

Lucrarea de laborator 2

GENETICA (51 puncte)

Identificarea genomului liniilor somaclonale a porumbului din resurse genetice vegetale al Republicii Moldova cu folosirea metodelor biochimice.

Actualmente în Laboratorul Resurse Genetice Vegetale al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor A.Ș.M. sunt transmise pentru conservare semințe a 19 (nouăsprezece) genotipuri de porumb din colecția genetică a liniilor somaclonale create în două centre științifice al Moldovei (UASM și IF „Porumbeni”).

Pentru efectuarea acestei lucrări practice au fost luate sapte linii somaclonale, obținute din cultura de calus a embionilor imaturi a liniei originale de porumb BC.

S-a efectuat pașaportizarea genomului a acestor linii somaclonale la nivelul proteic și două tipuri de ADN-markeri după următoarele metode:

- 1) metoda markerilor proteinei de rezervă a endospermului de porumb (zeina);
- 2) RAPD-analiza – tehnica de amplificare a ADN-ului genomic utilizând un *primer** incidental (întâmplător) pe baza PCR-ului (reacției în lanț cu polimeraza);
- 3) ISSR-analiza - tehnica de identificare a genomului pe baza PCR-ului, în care sunt utilizate în calitate de *primeri* (o secvență scurtă de ARN sau un segment monocatenar de ADN, care funcționează în calitate de punct de creștere în polimerizare) fragmente simple de succesiune nucleotidice repetate în tandem.

Fiecare din aceste metode sunt elaborate pe baza folosirii unui din cele mai principale caracteristici a proteinelor și ADN-ului – **polimorfismului**, studierea cărora se efectuează datorită metodei electroforetice (EF).

Rezultatele de modelare computerizată a spectrelor electroforetice a liniilor somaclonale de porumb, care au fost create pe baza liniei originale BC sunt prezentate pe urmatoarele trei scheme (priviți ANEXE 1,2,3 și SETURI 1,2,3):

ANEXA 1 - Fig.1: markarea electroforetică după proteina de rezervă a porumbului (zeina);

ANEXA 2 - Fig.2: markarea electroforetică după RAPD-analiza ADN-ului;

ANEXA 3 - Fig.3: markarea electroforetică după ISSR-analiza ADN-ului.

Seturile de matrici computerizate a benzilor electroforetice (EF), care caracterizează profilurile electroforetice (EF) a liniilor somaclonale de porumb, cu notarea **standardelor interne (St)** ale formelor moleculare (FM) studiate:

Setul № 1 - "Zeina" - profilurile proteice (zeinice) a liniilor somaclonale și liniei originale BC;

Setul № 2 - «RAPD» - RAPD–profilurile a liniilor somaclonale și liniei originale BC;

Setul № 3 - «ISSR» - ISSR- profilurile a liniilor somaclonale și liniei originale BC.

PROTOCOLUL DE LUCRU

Partea I. Efectuarea calculelor (tabelele 1, 2 și 3).

1. Faceți cunoștință cu structura tabelelor 1, 2, 3, care au fost elaborate cu scopul efectuării analizei comparative a pașapoartelor electroforetice a fiecărei liniei somaclonale de porumb (C5; C15; C51; C54; C55; C56; și C57) paralel cu linia originală BC.

2. În rubrica B (tabelele 1, 2, 3) sunt prezentate caracteristicile cantitative a spectrelor electroforetice: *numărul total* a formelor moleculare (FM) a proteinei (tabelul 1) și formelor moleculare (FM) a ADN-

ului (tabelele 2 și 3). Calculați valoarea medie a numărului total a FM a proteinei și FM a ADNului și includeți în rubrica B a tabelelor 1, 2, 3.

3. Calculați numărul *formelor moleculare* din spectrul electroforetic a fiecărei linii somaclonale studiate, care sunt similare cu *formele moleculare* din spectrele electroforetice a liniei originale, includeți în rubrica C a tabelelor 1, 2, 3 și calculați valoarea medie a lor.

4. Calculați numărul *formelor moleculare noi* din spectrul electroforetic a fiecărei linii somaclonale studiate, care suplimentează în spectru EF corespunzător formele moleculare similare cu spectrul electroforetic a liniei originale, includeți în rubrica D a tabelelor 1, 2, 3 și calculați valoarea medie a lor.

5. Calculați pentru fiecare linie somaclonală procentul (%) *formelor moleculare*, care sunt similare cu formele moleculare din spectrele electroforetice a liniei originale (E_{somaclon}) după următoarea formulă:

$$E_{\text{somaclon}}, \% = C_{\text{somaclon}} \times [100 / B_{\text{original}}]$$

Rezultatele obținute includeți-le în rubrica E a tabelelor 1, 2, 3.

6. Calculați pentru fiecare linie somaclonală procentul (%) de forme moleculare noi în spectrul electroforetic a somaclonului corespunzător (F_{somaclon}) după formula:

$$F_{\text{somaclon}}, \% = [D_{\text{somaclon}} / B_{\text{somaclon}}] \times 100$$

Rezultatele obținute includeți-le în rubrica F a tabelelor 1, 2, 3.

7. Calculați valoarea medie în rubricile **E**, **F** în fiecare tabel de lucru 1, 2, 3.

TABELE
pentru efectuarea calculului după spectrele electroforetice, care sunt prezentate pe fig. 1, 2, 3.

Tabelul 1. Gradul de asemănare și deosebire între profilurile proteice a liniilor somaclonale de porumb și linia lor originală BC (după numărul total a formelor moleculare a proteinei – FMP).

Somaclonul	Numărul total a FMP	Numărul FMP		Numărul FMP (în % de la linia-originală)	
		Similar cu FMP a liniei-originale	noi	Similar cu FMP a liniei-originale	noi
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
Linia-originală	12	12	0	100	0
C 5	13				
C 15	13				
C 51	11				
C 54	12				
C 55	8				
C 56	9				
C 57	13				
<i>media</i>					

Tabelul 2. Gradul de asemănare și deosebire între RAPD-profilurile liniilor somaclonale de porumb și linia lor originală BC (după numărul total a formelor moleculare a ADNului – FM-ADN).

Somaclonul	Numărul total a FM-ADN	Numărul FM-ADN		Numărul FM-ADN (în % de la linia-originală)	
		Similar cu FM-ADN a liniei-originale	noi	Similar cu FM-ADN a liniei-originale	noi
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
Linia-originală	27	27	0	100	0
C 5	23				
C 15	27				
C 51	29				
C 54	28				
C 55	30				
C 56	31				
C 57	27				
<i>media</i>					

Tabelul 3. Gradul de asemănare și deosebire între ISSR-profilurile liniilor somaclonale de porumb și linia lor originală BC (după numărul total a formelor moleculare a ADNului – FM-ADN).

Somaclonul	Numărul total a FM-ADN	Numărul FM-ADN		Numărul FM-ADN (în % de la linia-originală)	
		Similar cu FM-ADN a liniei-originale	noi	Similar cu FM-ADN a liniei-originale	noi
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
Linia-originală	26	26	0	100	0
C 5	22				
C 15	23				
C 51	19				
C 54	18				
C 55	21				
C 56	18				
C 57	27				
<i>media</i>					

Partea II. Analiza rezultatelor obținute și formularea concluziilor

1. Prin utilizarea datelor calculate, care sunt prezentate în rubrica **B** a tabelelor 1, 2, 3 – *completați tabelul 4, rândul 2 (12 puncte)*. În rândul 3 a acestui tabel indicați metoda (***) , care s-a evidențiat după gradul maximal de polimorfism proteic sau a ADN-ului (*1 punct*).
2. Prin utilizarea datelor calculate, care sunt prezentate în rubrica **E** a tabelelor 1, 2, 3 – *completați tabelul 5, rândul 2 (12 puncte)*. În rândul 3 a acestui tabel indicați metoda (***) , care este cea mai acceptabilă pentru identificarea asemănării (potrivirei) genetice a liniilor somaclonale de porumb cu linia originală (*1 punct*).
3. Prin utilizarea datelor calculate, care sunt prezentate în rubrica **F** a tabelelor 1, 2, 3 – *completați tabelul 6, rândul 2 (12 puncte)*. În rândul 3 a acestui tabel indicați metoda (***) , care este cea mai acceptabilă pentru identificarea la nivelul proteic sau molecular a abaterilor în genomul liniilor somaclonale de porumb de la genomul liniei originale BC (*1 punct*).
4. În rândul 4 a fiecărui tabel 4,5,6, - scriți concluzia personală despre datele obținute (4 puncte pentru fiecare tabel = *12 puncte*).

TABELE pentru formularea concluziilor

Tabelul 4. Compararea eficacității metodelor de identificare a genomului după caracteristicile electroforetice cantitative a formelor moleculare proteice sau de ADN la variantele somaclonale a porumbului și linia lor originală.

Metoda	Somaclone	Analiza electroforetică a proteinelor	Analiza electroforetică a AND-ului	
			RAPD- analiza	ISSR-analiza
1.	Linia-originală	12	27	26
2.	medie			
3. Indicați metoda, care este cea mai sensibilă pentru evidențierea polimorfismului maximal a proteinelor sau a ADN-ului				
4. Concluzii:				

Tabelul 5. Compararea eficacității metodelor de identificare a genomului la nivel proteic și molecular pentru a stabili asemănările maximale între liniile somaclonale de porumb și linia lor originală.

Metoda	Somaclone	Analiza electroforetică a proteinelor (în %)	Analiza electroforetică a AND-ului (în %)	
			RAPD- analiza	ISSR-analiza
1.	Linia-originală	100	100	100
2.	medie			
3. Indicați metoda cea mai acceptabilă pentru evaluarea asemănărilor.				
4. Concluzii:				

Tabelul 6. Compararea eficacității metodelor de identificare a genomului la nivel proteic și molecular pentru a stabili abaterile maximale între liniile somaclonale de porumb și linia lor originală.

Metoda	Somaclone	Analiza electroforetică a proteinelor (în %)	Analiza electroforetică a AND-ului (în %)	
			RAPD- analiza	ISSR-analiza
1.	Linia-originală	0	0	0
2.	medie			
3. Indicați metoda cea mai acceptabilă pentru evaluarea abaterilor.				
4. Concluzii:				