



ADER726 2019-2022

Cercetări privind variația genetică, analizată prin tehnologia de secvențiere de ultimă generație - NGS, la speciile legumicole și pomicole de interes economic, în vederea genotipării acestora și obținerea unei baze de date a variațiilor genetice specifice speciilor autohtone

ADER726 2019-2022

Proiect finanțat prin: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale

Tip proiect: Plan Sectorial 2019-2022 - ADER 2022

Titlul proiectului: Cercetări privind variația genetică, analizată prin tehnologia de secvențiere de ultimă generație - NGS, la speciile legumicole și pomicole de interes economic, în vederea genotipării acestora și obținerea unei baze de date a variațiilor genetice specifice speciilor autohtone

Acronim proiect: ADER 7.2.6.

Contract nr.: 7.2.6/19.09.2019

Consortiu

Coordonator: Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București/ Centrul de Cercetare pentru Studiul Calității Produselor Agroalimentare

Parteneri:

P1 - Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare Agricolă Fundulea - INCDA Fundulea

P2 - Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Pomicultură Pitești-Mărăcineni - ICDP Pitești

P3 - Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Biotehnologii în Horticultură Ștefănești-Argeș - INCDBH Ștefănești

Valoarea proiectului P1-INCDA Fundulea: 180.500 lei

Durata proiectului: 36 luni

Perioada de derulare: 19.09.2019-15.09.2022

Autoritatea Contractantă: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, Plan sectorial pentru cercetare-dezvoltare din domeniul agricol pe anii 2019-2022

Responsabil Proiect-INCDA Fundulea: Matilda Ciucă

REZUMAT

- În cadrul proiectului se urmărește optimizarea metodelor și tehnicilor de analiză moleculară a ADN-ului genomic și aplicarea acestora în analiza genotipurilor de interes economic ale unor specii legumicole și pomicole, cultivate în România. Pentru caracterizarea, selecția și ameliorarea soiurilor se vor utiliza tehnici de analiză moleculară de genotipare atât pentru studii de diversitate genetică cât și prin secvențiere, rezultând informații privind descoperirea de noi markeri moleculari (SNP) asociați cu genele de interes, pentru creșterea rezistenței plantelor la atacul de boli și dăunători, adaptarea la schimbările climatice (stres biotic și abiotic), însușiri calitative și cantitative superioare.

OBIECTIVE

- Analiza bazei de date publice existentă la nivel internațional, privind secvențele genomice identificate și caracterizate până în prezent, precum și caracterizarea fenotipică a genotipurilor luate în studiu, de către toți partenerii (CP, P1, P2, P3);
- Monitorizarea în cultură a caracterelor fenotipice a genotipurilor luate în studiu pe tot parcursul derulării proiectului (CP, P2 și P3);
- Analiza diversității genetice la soiurile autohtone selecționate de măr, prun, tomate și ardei (optimizarea metodelor de extracție a ADN-ului; analiza calității ADN-ului genomic extras; dezvoltarea și optimizarea unor metode enzimatice; selecția genotipurilor valoroase prin analiza bioinformatică a bazelor de date publice de referință, privind secvențele genomice identificate și caracterizate până în prezent pentru identificarea genelor specifice trăsăturilor fenotipice importante), sub coordonarea CP;
- Genotiparea prin secvențiere a polimorfismului nucleotidic singular (SNP), prin tehnologia NGS, sub coordonarea CP;
- Analiza bioinformatică a datelor obținute prin tehnologia NGS, pe baza programelor de identificare, stocare și distribuire a secvențelor nucleotidice utilizate în identificarea similarității structurale și funcționale a genomului analizat pentru caracterele importante din punct de vedere economic, sub coordonarea CP.

1. Optimizarea metodelor de extracție a ADN-ului genomic

Pentru a asigura implementarea cu succes a analizei PCR, optimizarea metodelor de extracție a ADN-ului genomic este prioritară, în scopul obținerii unor rezultate privind concentrația, calitatea și puritatea ADN-ului genomic de înaltă calitate. Pentru optimizarea metodelor de extracție a ADN-ului genomic, s-a folosit țesut vegetal provenit de la speciile legumicole autohtone de ardei (*Capsicum annuum*) 7 varietăți și tomate (*Solanum lycopersicum*) 9 varietăți. S-a urmărit optimizarea extracției de ADN genomic prin 3 protocoale de extracție automată și 5 protocoale de extracție manuală. Țesutul vegetal tânăr, respectiv primele frunze au fost colectate și folosite pentru extracția de ADN genomic. În urma rezultatelor obținute, CP și partenerii au selectat 3 metode optimizate, din care 1 automată și 2 manuale, care au produs cele mai bune concentrații de ADN genomic necesare activităților ulterioare.

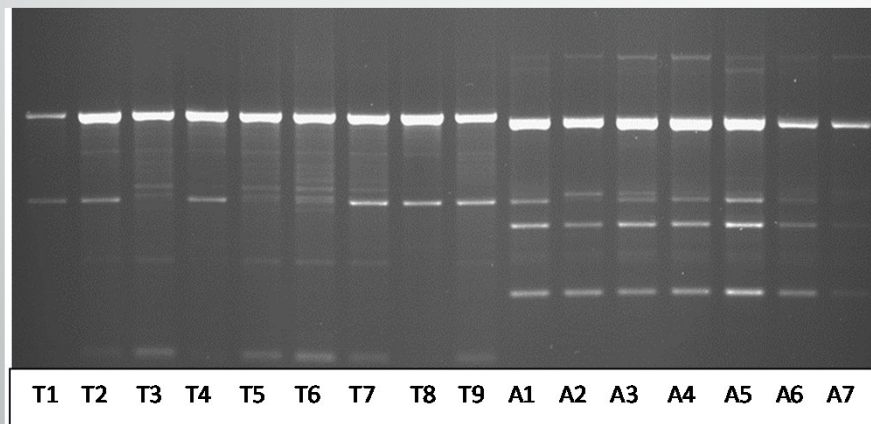
2. Analiza diversității genetice la tomate și ardei cu ajutorul markerilor moleculari pentru stabilirea identității soiurilor/hibrizilor/surselor parentale prin amprentarea genomică.

INCDA Fundulea a optimizat și utilizat următoarele tehnici pentru studiul diversității genetice: TBP, cTBP, hTBP, SRAP, ScoT, DAMD și ISSR.

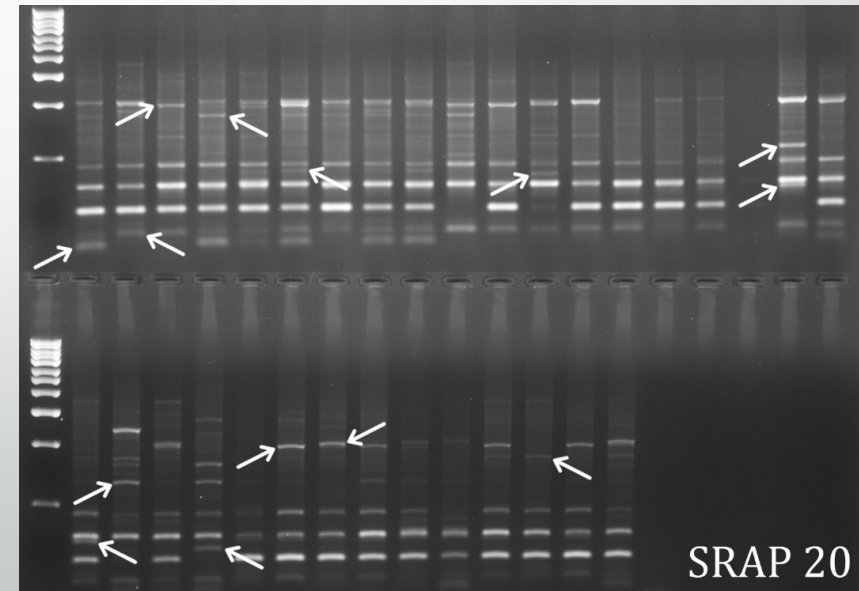
- TBP - „Tubulin based polymorphism”; TBP combinatorie (cTBP); h-TBP (“horse-TBP”)
- SRAP - “Sequence-Related Amplified Polymorphism”
- SCoT - “Start Codon Targeted Polymorphism”
- DAMD -PCR - „Directed Amplification of Minisatellite-Region”
- ISSR - „Inter Simple Sequence Repeat Markers”

REZULTATE

- Toate tehnicile utilizate (TBP, cTBP, hTBP, SRAP, ScoT, DAMD și ISSR) au generat polimorfism, mai puțin tehnica TBP, în cazul tomatelor.
- Tehnica TBP și cu variantele cTBP și hTBP, pe baza rezultatelor din această fază, sugerează a fi cele mai promițătoare tehnici în stabilirea identității soiurilor/hibrizilor/surselor parentale prin amprentarea genomică la ardei.
- Pentru analiza variabilității genetice de la nivelul genomului de prun au fost optimizate și testate 4 tehnici moleculare (ISSR, TBP, SRAP și SCoT).



Profile electroforetice pe gel de agaroză pentru tomate (T) și ardei (A) obținute cu SRAP95



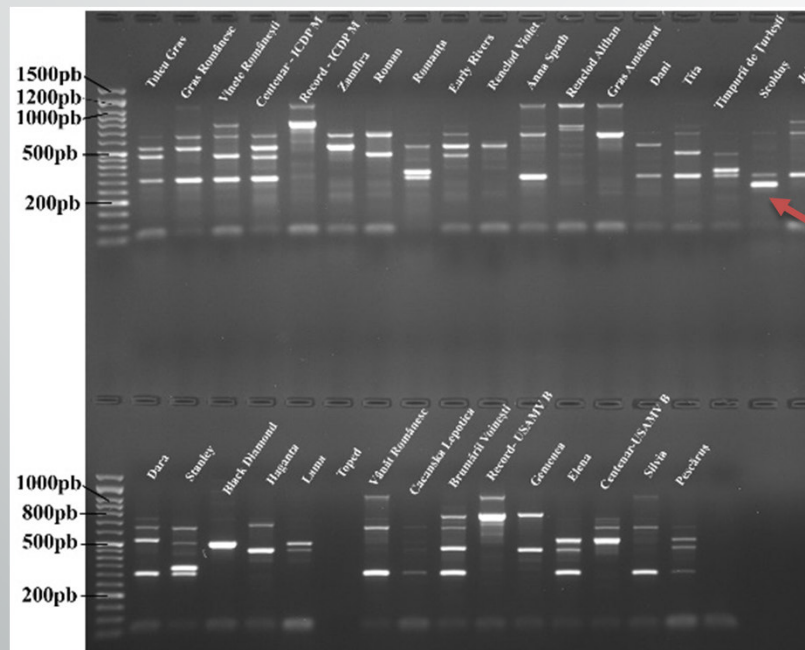
Profile electroforetice pe gel de agaroză pentru 33 soiuri de prun obținute cu SRAP20

REZULTATE

Arborii din genul *Prunus* au un sistem de auto-incompatibilitate gametofitică. Cu toate acestea, spre deosebire de alte specii de *Prunus*, prunul domestic are sisteme de incompatibilitate atât sporofitice, cât și gametofitice (Botu și colab., 2002). Incompatibilitatea sporofitică este determinată de o mutație de la nivelul locusului responsabil de formarea polenului și sterilitatea citoplasmatică, iar sistemul de incompatibilitate gametofitică se bazează pe polimorfismul alelelor din gena care codifică S-RNază (gena S) și determină trei tipuri de polenizare: compatibilitate completă, compatibilitate parțială și incompatibilitate completă (Botu și colab., 2002). Datorită genomului cu trei componente, este dificil să găsești aceeași formulă sau structură alelică pentru două soiuri de prun domestic, deoarece fiecare genom are propria sa genă S cu alele multiple. Din acest motiv, orice soi de prun care are polen fertil poate poleniza oricare alt soi, dar în grade diferite (Selesses și Bonnet, 1994). Separarea soiurilor de prun domestic pe grupe de compatibilitate nu este încă definită și nu există informații clare despre diversitatea genetică a auto-incompatibilității alelice. Diversitatea genetică și datele privind structura populației pot fi utile pentru determinarea strategiilor de ameliorare în *Prunus domestica*.

REZULTATE

- Analiza variabilității genetice de la nivelul locusului S a evidențiat o nouă variantă alelică pentru soiul local Scolduș.



Profil electroforetic -intron II- PruC2/PCER

Pentru o grupare corectă a soiurilor de prun pe grupe de incompatibilitate gametică este necesară și analiza unor martori foarte bine caracterizați fenotipic pentru aceste caractere.

Aceste informații vor fi valoroase pentru selectarea genotipurilor parentale în programele de ameliorare și pentru selecția adecvată a soiurilor din livezi.

3. Analiza bioinformatică a secvențelor nucleotidice obținute prin tehnologia NGS, pentru identificarea de markeri moleculari tip SNPs-single nucleotide polymorphisms.

La tomate, au fost creați patru markeri KASP pentru detectarea SNP-urilor de la nivelul locusului *Ve*, implicat în rezistența tomatelor la *Verticillium dahliae* și *V. albo-atrum* (Fradin și colab., 2009). Acești markeri vizează următoarele poziții:

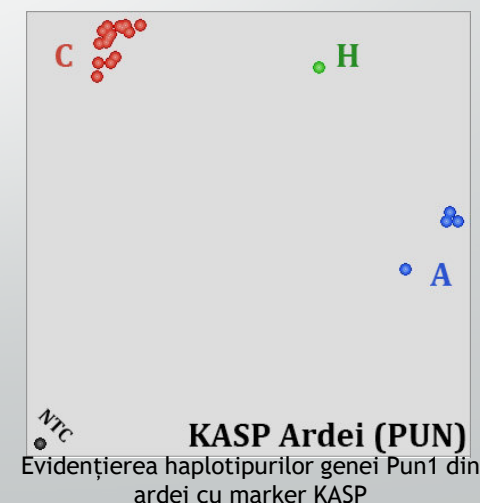
- SNP1-poziția 380 cu următoarele variante de SNP [C/A] ce determină schimbări în succesiunea aminoacizilor din lanțul proteic.
- SNP2- poziția 610 cu variantele [A/T].
- SNP3-poziția 706 cu variantele [T/A].
- SNP4-poziția 1220 cu INDEL [In -TCAGAG/Del - T_AGAG] ce determină apariția unui codon STOP.

În cadrul acestui proiect au fost efectuate analize KASP la ardei și cu privire la variabilitatea genetică de la nivelul genei *Pun1* implicată în conținutul de capsaicină ce determină gustul iute la ardei. Utilizarea markerului KASP 2_25, de la nivelul locusului CA02g19240 (patent China - CN107151709A), a permis separarea probelor de ardei în genotipuri cu gust dulce (CC-*punpun*) și genotipuri cu gust iute (AA-*PunPun*) mai mult s-a observat că proba lancu F1 prezintă ambele variante alelice (AC-*Punpun*)

REZULTATE

Rezultate privind variabilitatea genetică de la locusul *Ve* la tomate

Material biologic	SNP1-380	SNP3-706	Genotip
T1 - KRISTINICA	C	T	VeVe
T2 - FLORINA	C	T	VeVe
T3 - ANDRADA	A	A	veve
T4 - BUZĂU-1600	C	T	VeVe
T5 - BUZĂU 47	A	A	veve
T6 - ARGES 11	h?	h?	H
T7 - ARGES 20	h	h	H
T8 - ȘTEFĂNEȘTI 24	h	h	H
T9 - ȘTEFĂNEȘTI 22	A	A	veve



REZULTATE

Adesea, în funcție de obiectivele de ameliorare a ardeiului, în special privind calitatea, selecția se realizează după ce fructele de ardei sunt coapte, din acest motiv acest tip de selecție este relativ consumatoare de timp. Ca sprijin la această metodă, markerii moleculari permit selecția indirectă a resurselor genetice, scurtează procesul de ameliorare și îmbunătățește eficiența ameliorării. De asemenea, acești markeri pot fi folosiți cu succes în transferul genei țintă.

Nr.crt.	Soi/hibrid de ardei	SNP-la nivelul genei <i>Pun1</i>	Genotip
1	Barbara	CC	<i>punpun</i>
2	Cantemir	CC	<i>punpun</i>
3	Galben superior	CC	<i>punpun</i>
4	Andreika	CC	<i>punpun</i>
5	Hildi	CC	<i>punpun</i>
6	Cosmin	CC	<i>punpun</i>
7	Mircea	CC	<i>punpun</i>
8	Alexandru	CC	<i>punpun</i>
9	Napoca F1	CC	<i>punpun</i>
10	Splendens	CC	<i>punpun</i>
11	Ștef	CC	<i>punpun</i>
12	Vlad	CC	<i>punpun</i>
13	Pintea	AA	PunPun
14	Dracula	CC	<i>punpun</i>
15	Iancu F1	H (AC)	<i>Punpun</i>
16	Decebal	AA	PunPun
17	Vladimir	AA	PunPun
18	Royal	AA	PunPun
19	Mihnea	CC	<i>punpun</i>

REZULTATE

De asemenea, s-au obținut informații privind secvența genei SFB “S-haplotype-specific F-box”, cu rol în incompatibilitatea gametică, de la prunul hexaploid (*Prunus domestica*), prin tehnica de secvențiere automata.

Analiza comparativă a secvenței de nucleotide, obținută prin secvențierea produsului PCR rezultat din amplificarea ADN cu primerii PsSFB-F1/PsSFB-R1 (Ps- *Prunus salicina*) pentru soiul de prun hexaploid **Tuleu Gras**, cu secvențe de nucleotide din baze de date internaționale (DDBJ/GenBank/EMBL/ NCBI) aferente unor variante alelice ale genei SFB, AB111518 (*Prunus avium* PaSFB 1), AB111519 (PaSFB 2), AB111520 (PaSFB 5), AB111521 (PaSFB 4), DQ849084 (*Prunus salicina*-PsSFBc), DQ849090 (PsSFB10), DQ849118 (PsSFBh) și HQ913633 (*Prunus pseudocerasus* -SFB4) a evidențiat SNP-uri care diferențiază secvența din soiul Tuleu Gras de celelalte la nivelul pozițiilor 60-61-62-64 AAAAT/TGCAA (Tuleu Gras). De asemenea, s-a observat heterogenitate în soiul românesc față de secvențele analizate. Exemple de astfel de poziții se pot observa clar la 502: A (în toate secvențele din baze de date internaționale analizate)/R (A+G) în Tuleu Gras, 591 G/R, 599 C/M (A+C), 628 C/M, 630 și 641 G/R, 684 și 687 T/Y (C+T), etc. Totodată s-a observat că deleția de trei nucleotide de la poziția 910-912 prezentă în Tuleu Gras s-a remarcat și în variantele alelice PaSFB 1, PaSFB 4, PsSFB10 și *Prunus pseudocerasus* -SFB4.

DISEMINARE

1.Ciucă Matilda, Turcu Alina-Gabriela, Conțescu Elena-Laura și Cristina Daniel. Metodă adecvată pentru extracția de ADN din semințe și frunze pentru studii genetice la grâu (*Triticum aestivum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) și ardei (*Capsicum annuum*). Analele Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea Vol.88/2020.

2.Conțescu, E.L., Ciucă, M., Turcu, A.G., Cristina, D., 2021. Genetic analysis of some tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes by TBP and SCoT marker systems. *Lucrări Științifice Seria Horticultură*, 64(1) 141-146. USV IAȘI. SSN - L = 1454 - 7376, ISSN (print) 1454 - 7376, ISSN (electronic) 2069 - 8275.

3.Matilda, Ciucă, Butac Mădălina, Conțescu Elena-Laura, Turcu Alina-Gabriela, Iordăchescu Mihaela, and Cristina Daniel. "Study of genetic diversity in plum genotypes using SRAP markers." (2022): *FRUIT GROWING RESEARCH* (Online ISSN 2344-3723, ISSN-L 2286-0304; CD ISSN 2286-0304; Print ISSN 2602-1978): VOL. XXXVII/2022.70-75.

Participare la Workshop-ul on-line pe Zoom (2020): Genotiparea speciilor autohtone și beneficiile unei baze de date a variațiilor genetice specifice, cu o comunicare științifică din rezultatele proiectului: Tehnici moleculare utilizate în studii de diversitate genetică.

Participare la Workshop-ul „Variația genetică a speciilor legumicole și pomicole - resursă esențială în ameliorare”, din data 20 iulie 2022.

Prezentare orală- “Evidențierea diversității genetice la soiuri de ardei, tomate și prun cu ajutorul markerilor SRAP și ScoT”. Autori: Conțescu Elena-Laura, Cristina Daniel, Turcu Alina, Ciucă Matilda