (Beckman-Coulter Du Series 700).

Amplificarea PCR - s-au utilizat 19 markeri ISSR (Darbani și colab., 2020; Khalil și colab, 2019; Dhutmal și colab., 2021). Pentru amplificare s-a utilizat un volum de reacție de 20μl: 20-25 ng ADN, 1X tampon DreamTaq Green PCR Master Mix, 1.25 μM pentru fiecare primer. Reacțiile au avut loc în termocycler-ul ProFlex (Applied Biosystem). Programul utilizat: denaturare inițială 3 min la 95°C; 40 cicluri a câte: 30 sec la 95°C, 45 sec la 47-55°C (în funcție de primer) și 1 min 30 sec la 72°C. După extensia finală de 10 min la 72°C, probele au fost menținute la 20 °C.

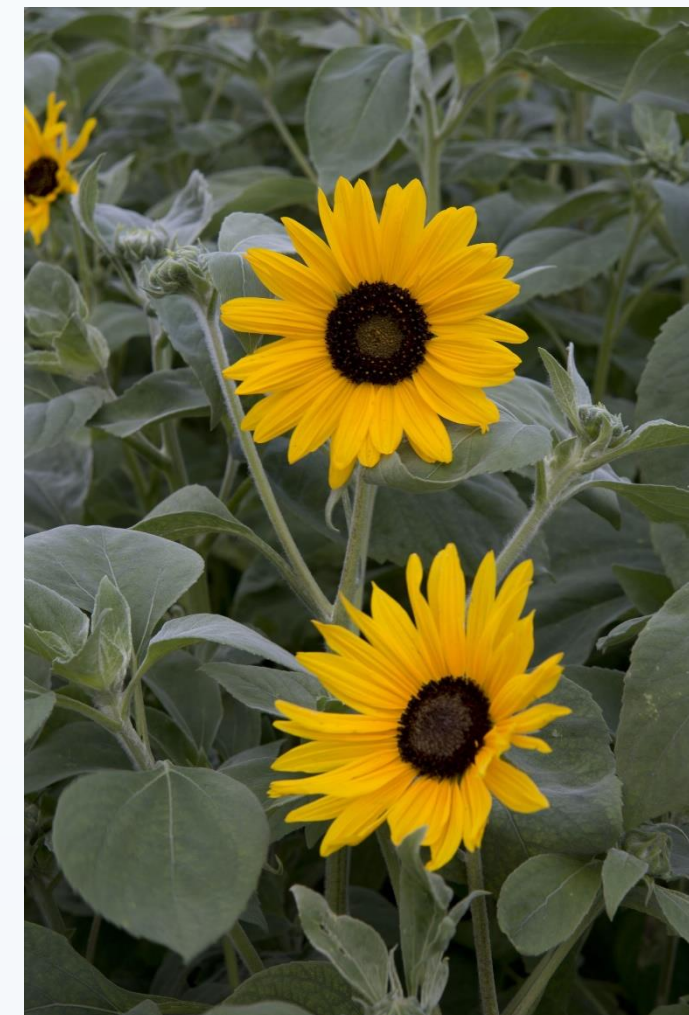
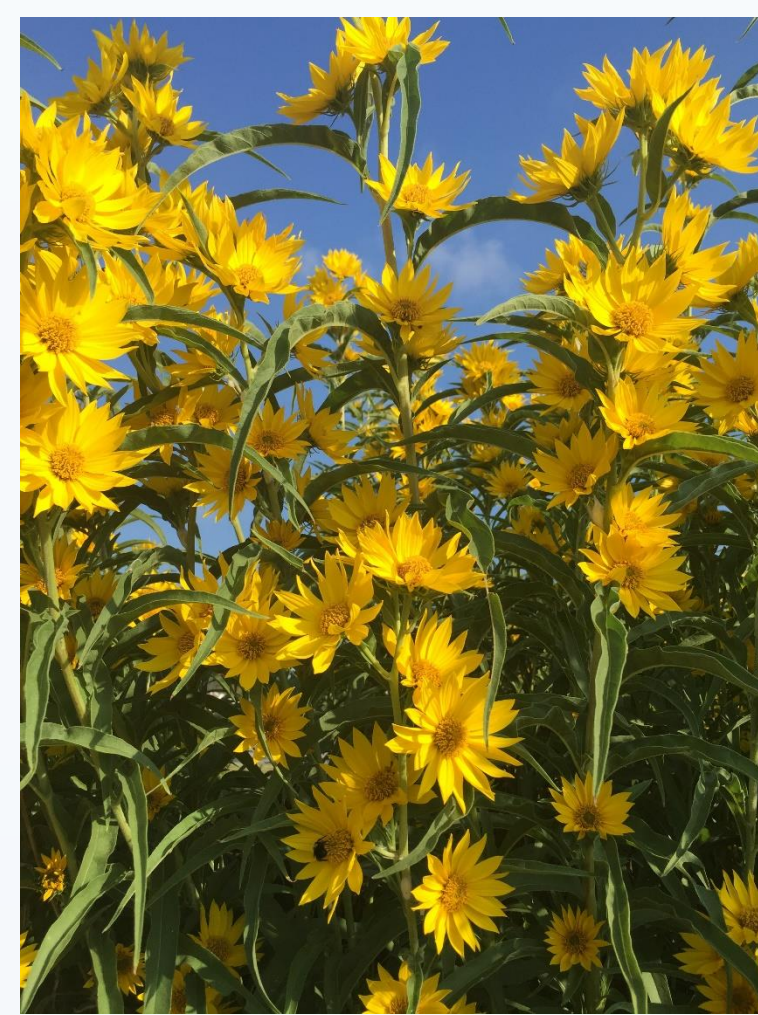


Fig. 1 - Specii sălbatice de floarea-soarelui (stânga la dreapta): *Helianthus maximiliani*, *Helianthus argophyllus*, *Helianthus neglectus*, *Helianthus debilis*.

Prođușii PCR rezultați în urma amplificării au fost puși pe gel de agaroză RU (routine use) concentrație 1.5%, colorare gel cu bromura de etidiu. Pentru a estima dimensiunea produșilor s-a utilizat 50pb DNA Ladder RTU (GeneDirex). Vizualizarea gelurilor s-a realizat cu sistemul UVITEC HD6.

Rezultate și discuții

Dintre cei 19 markeri ISSR utilizați pentru analize PCR, nouă markeri au evidențiat polimorfism (benzi clare și distincte) atât la nivelul speciilor sălbatice cât și între acestea și genotipurile cultivate de floarea-soarelui. Reacțiile PCR cu markerii ISSR UBC808, UBC823, UBC834, UBC836, UBC840, UBC845, UBC853, 17899A și 17898B au generat 249 benzi polimorfice, dintre care 95 au fost benzi polimorfice unice. Dimensiunea produșilor a variat între 150pb în cazul markerului UBC836 și a ajuns până la mai mult de 1500pb în cazul markerilor UBC808, UBC823, UBC840, 17899A și 17898B.

Numărul cel mai mare de benzi polimorfice a fost obținut în urma reacțiilor de amplificare cu markerii UBC840 (41 benzi), UBC836 (40 benzi), 17899A (33 benzi) și 17898B (33 benzi), cel mai redus număr rezultând în urma amplificării cu markerii UBC853 (14 benzi) și UBC845 (16 benzi). Cel mai mare număr de benzi polimorfice unice s-a obținut în urma amplificării cu markerii 17899A (20 benzi), UBC808 (17 benzi) și UBC840 (17 benzi). Cel mai mic număr de benzi polimorfice unice a fost obținut în urma analizei PCR cu markerii UBC853 (3 benzi), UBC845 și UBC823 (5 benzi).

Profilele genotipurilor cultivate de floarea-soarelui au fost cel mai bine evidențiate cu markerii 17899A (4 benzi unice de 275, 380, 475 și >1500 pb - **Linia 1085**; 5 benzi unice de 300, 590, 700, 920 și 980 pb - **Linia 1095**; 2 benzi de 320 și 600 pb - hibridul **Performer**) și 17898B (6 benzi unice de 470, 760, 1000, 1200, 1400 și >1500 pb - **Linia 1085**; 3 benzi unice de 950, 1500 și >1500 pb - **Linia 1095**).

Profilele genotipurilor sălbatice s-au remarcat după cum urmează: **H. maximiliani** a fost cel mai bine evidențiat cu markerii UBC834 (benzi unice de 160, 290, 375 și 800 pb) și 17899A (450, 530, 620, 1250 pb); **H. argophyllus** cu markerii UBC808 (460, 790 pb), UBC845 (380, 800 pb), 17899A (690, 1180 pb) și 17898B (490, >1500 pb). Cele cinci genotipuri de **Helianthus debilis** au fost evidențiate cel mai bine de analiza cu markerii UBC808 (profile unice de 530, 690, 900, 1450 pb - **H. debilis-4**; 410 pb - **H. debilis-1**), UBC836 (680, 800, 900 și 950 pb - **H. debilis-A3**) și 17899A (840 pb pentru **H. debilis-A2**). Profilul genotipului **Helianthus neglectus** a fost cel mai bine evidențiat de analiza cu markerii UBC808 (profile unice de 430, 550 și >1500 pb) și UBC840 (425, 890 pb).

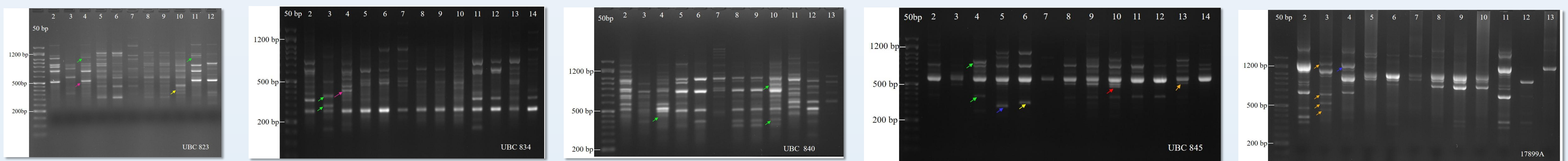


Fig. 2 - Profile electroforetice obținute în urma analizelor PCR cu markerii: UBC823, UBC834, U840, UBC845 și 17899A

Datele obținute în urma reacțiilor cu cei nouă markeri ISSR au fost procesate într-o matrice binară, prezența unei benzi fiind notată cu "1" iar absența acesteia cu "0".

Matrița obținută a fost apoi utilizată pentru construcția dendrogramei prin metoda UPGMA (Un-weighted Pair Group Method with Arithmetic Mean- <http://genomes.urv.cat/UPGMA>).

Analizând dendrograma UPGMA obținută conform distanțelor genetice dintre genotipurile cuprinse în acest studiu se poate observa gruparea celor unsprezece genotipuri în două clustere: A și B, fiecare dintre aceste două clustere separându-se în două subclustere: A1, A2 și respectiv B1, B2.

În clusterul A s-au grupat genotipurile de floarea-soarelui cultivată (*Helianthus annuus*) și specia sălbatică *Helianthus argophyllus*.

Clusterul B cuprinde toate celelalte specii sălbatice analizate în acest studiu, diferențiindu-se clar genotipul *Helianthus maximiliani*. De asemenea se observă o diferențiere clară chiar și între genotipuri de *Helianthus debilis*.

CONCLUZII

- Markerul 17899A a generat profile unice pentru speciile sălbatice *Helianthus maximiliani* și *Helianthus debilis-1* dar și pentru liniile 1095 și 1085 (*Helianthus annuus*).

- În dendrograma UPGMA se poate observa că specia sălbatică *Helianthus argophyllus* este cea mai apropiată de liniile de floarea-soarelui cultivate (*Helianthus annuus*).

- Există o similaritate între speciile sălbatice de *Helianthus debilis* și *Helianthus neglectus*, evidențiată de gruparea în același subcluster.

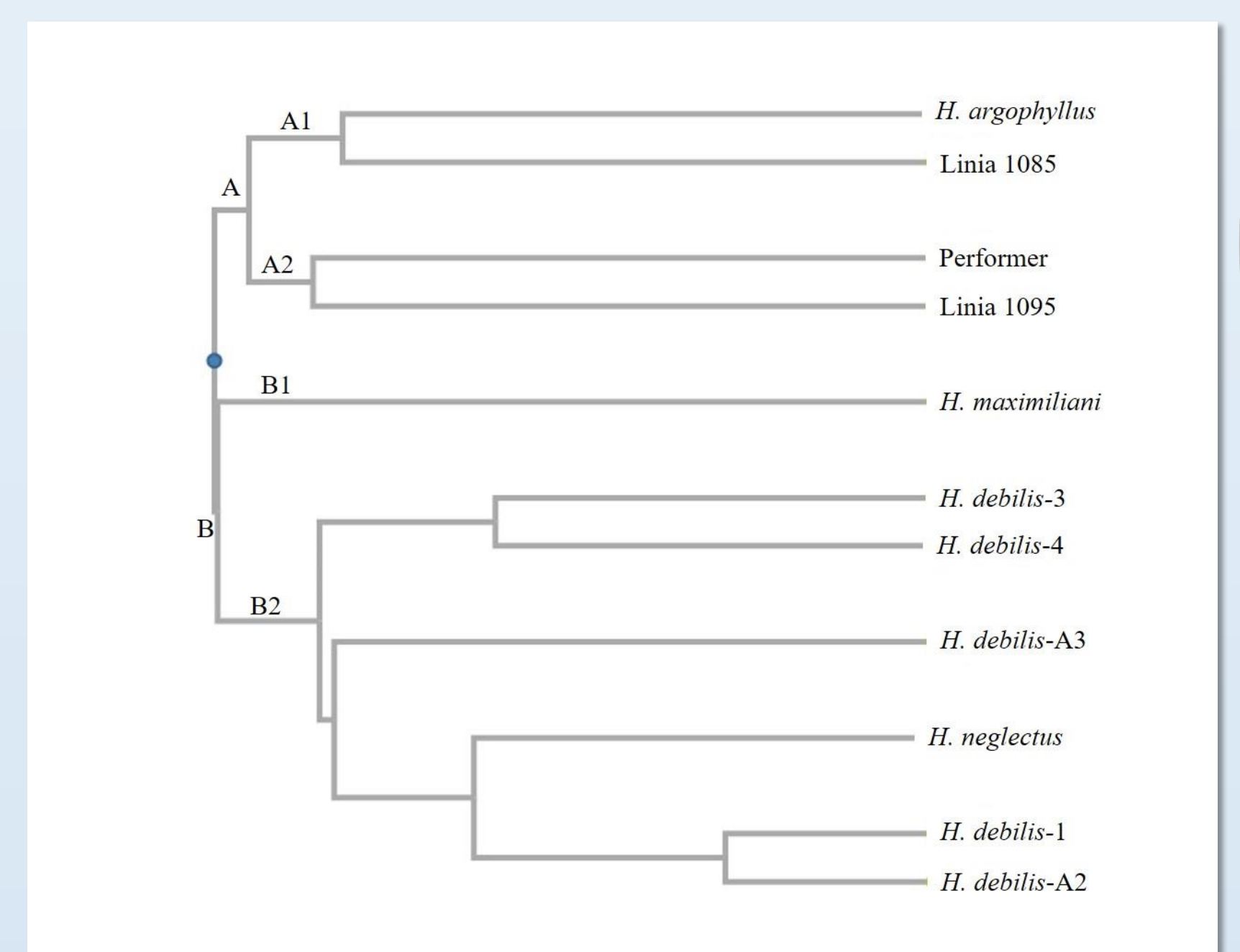


Fig. 3 – Dendrograma UPGMA conform distanțelor genetice (Jaquard) dintre soiurile sălbatice și liniile cultivate de floarea-soarelui