

MARCHERI GENETICI MOLECULARI AI SPECIILOR FORESTIERE

Asist. dr. Lucău-Dănilă Ancuța Mihaela
Facultatea de Silvicultură Suceava

Introducere

Resursele și variabilitatea genetică a arborilor forestieri sunt încă destul de puțin cunoscute. Pe plan fundamental, dezvoltarea tehnicilor de marcaj molecular deschide noi căi de investigare a diversității genetice a arborilor. Aceste metode interesează în egală măsură silvicultura și ameliorarea speciilor de interes practic.

Cercetarea în domeniul geneticii forestiere vizează două categorii de specii. Prima categorie cuprinde speciile cu ciclu de viață scurt (între 40 și 100 de ani) care dețin un loc important în economie: molid, brad, pini, plop. Aceste specii fac obiectul unor programe de selecție pe termen lung, care includ mai multe generații și se bazează pe genetica cantitativă și pe teoria selecției. Cea de-a doua categorie cuprinde speciile cu longevitate mare, pentru care este mai dificil de definit obiectivele selecției, precum și speciile al căror interes economic este mai puțin important. În acest grup se încadrează stejarii, fagul, speciile de altitudine. Nici un program de selecție nu a fost angajat pentru aceste specii; au fost realizate împăduriri și reîmpăduriri cu semințe obținute din pădurile actuale, nu din varietăți ameliorate. În acest context își găsesc o foarte utilă aplicabilitate marcherii moleculare care permit studiul diversității genetice și posibilitățile de selecție în cadrul unor programe de ameliorare.

Organizarea diversității (variabilității genetice)

În concepția modernă se recunosc două tipuri de variații individuale și anume: variații determinate genetic și variații induse de mediu.

Variațiile determinate genetic sunt cele generate de acțiunea materialului ereditar

(ADN) caracteristic fiecărui individ; acestea pot fi variații discontinue și variații continue. Variațiile discontinue se evidențiază prin forme sau clase distincte, în cadrul aceleiași specii, fără treceri gradate între ele, așa cum sunt, de exemplu, variațiile rasiale, ecotipice sau cele polimorfice. Variațiile continue sau clinale sunt reprezentate de o diversitate care se realizează gradat, fără clase distincte de fenotipuri, în funcție de anumiți factori de mediu care variază treptat.

Variațiile determinate de mediu (variații neereditare) sunt variații discontinue numite și "modificații", care nu au o bază genetică, fiind produse exclusiv sub acțiunea mediului. Nefiind fixate genetic, aceste variații se transmit la arbori numai pe calea înmulțirii vegetative.

Arborii manifestă nivele de diversitate genetică ridicate comparativ cu alte organisme. Menținerea acestei diversități este o garanție a perenității pădurilor, în special în contextul unor posibile schimbări climatice sau în condițiile fenomenului de poluare și degradare a mediului care se accentuează în prezent tot mai mult. Cercetările care au fost întreprinse pentru precizarea organizării diversității genetice la diferite niveluri ierarhice (arie de distribuție, pădure, populație) au pus în evidență factorii biologici dar și factorii antropici ai acestei diversități.

Studiul variabilității genetice interpopulaționale prezintă o dublă importanță, fundamentală și aplicată. O suprafață însemnată de pădure este regenerată plecând de la material de împădurire provenit din păduri naturale, respectiv din rezervații de semințe alese în funcție de proprietățile lor fenotipice particulare (creștere, omogenitate, formă). De câteva zeci de ani au fost instalate și plantații experimentale. Ele servesc la aprecierea

variabilității caracterelor silviculturale ale populațiilor din care provin și în plan practic, la identificarea celor mai bune surse de semințe pentru reîmpăduriri. Aceste plantații experimentale sunt de asemenea excelente mijloace pentru studiile de genetică a populațiilor: ele cuprind un eșantion de populații de pe ansamblul ariei de distribuție a unei specii. Compararea lor în plan molecular și fenotipic permite înțelegerea evoluției populațiilor de arbori forestieri.

Metode de interceptare a variabilității genetice la arbori

Studiul variabilității genetice în populațiile de arbori debutează în anii 1930-1940, când s-au înființat primele culturi comparative de proveniențe în care erau testate o serie de performanțe morfo-anatomice și fiziologice ale arborilor. Numai recent, de circa 20 de ani, au început să se studieze în acest scop, marcheri genetici de diferite tipuri, odată cu dezvoltarea tehnicilor de laborator corespunzătoare.

În prezent, studiul variabilității genetice în populațiile de arbori se bazează pe următoarele metode (figura 1):

1. Studiul indicatorilor morfologici, anatomici și fiziologici înregistrați în populații naturale sau în culturi comparative de proveniențe. Acești indicatori sunt supuși influențelor mediogene într-un grad foarte ridicat, știut fiind faptul că realizarea fenotipului presupune interacțiunea dintre genotip și mediu (relația $F=G+M$). Din această cauză, estimarea variabilității genetice pe baza lor este dificil de realizat; adesea, caractere morfologice identice pot fi generate de gene diferite care se exprimă similar într-un anumit mediu; alteleori, gene identice pot genera fenotipuri diferite sub acțiunea unui mediu specific.

2. Studiul izoenzimelor, considerate marcheri biochimici foarte importanți datorită faptului că ei reprezintă compuși primari ai activității genelor și au un control alelic simplu, bialelic sau codominant. Influențele mediului nu se fac simțite la nivelul izoenzimelor, ceea ce face din acești marcheri instrumente precise

și rapide, foarte mult utilizate pentru estimarea variabilității genetice a arborilor.

3. Studiul terpenelor, marcheri biochimici care reprezintă produși secundari ai activității genelor (pentru sinteza lor intervin numeroase enzime), ceea ce face ca acești marcheri să aibă un control genetic mai greu de estimat.

4. Studiul marcherilor moleculari ADN prin diferite metode ale biologiei moleculare. Acești marcheri relevă fidel variabilitatea genetică, nefiind supuși influențelor mediului. Analiza directă a genelor, cartarea genomului, detectarea și secvențierea diferitelor fragmente de ADN nuclear, cloroplastic sau mitocondrial, sunt metode de o precizie și o rapiditate de diagnostic fără precedent, reprezentând instrumentele cele mai valoroase pentru studiul diversității genetice, dar și pentru cercetarea evoluției istorice (filogeniei), a taxonomiei, a fluxului genic în populații. Recent, acești marcheri au început să fie utilizați pentru analiza efectelor selecției în populațiile de arbori, rezultatele fiind remarcabile.

Marcherii moleculari (ADN)

Baza moleculară a metodelor de marcarea moleculară o reprezintă însăși molecula de ADN, suportul fizic al eredității. ADN este unic pentru fiecare individ și constituie materialul principal de construcție a cromozomilor din nucleul fiecărei celule.

Dezvoltarea tehnicilor de identificare a polimorfismului ADN cu ajutorul așa-numitelor "amprente genetice", a permis identificarea unui număr considerabil de loci genici și studierea mult mai amplă și precisă a variabilității genetice la arbori. Vizualizarea amprentelor genetice se realizează prin două strategii de bază și anume: prin metoda clasică de hibridizare a ADN sau prin amplificare.

Metoda clasică de hibridizare a ADN presupune parcurgerea următoarelor etape (figura 2):

- tăierea ADN genomic cu ajutorul unor enzime de restricție*;
- separarea electroforetică a fragmentelor ADN rezultate, în funcție de mărimea lor;

- detectarea la nivelul benzilor electroforetice a locilor genici polimorfici (cei care prezintă variații); orice mutație care produce o modificare în mărimea segmentului ADN, de exemplu adății, deleții, translocării de nucleotide, va conduce la o modificare mai mare sau mai mică a distanței de migrare electroforetică a fragmentelor respective;

- fragmentele ADN găsite variabile (polimorfice) sunt ulterior transferate pe membrane de suport și hibridizate fie cu sonde** ADN de secvență cunoscută și marcate radioactiv sau neradioactiv pentru a putea fi ușor identificate, fie cu sonde reprezentate de așa-numiții sateliți, mini-, micro- sau midisateliți***. În acest fel pot fi urmărite anumite fragmente de ADN cu secvență cunoscută. Această tehnică este mereu perfecționată și la ora actuală este cunoscută sub denumirea de **RFLP** (restriction fragment length polymorphisms) sau polimorfismul fragmentelor lungi de restricție.

Metoda de analiză a markerilor ADN prin amplificare se bazează pe procedeul **PCR** (polimerase chain reaction) sau reacția de polimerizare în lanț. Acest procedeu presupune amplificarea "in vitro" a anumitor secvențe de ADN cu ajutorul unor oligonucleotide (primeri sau amorse) specifice sau arbitrare și cu ajutorul unei ADN-polimeraze termostabile. Separarea electroforetică a segmentelor de ADN amplificate și detectarea benzilor polimorfice reprezintă strategia de bază a acestei metode care poartă denumirea de **RAPD** (random amplified polymorphic DNA) sau ADN polimorfic amplificat randomizat (figurile 3 și 4).

Ambele metode au cunoscut numeroase modificări și adaptări pentru identificarea cu mare acuratețe a amprentelor genetice la diferite specii de plante și animale; recent, acești markeri au început să fie utilizați cu rezultate spectaculoase în realizarea diagnosticului molecular la nivelul genomului uman.

Markerii moleculari (ADN) se caracterizează printr-o serie de proprietăți care îi recomandă ca instrumente deosebit de utile în studiul variabilității genetice a speciilor, în cartarea genomului, în studiile de filogenie și

taxonomie; printre aceste proprietăți se numără: înaltul polimorfism, moștenirea codominantă (permițând discriminarea stărilor de homo- și heterozigoție la organismele diploide), frecvența mare în genom, distribuția uniformă în tot genomul, comportamentul exclusiv neutru (nu manifestă fenomene de pleiotropie), accesul facil (procedură de obținere relativ simplă și automatizată), certitudinea și reproductibilitatea foarte mare a rezultatelor.

Pentru a surprinde efectele selecției, respectiv determinismul caracterelor adaptative, au fost abordate două metode de studiu al markerilor ADN și anume: cercetarea markerilor în încrucișări și cercetarea markerilor în populațiile naturale.

Cercetarea markerilor molecu-lari în încrucișări

Această metodă numită și QTL (Quantitativ Trait Loci) presupune construirea unei hărți genetice bazate pe conșegregarea markerilor în încrucișări controlate (în F2 prin back-cross sau retroîncrucișare); se cercetează regiunile ADN implicate în exprimarea caracterelor adaptative care pot da diferențe între populații. Această metodă presupune analiza exemplarelor din generația a doua F2 rezultate în urma unor retroîncrucișări (încrucișări cu unul din genitorii inițiali sau back-cross), pornind de la două populații care se cercetează. Metoda riscă să nu identifice decât un număr limitat de markeri implicați în discriminare: numai markerii polimorfici sunt identificați (markerii care diferă între cei doi părinți folosiți la hibridare). Se pornește de la ipoteza că alelele corespunzătoare acestor markeri polimorfici, sunt fixate total în cele două populații. Ținând cont de importanța fluxului genic între populații și istoria lor recentă, este foarte probabil ca alelele să nu fie fixate dar să aibă frecvențe diferite între cele două populații.

Această metodă este aplicată în Franța pentru pinul maritim, în încrucișări ale exemplarelor din F2 rezultate din hibridarea între o populație corsicană și alta din land; caracteristicile lor forestiere sunt distincte: rectitudinea trunchiului este caracteristică

populației corsicane și viteza de creștere este caracteristică populației din land.

Cercetarea markerilor moleculari în populațiile naturale

Markerii cu diferențe în ce privește frecvențele alelice între populații pot fi cercetați direct în populațiile naturale, fără a cunoaște rolul lor eventual în determinismul caracterelor fenotipice. Cum numărul markerilor este limitat, apare necesară utilizarea unei metode care să parcurgă rapid genomul.

La ora actuală se utilizează din ce în ce mai mult în acest scop, markerii moleculari detectați prin metoda RAPD. Această tehnică suferă totuși o serie de imperfecțiuni legate fie de protocolul de lucru, fie de calitatea informației obținute. Astfel, teoretic este posibil ca benzile asociate fragmentelor de talie egală în două populații diferite, să nu fie obligatoriu omoloage. Mai mult, fragmentele sunt adesea dominante, ceea ce nu permite estimarea frecvenței alelice în populații. Din aceste motive, metoda RAPD trebuie considerată ca o fază preliminară la care trebuie adăugată o fază de validare a acestor fragmente.

Metoda de validare cea mai adecvată constă, după verificarea reproductibilității benzilor, în secvențierea fragmentelor informaționale la cele două extremități ale lor și generarea de noi amorse mai lungi, plecând de la aceste secvențe, care vor permite în continuare identificarea fragmentelor ADN prin amplificare dirijată. Această tehnică a fost simultan dezvoltată în mai multe laboratoare iar markerii astfel identificați se numesc SCAR (sequence characterized amplified region) (figura 5).

Spre deosebire de cercetarea clasică a polimorfismului arborilor prin realizarea de încrucișări și urmărirea descendenței, metoda RAPD-SCAR aplicată populațiilor panmictice are avantajul de a identifica toate fragmentele implicate în diferențiere, nu numai cele legate direct de diferențierea fenotipică între două populații, dar și cele care pot elucidă istoria evolutivă (filogenia) acestora.

Metoda RAPD-SCAR a fost aplicată la gorun (*Quercus petraea*), specie care s-a dovedit a fi foarte apropiată de stejar (*Q. robur*) și de stejarul pedunculat (*Q. pedunculiflora*). Diferențele astfel înregistrate s-au dovedit mult superioare celor furnizate de markerii izoenzimatici utilizați la aceste specii. Prin utilizarea amplificării aleatorii (RAPD) s-a reușit selecționarea unui număr de 14 fragmente din 419 identificate; 8 din fragmentele ADN discriminatorii de la aceste specii de *Quercus* au fost secvențiate și procesul de cartare continuă la ora actuală și pentru alte fragmente ADN precum și pentru alte specii (Kremer, 1994).

Organizarea diversității genetice citoplasmice la arbori

Genomurile citoplasmice se transmit în general uniparental. La angiosperme (speciile foioase), cloroplastele și mitocondriile se transmit prin sămânță, pe linie maternă. La gimnosperme (speciile rășinoase), cloroplastele au o ereditate paternă iar mitocondriile o ereditate maternă. Migrarea genelor citoplasmice este deci *a priori* mai redusă decât cea a genelor nucleare.

O a doua consecință a eredității uniparentale vizează talia populațiilor pentru genele citoplasmice; ea este cel puțin cu jumătate mai redusă decât cea a genelor nucleare. Populațiile de talie mică, asociate cu o slabă migrare, ar trebui să antreneze o foarte puternică diferențiere a genelor citoplasmice în raport cu genele nucleare, raționament care a fost confirmat experimental (Petit, 1993).

La stejari, de exemplu, s-a constatat că o mare parte a arborilor unei păduri au un același citotip. O pădure vecină va prezenta un citotip diferit. Ideea utilizării polimorfismului pentru identificarea populațiilor clasate (surse, rezervații de semințe) s-a impus de la sine. Din păcate, numărul de citotipuri disponibile rămâne deocamdată puțin ridicat din cauza unei rate a mutației foarte scăzute în genomul cloroplastic. Numai patru citotipuri diferite au fost identificate prin metoda RFLP clasică la stejari, deși cercetarea mutațiilor în acest genom a făcut obiectul unei intense cercetări.

Genomul cloroplastic a fost în întregime secvențiat la numeroase specii vegetale, printre acestea fiind și numeroase specii de arbori. Metoda folosită pentru aceasta, combină amplificarea genică și utilizarea enzimelor de restricție. Compararea secvențelor astfel identificate cu baza de date informatizată care a fost creată (Kremer, 1994), permite reperarea segmentelor de ADN cloroplastic care sunt conservate la nivelul speciei respective. Inspirându-se de la aceste secvențe, se pot crea diferite amorse și pe baza lor se poate amplifica segmentul dorit din genomul cloroplastic; în continuare, secvențele amplificate sunt digerate cu enzime de restricție pentru a identifica mutațiile. Ideal ar fi să se poată dispune de amorse "în șirag" pentru fiecare 2-3 kilobaze pe molecula de ADN cloroplastic, ceea ce ar permite o cercetare sistematică a polimorfismului. Această metodă laborioasă este mult mai eficientă decât metoda RFLP, pentru studiul diversității genetice la nivelul cloroplastelor în mai multe populații de arbori. O dată combinațiile genetice "amorsă - enzimă de restricție" identificate, metoda se simplifică foarte mult. Astfel a fost posibilă identificarea a peste zece mutații în genomul cloroplastic la *Quercus petraea* (Demesure, 1992).

Organizarea și evoluția diversității genetice într-o pădure

Dacă plantațiile sunt adesea utilizate pentru "reînnoirea" unei păduri, regenerarea naturală este și ea încă destul de larg răspândită. Ea constă în selecționarea unui anumit număr de arbori seminceri pe o parcelă, tăierea celorlalți și lăsarea semincercilor să se reproducă liber între ei. Această operațiune destul de delicată este determinantă pentru viitorul unei populații pentru că ea reprezintă o coordonare a evoluției diversității genetice a populației respective. Se impune pentru aceasta, în primul rând o evaluare a nivelului și organizării spațiale a diversității genetice existente în pădure și în al doilea rând, se impune o estimare a efectului factorilor biologici (regim de reproducere, flux genic) și

antropici (ca urmare a măsurilor silviculturale) asupra evoluției diversității.

Repetarea regenerărilor naturale în cursul generațiilor succesive, duce inevitabil la o repartitie a arborilor sub formă de buchete de exemplare înrudite. Migrarea semințelor este adesea limitată ca distanță, iar exemplarele învecinate au o șansă mare de a avea ascendenți comuni. Cum cei mai apropiați vecini sunt în egală măsură polenizatori privilegiați, regenerarea naturală poate conduce la un ridicat nivel de consangvinizare. Pentru numeroase specii există argumente experimentale privind depresiunea de consangvinizare, marcherii genetici reprezentând și în acest caz un prețios instrument de estimare a ratei de consangvinizare într-o populație. Foarte mult au fost utilizați marcherii izoenzimatici (la stejari, fag, conifere) și au argumentat că arborii învecinați prezintă o similitudine genetică mult mai ridicată decât cei situați la distanțe mari.

În ce privește dispersia polenului sau a semințelor, studiul se poate face pe două căi; prima consideră modelul dispersiei fizice sau diferite modele biofizice, cea de-a doua descrie fluxul genic cu ajutorul marcherilor genetici. Numărul de părinți potențiali fiind relativ ridicat, metoda de marcarea nu este rezolutivă decât dacă se dispune de marcheri foarte variabili de tipul amprentelor genetice. Marcherii izoenzimatici dau rezultate puțin precise care nu permit estimarea separată a genelor care migrează prin semințe sau prin polen. Identificarea marcherilor hipervariabili de tip mini- sau microsatelici, ar trebui să amelioreze considerabil metodele de cercetare a paternității.

Pe de altă parte, accesul la marcherii care se transmit exclusiv la un singur părinte, ar trebui să permită estimarea părții corespunzătoare fiecărui vector al fluxului genic. A fost deja evocată originalitatea eredității mitocondriilor și cloroplastelor în special la conifere, unde primele se transmit pe linie maternă iar ultimele pe linie paternă. Această particularitate constituie un model ideal pentru studiul fluxului genic. La ora actuală cercetările se limitează la verificarea eredității uniparentale a genomurilor

cloroplastice și raritatea heteroplasmiei (variabilității între genomurile citoplasmice ale aceluiași exemplar). Au fost deja reperate zone hipervariabile în genomul cloroplastelor la conifere și se speră că aceasta va permite într-un viitor foarte apropiat, identificarea genitorilor.

Un instrument pentru selecție

Vârsta târzie la care se poate evalua un arbore în plan genetic, constituie unul din inconvenientele majore ale schemelor de selecție. Identificarea de marcheri legați de caracterele de interes agronomic, ar trebui să amelioreze cu mult schemele de selecție ale arborilor forestieri prin reducerea ciclurilor de selecție.

Teoretic, tehnicile de marcarea reprezintă un instrument deosebit de util. Din păcate, perspectivele utilizării lor în această direcție sunt reduse deoarece criteriile de selecție sunt adesea foarte complexe, vizând simultan mai multe caractere (talie arborilor, adaptarea la diverse condiții de mediu, forma, etc.) care depind de numeroși loci genici. În plus, caracterele fenotipice vizate de selecție manifestă o mare instabilitate genetică din cauza interacțiunii dintre genotipuri și mediu pentru realizarea fenotipurilor. De aceea, pentru caracterele compuse, marcherii genetici sunt utilizați fără a cunoaște pe deplin determinismul lor genetic; se studiază un număr de loci și se estimează variabilitatea acestora în funcție de mediu și vârstă.

Pentru caracterele mai simple (rezistența la maladii, calitatea lemnului), cercetarea marcherilor legați de aceste caractere este deja considerată ca un criteriu suplimentar în multe scheme de selecție (Lascoux, 1993).

Arhitectura genetică a caracterelor și valoarea QTL

Metode recente ale geneticii moleculare au pus în evidență în genomul plantelor, zone determinante pentru caracterele de tip cantitativ (creștere, productivitate, conținut în anumiți componenți, precocitate, durata înfloririi, etc.). Prin realizarea de hărți genetice din ce în ce

mai fine ale genomului plantelor, au fost puse în evidență zone numite QTL sau QTS (Quantitative Trait Loci or Segments) identificate prin tehnicile de marcarea moleculară; se pare că aceste zone ar putea releva variabilitatea caracterelor celor mai importante pentru selecție.

Construirea de hărți genetice în cazul coniferelor este facilitată de prezența țesutului haploid în cantitate suficientă pentru extracția de ADN, în endospermul semințelor (țesut identic din punct de vedere genetic cu gametul femel). Accesul la țesutul haploid permite construirea hărții genetice atât cu ajutorul marcherilor izoenzimatici, cât mai ales cu ajutorul marcherilor moleculari, prin tehnica RAPD sau RFLP. La pinul maritim au fost realizate deja hărți genetice plecând de la proteinele totale (cu densitatea genelor de 9 cM [entimorgan]) (Gerber, 1993) și plecând de la marcherii moleculari identificați prin RAPD (cu densitatea genelor de 5 cM) (Plomion, 1994 cit. de Kremer, 1994).

Pe termen lung, aceste realizări vor lua în calcul și variabilitatea spațială a expresiei genelor (interacțiunea genotip-mediu). Descompunerea acestei variații de expresie se numește *arhitectură genetică de caractere*. Au fost deja obținute o serie de rezultate care pun în evidență această variație de expresie grație electroforezei bidimensionale a proteinelor totale. Compararea profilurilor benzilor electroforetice de la trei țesuturi diferite (polen, muguri, ace) la pinul maritim, a arătat că majoritatea proteinelor sunt comune celor trei țesuturi, iar proteinele "țesut - specifice" prezintă un grad foarte ridicat de polimorfism (Bahrman, 1944). Același demers se folosește și pentru compararea proteinelor într-un același țesut (de exemplu, mugure apical), la două vârste diferite.

Dezvoltarea tehnicilor de marcarea moleculară permit, pe lângă dezvoltarea cercetării în plan fundamental, posibilitatea de a formula noi perspective de gestiune a resurselor genetice forestiere și de creare de varietăți. Direcțiile prioritare la ora actuală sunt:

- pentru conifere - studierea polimorfismului ADN în fază diploidă și haploidă ceea ce

va permite reconstituirea genotipului fiecărui gamet; de asemenea, este vizată utilizarea amprentelor genetice în genomurile citoplasmice, cunoscută fiind transmiterea pe linie maternă a mitocondriilor și pe linie paternă a cloroplastelor, ceea ce va facilita studiul detaliat al fluxului genic prin semințe și polen.

- pentru foioase - studierea ciclurilor de selecție și urmărirea biodiversității în cursul operațiilor de regenerare (Kremer, 1994).

Noile tehnologii moleculare nu-și propun să înlocuiască selecția clasică a arborilor care are poziția sa bine precizată în tehnicile de ameliorare forestieră și care s-a dovedit foarte utilă pentru obținerea unui câștig genetic important și implicit a unei productivități sporite a ecosistemelor forestiere, în schimb îi vor mări foarte mult eficacitatea și i vor deschide un larg câmp de acțiune. Colaborarea între selecția tradițională și biologia moleculară vor conduce într-un viitor foarte apropiat la un progres spectaculos al ameliorării cantitative și calitative a producției forestiere.

Note:

* enzimele de restricție au capacitatea de a tăia macromolecula de ADN în anumite locuri pe care le recunosc cu precizie; ele sunt izolate din diferite bacterii unde îndeplinesc funcția de a tăia moleculele de ADN străine care pătrund în celula bacteriană; ADN propriu bacterian este protejat contra acțiunii acestor enzime.

** sondă (sau amorsă) este denumirea dată unei secvențe scurte de ADN (de regulă de 10-40 nucleotide) care este complementară cu o secvență din ADN "țintă"; prin hibridizare, sonda se cuplează cu secvența recunoscută pe baza capacității de împerechere a bazelor azotate complementare, respectiv timina se cuplează cu adenina iar guanina cu citozina. Dacă sonda prezintă un capăt 3' liber, ea poate constitui punct de plecare pentru acțiunea unei ADN-polimeraze care va cupla noi nucleotide producând o elongare; în acest caz amorsa se numește și "primer".

*** satelit ADN este denumirea dată unor secvențe ADN foarte înalt repetate (de 1000 - 100000 de copii) și foarte lungi, adesea reprezentând regiuni heterocromatice, de 100-300 perechi de baze; se utilizează pentru studiul unor anumiți loci din genom.

- minisatelit ADN este denumirea unor secvențe scurte de 10-60 perechi de baze cu diferite grade de repetitivitate ale diferitelor secvențe; se utilizează frecvent pentru studierea locilor genici.

- microsatelit ADN este denumirea dată unor secvențe foarte scurte de 1-10 perechi de baze cu o distribuție dispersată în genom; se utilizează pentru studierea locilor cu o secvență foarte scurtă; se numesc și "secvențe simple" sau "secvențe scurte repetate în tandem".

- midisateliti ADN este denumirea unor secvențe repetate ale unui locus lung (ca în cazul sateliților) dar cu un număr variabil de secvențe repetate de 40 perechi de baze (ca în cazul minisatelitelor).

Bibliografie

1. Bahrman N., Petit, J.,R., 1994, Genetic polymorphism in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) assessed by two dimensional gel electro-phoresis of needle, bud and pollen proteins. *J. Mol. Evol.*
2. Berville A., Tersac M. (edit.), 1995, Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires. I.N.R.A. Paris.
3. Birot Y., 1994, Biologie moderne et forêt. *Biofutur*, febr. 1994.
4. Briquet M., 1995, La biologie moléculaire au service de la forêt wallone. *Forêt Wallone* n° 22.
5. Bronwer S., 1996, Quand la biologie moléculaire s'en mêle. *Athena*, mars 1996.
6. Caetano-Anollés G., Bassam B.,J., Gresshoff P.,M., 1991, DNA Amplification Fingerprinting: A Strategy for Genome Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 9(4), 294-307.
7. Caetano-Anollés G., Bassam B.,J., Gresshoff P.,M., 1991, DNA Amplification Fingerprinting Using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, Vol. 9, 553-557.
8. Demesure B., Petit J., R., Comps B., Kremer A., 1992, Universal cytoplasmic primers: methodology and application to *Fagaceae* species. Proceeding of the 5th workshop on molecular biology of forest trees. Carcans-Maubuisson, I.N.R.A. Bordeaux.
9. Gerber S., 1993, Seed-protein variation in maritime pine (*Pinus pinaster*Ait.) revealed by two dimensional electrophoresis: genetic determinism and construction of a linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 85, 521-528.
10. Kremer A., Durel C.,E., Petit R., Villar M., 1994, Marqueurs moléculaires et génétique des arbres forestiers. *Biofutur* febr. 1994.
11. Lascoux D.,M., 1993, Growth and phenology of one year old maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings under continuous

- light: implications for early selection.
Can. J. For. Res. 23, 1325-1330.
12. Lefort-Buson M., Rodolphe F., Charcosset A., 1990, De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. *Biofutur*, iunie
 13. Merel P., 1995, Les challengers de la PCR. *Le technoscope de biofutur* n°. 143.
 14. Moffat A., S., 1996, Moving Forest Trees Into the Modern Genetics Era. *Science* vol. 271, 760 -761. Weising

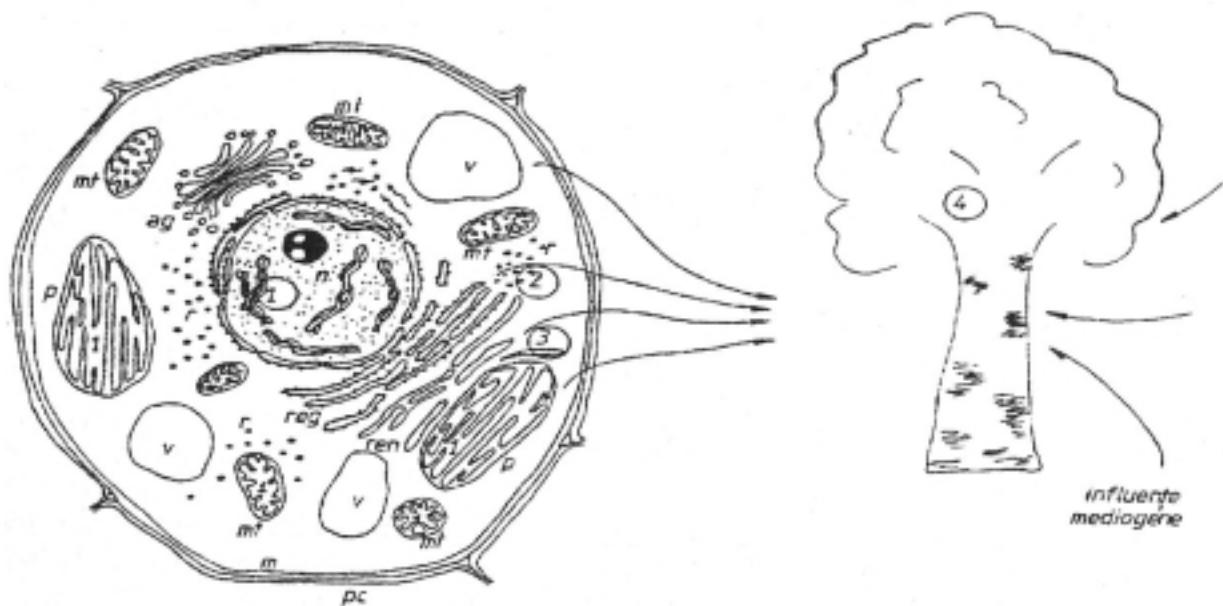


Figura 1. Marcheri utilizați în analiza variabilității genetice la arbori.

1 - marcheri moleculari (ADN) cantonați în nucleul celulelor sau în zonele genofore ale cloroplastelor și mitocondriilor; 2 - marcheri izoenzimatici rezultați în urma transcrierii și translației genelor adecvate în citoplasma celulelor; 3 - marcherii terpenici rezultați în urma unor multiple reacții metabolice în diferite compartimente ale citoplasmei celulelor secretoare și deversate în final în canalele sau pungile rezinifere; 4 - marcheri fenotipici (morfologici, anatomici, fiziologici); n = nucleu; mt = mitocondrii, p = plastide; r = ribozomi liberi din citoplasmă; reg = reticul endoplasmatic granular; ren = reticul endoplasmatic neted; ag = aparat golgi; v = vacuole; m = membrana plasmatică; p = perete celular.

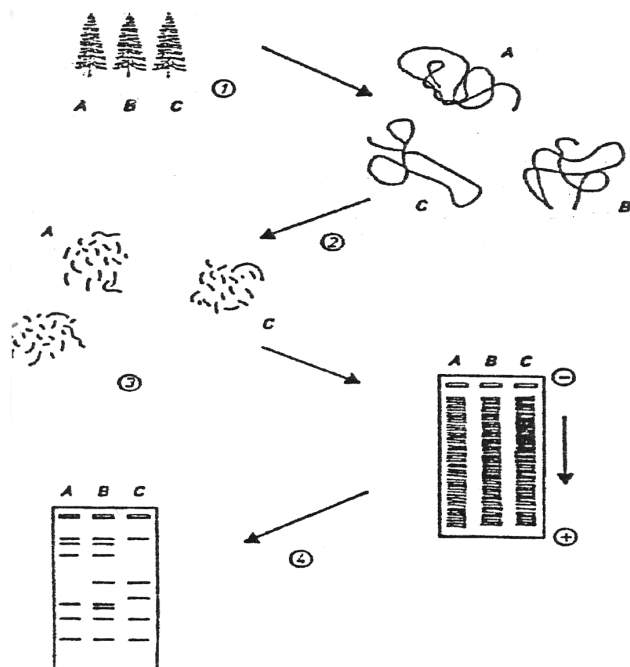


Figura 2. Principiul metodei RFLP de realizare a amprentelor genetice la arbori.

1 - izolarea ADN genomic de la organismele de interes; 2 - digestia ADN cu enzime de restricție; 3 - separarea fragmentelor de restricție prin electroforeză în gel de agaroză; 4 - gelurile obținute sunt denaturate, neutralizate și fixate pe o membrană, nivel la care se realizează o hibridizare a fragmentelor de ADN cu anumite sonde marcate radioactiv iar fragmentele complementare (de care se atașează sondele) sunt vizualizate prin autoradiografie (sau prin tehnici neradioactive).

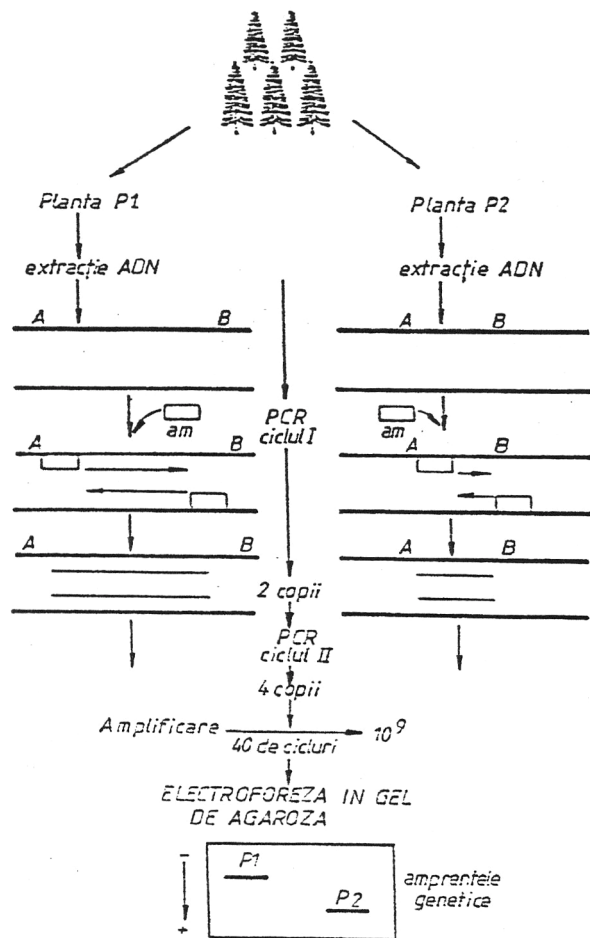


Figura 3. Principiul metodei RAPD.

ADN este extras dintr-un fragment vegetal (frunze, muguri, semințe, etc.) de la plantele de analizat (P1 și P2). Aceste molecule ADN sunt amplificate sub acțiunea enzimei ADN-polimeraza. Acțiunea acesteia începe de la locul unde o amorsă (am) se hibridizează cu un anumit sector denaturat al dublei catene de ADN. Pe catena complementară de ADN, amorsa recunoaște un sector similar situat la câteva sute de nucleotide de precedentul și se hibridizează cu acesta în același mod. ADN-polimeraza copie secvența de ADN cuprinsă între cele două amorse de pe catenele opuse, în milioane de exemplare (amplificare) în cursul a 35-40 de cicluri repetate ale tehnicii PCR.

De exemplu, segmentul AB de ADN de la planta P2 care este mai mic decât cel de la planta P1 ca urmare a unei mutații (deletii sau rearanjament), va migra mult mai repede în timpul electroforezei în gel de agaroză decât segmentul AB de la planta P1 care este mai mare și mai greu. Aceste segmente amplificate vor fi vizualizate în lumină ultravioletă, sub forma de benzi fluorescente, grație prezenței în gel a unui reactiv fluorescent care posedă o mare afinitate pentru ADN.

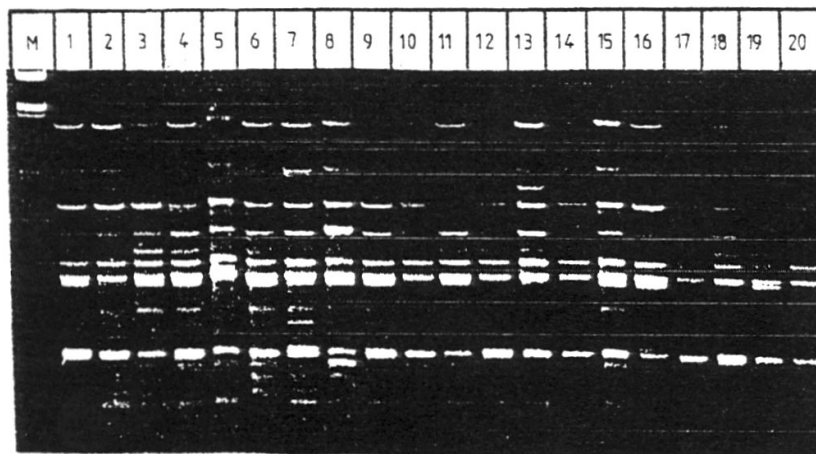


Figura 4. Analiza prin metoda RAPD a unei proveniențe de brad.

ADN de la 20 de exemplare a fost amplificat plecând de la o amorsă. Diferitele benzi de ADN amplificate sunt separate în funcție de talia lor prin electroforeză în gel de agaroză și vizualizate prin fluorescență în prezență de bromură de etidiu în lumină ultravioletă. Linia M reprezintă un marker de referință pentru greutatea moleculară.

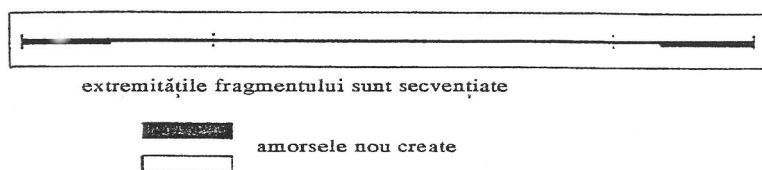
Diferențele dintre indivizi în cadrul unei proveniențe sunt astfel puse în evidență. Fiecare bandă este consemnată pentru prezența sau absența sa pentru fiecare exemplar în parte. Ansamblul de date obținut plecând de la mai multe amorse, permite estimarea diversității genetice în cadrul unei proveniențe sau între proveniențe sau între proveniențe.

a) Recuperarea amorselor aleatoare

Se compară profilurile benzilor obținute în urma amplificării pentru n arbori aparținând la două populații de arbori. Se selecționează fragmentele care manifestă diferențe semnificative de frecvență între cele două populații.



b) Clonarea și secvențierea parțială a fragmentelor selecționate (de exemplu, a fragmentului c). Identificarea secvenței de baze (secvențierea) se realizează numai pentru extremitățile fragmentului și pe această bază se realizează două amorse de 20 kbaze complementare cu extremitățile fragmentului c.



c) Amplificarea dirijată a ADN de la n arbori pentru cele două populații studiate, cu ajutorul amorselor noi, urmată de digestie cu enzime de restricție a fragmentului c. Benzile rezultate în urma electroforezei permit calcularea frecvenței alelice. Utilizarea noilor amorse permite amplificarea numai a fragmentului c la toate exemplarele analizate. Dacă există un polimorfism în interiorul fragmentului, digestia cu enzime îl va detecta (fragmente c', c'').



Figura 5. Aplicații ale metodei RAPD-SCAR în cercetarea fragmentelor ADN care diferențiază două populații de arbori.

Résumé

Modeles génétiques moléculaires des especes forestieres

Cette travail presente quelques aspects en probleme des modeles génétiques moléculaires aux especes forestieres.

Il s'agit d'organisation de la variabilité génétique, des methodes d'interception en ce qui concerne la variabilité génétique aux arbres, modeles moléculaires, la recherche des modeles moléculaires dans croisement et dans les populations naturelles et enfin l'organisation de la diversité génétique aux arbres et dans un foret.

Cettes modelles génétiques moléculaires permetera l'étude de la diversité génétique et la posibilitation de sélection dans un program d'amélioration