



MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE

## Analiza genotipică bazată pe markeri moleculari – importanța realizării unei baze de date a variațiilor genetice a speciilor românești valoroase



CS III dr. Anca Amalia UDRIȘTE  
CS dr. Mihaela IORDĂCHESCU  
Prof. dr. Liliana BĂDULESCU

*Centrul de Cercetare pentru Studiul Calității Produselor Agroalimentare*



MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



# Analiza diversității genetice a speciilor legumicole autohtone

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.

## FAZA II – proiect ADER 7.2.6.

- Optimizarea metodelor de extracție a ADN-ului genomic
- Analiza calității ADN-ului genomic extras
- Analiza polimorfismului genetic la soiurile autohtone selecționate cu ajutorul markerilor moleculari
  - Analiza produșilor de amplificare utilizând markerii RAPD, ISSR, SSR pentru probele de ardei
  - Analiza produșilor de amplificare utilizând markerii RAPD, ISSR, SSR pentru probele de tomate
- Analiza diversității moleculare rezultate în urma profilului generat de programul bioinformatic - *R programming for data science*





MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Markeri moleculari tip RAPD

### Avantaje:

- RAPD sunt markeri dominanți
- amplificarea se realizează prin tehnica PCR
- cantitate mică de ADN genomic
- abundență genomică mare și distribuție aleatoare în genom
- fragmentele de interes RAPD pot fi clonate, secvențiate și apoi utilizate pentru a dezvolta alte tipuri de markeri pe bază de PCR, cum ar fi markeri SCAR (*sequence characterized amplified region*) sau SNP (*single-nucleotide polymorphism*).

### Dezavantaje:

- reproductibilitatea redusă
- incapacitatea de a detecta diferențele alelice în heterozigoți / nu sunt locus-specifici





MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Markeri moleculari tip ISSR

### Avantaje:

- ISSR sunt markeri dominanți
- reproductibili în evaluarea diversității genetice și identificarea diferențelor dintre soiurile
- ușor de manevrat, rapizi și foarte polimorfici
- abundență genomică mare și distribuție aleatoare în genom
- implică amplificarea ADN-ului prin tehnica PCR
- repetarea secvențelor inter-simple sunt distribuite aleator la nivelul genomului

### Dezavantaje:

- reproductibilitatea medie
- netransferabili





MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Markeri moleculari tip SSR-microsateliți



### Avantaje:

- markeri co-dominanți
- hiper-variabilitate
- reproductibilitate
- specificitatea locusului
- distribuția aleatorie la nivelul genomului în majoritatea cazurilor
- validarea resurselor genetice
- proveniți din secvențele genomice complete (SSR) și din transcrierea secvențelor ARNm (EST-SSR)
- pot reflecta diversitatea funcțională și pot indica moștenirea genetică ( variații de cateva pb)
- Markerii folosiți în acest studiu au fost EST-SSR, pentru a genera trăsături fenotipice cu scopul de a analiza transferabilitatea între probele analizate.

### Dezavantaje:

- cost ridicat



MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Selecția de primeri pentru amplificarea markerilor moleculari RAPD, ISSR și SSR



Un număr de 60 primeri au fost selectați pe baza literaturii de specialitate pentru analiza polimorfismului genetic al probelor studiate.

- RAPD sunt decameri

Primeri	Markeri	Secvență
RAPD-C1	OPJ-15	TGTAGCAGGG

- ISSR sunt primeri compuși dintr-o secvență de microsateliți ancorată la capătul 3' sau 5' cu 2-4 nucleotide arbitrare

Primeri	Markeri	Secvență
ISSR-C1	Iso 1 AC(GACA)4	ACGACAGACAGACAGACA

- SSR sunt compuși din primeri *forward* și *reverse* ce amplifică secvențele microsatelit constituite din repetiții în tandem ale unor secvențe di, tri sau tetra nucleotidice

Primeri	Markeri	Secvență <i>forward</i>	Secvență <i>reverse</i>
SSR-C1	HPMS 1-62 (TG)23 (AG)9	CATGAGGTCTCGCATGATTCAC	GGAGAAGGACCATGTACTGCAGAG

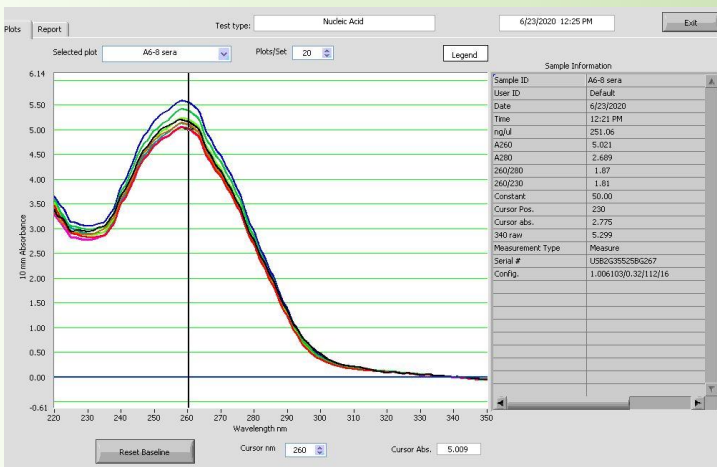


MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE

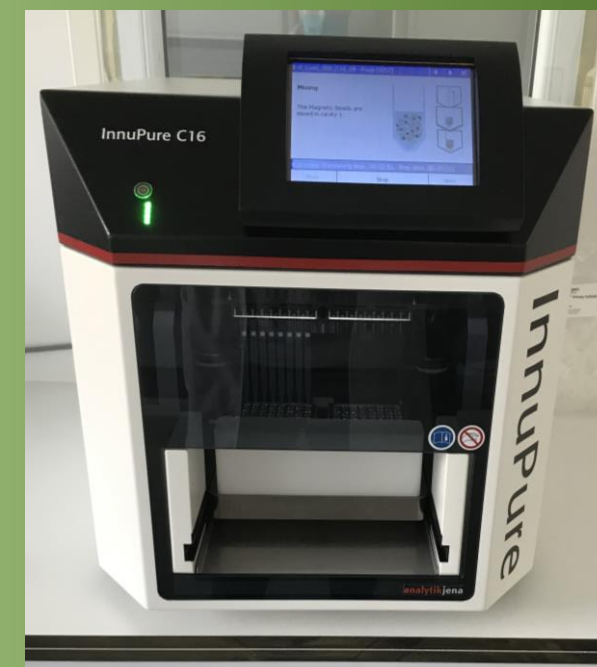


## Optimizarea metodelor de extracție a ADN-ului genomic

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
A6-1 sera	Default	6/23/2020	12:13 PM	258.17	5.163	2.772	1.86	1.76	50.00	230	2.937	7.054
A6-2 sera	Default	6/23/2020	12:14 PM	251.38	5.028	2.680	1.88	1.78	50.00	230	2.825	3.285
A6-3 sera	Default	6/23/2020	12:15 PM	269.60	5.392	2.859	1.89	1.81	50.00	230	2.983	3.603
A6-4 sera	Default	6/23/2020	12:16 PM	255.59	5.112	2.751	1.86	1.78	50.00	230	2.880	6.020
A6-5 sera	Default	6/23/2020	12:17 PM	260.62	5.212	2.786	1.87	1.82	50.00	230	2.871	3.224
A6-6 sera	Default	6/23/2020	12:18 PM	254.93	5.099	2.736	1.86	1.76	50.00	230	2.899	2.390
A6-7 sera	Default	6/23/2020	12:19 PM	277.99	5.560	2.958	1.88	1.82	50.00	230	3.049	5.019



- 150 mg țesut vegetal tânăr
- Protocol 3
- InnuPure®C16 / innuPREP Plant DNA I Kit-IPC16
- NanoDrop 1000
- 25-50 ng gDNA/ reacție PCR



M A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7

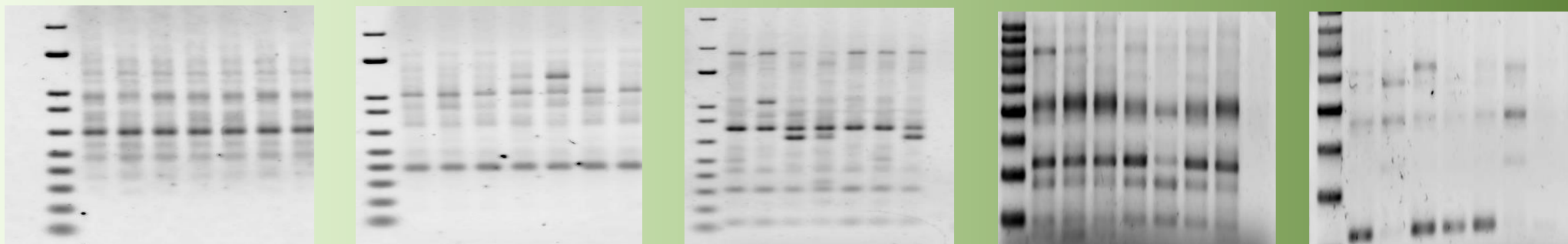




MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Profilul RAPD pentru 7 varietăți de *Capsicum annuum* luate în studiu, produs cu primerii selectați



- Platinum II Hot-Start PCR Master Mix 2X/ Invitrogen
- 1,5% ( TopVision Agarose); 1X TAE - (ROTIPHORESE® 50x TAE) timp de 160 min. la 100 V
- SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain-10.000X; vizualizate și fotografiate folosind sistemul de imagistică moleculară (PharosFX™ -BioRad).
- 200 fragmente PCR
- 1-10 fragmente ADN per probă, cu dimensiuni variabile de
- 150-1900 bp.

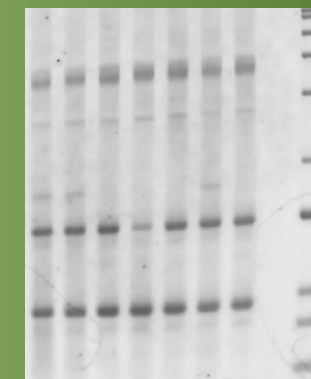
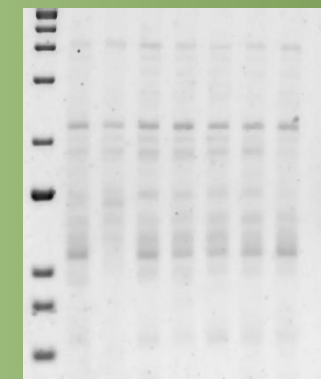
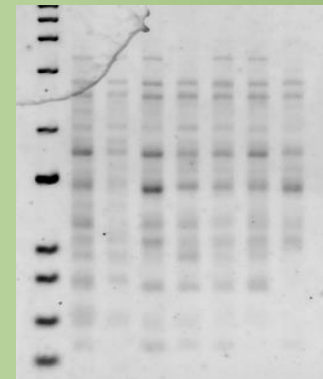
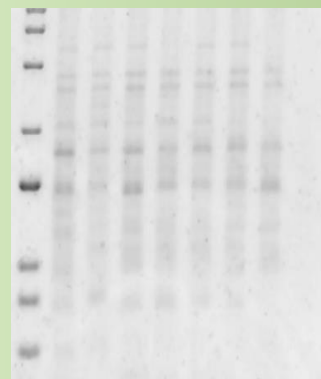
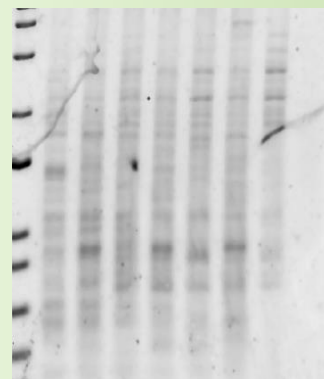
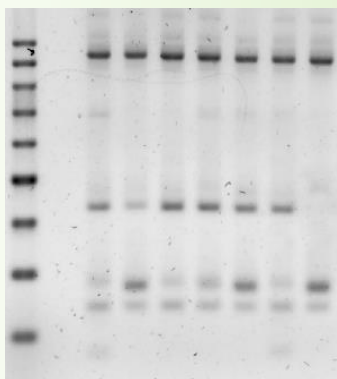




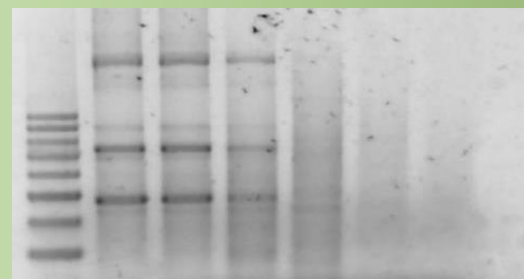
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Profilul ISSR pentru 7 varietăți de *Capsicum annuum* luate în studiu, produs cu primerii selectați



- 365 fragmente de PCR
- fiecare primer a amplificat între 1-12 fragmente ADN/probă, cu dimensiuni variabile de 350-4000 bp



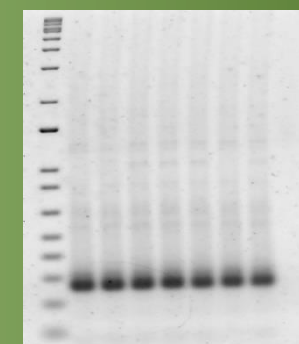
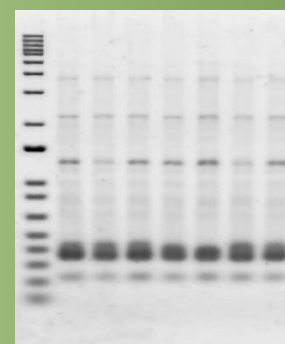
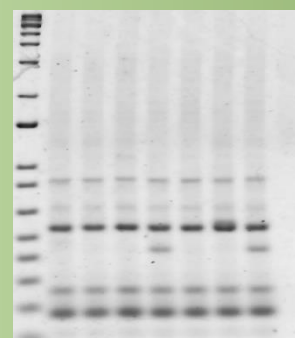
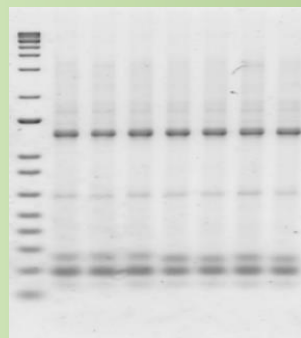
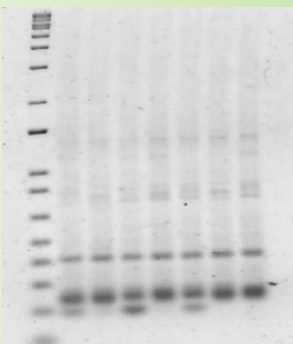
Gradient PCR:  
• 50,0-65,0°C



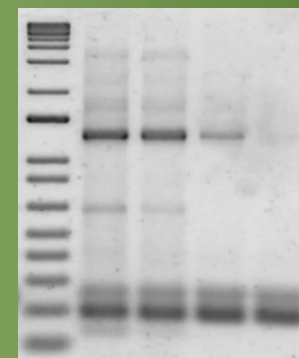
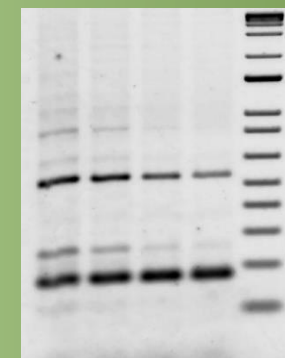
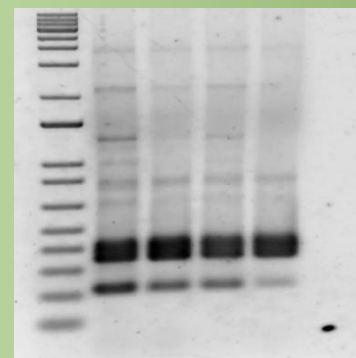
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Profilul SSR pentru 7 varietăți de *Capsicum annum* luate în studiu, produs cu primerii selectați



- 73 fragmente PCR- microsateliți
- dimensiuni 200-450bp
- Gradient PCR pentru stabilirea temperaturii optime de hibridizare a primerilor selectați prin testarea unui gradient de temperatură ce variază de la 45,0-54,8°C.

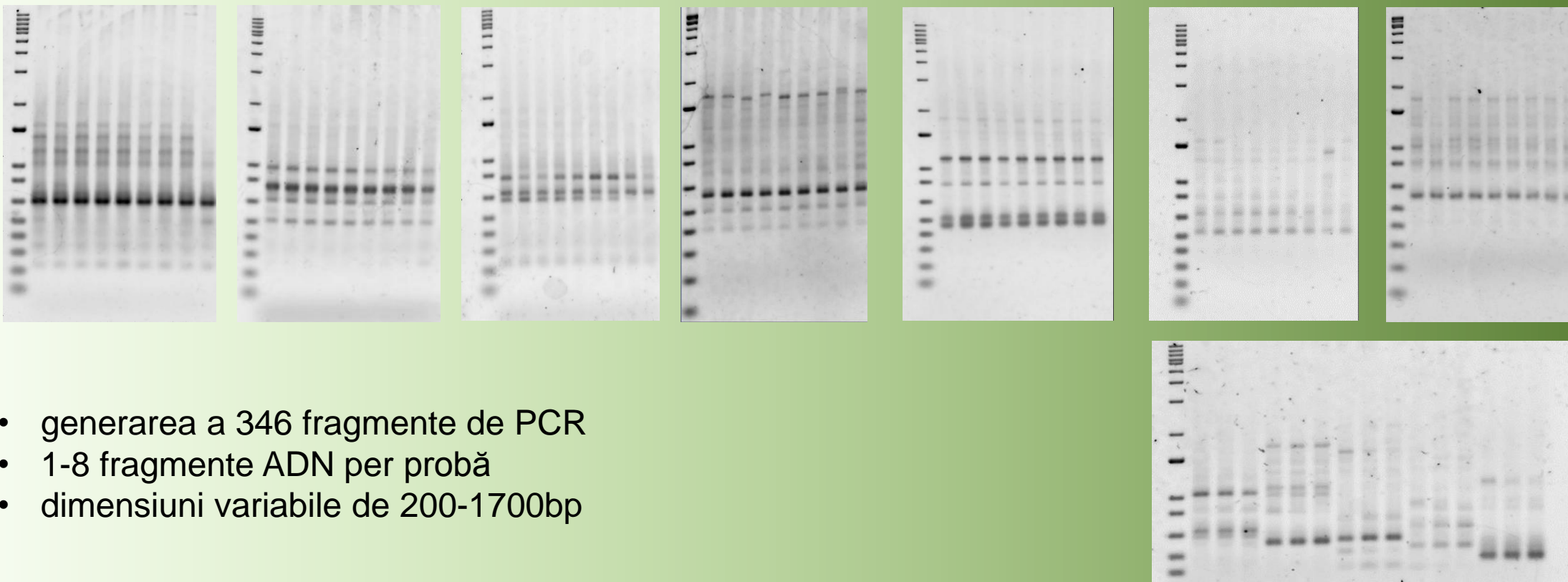




MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Profilul RAPD pentru 9 varietăți de *Solanum lycopersicum* luate în studiu, produs cu primerii selectați

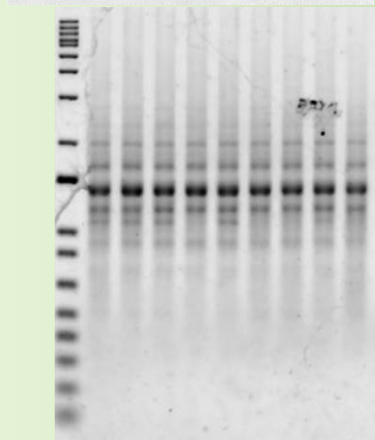
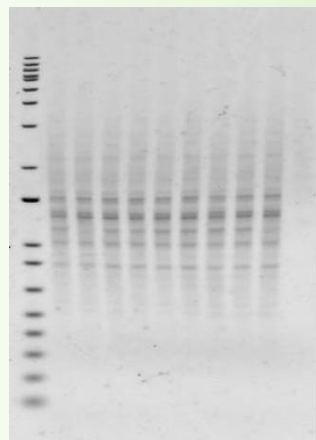
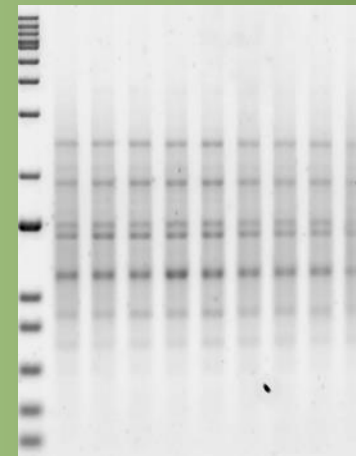
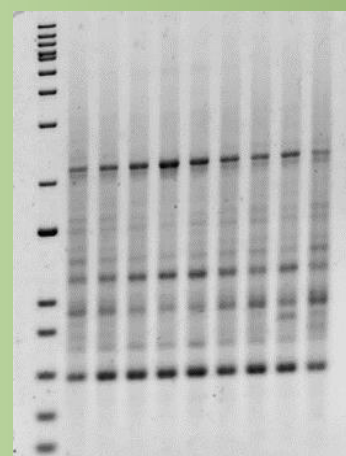
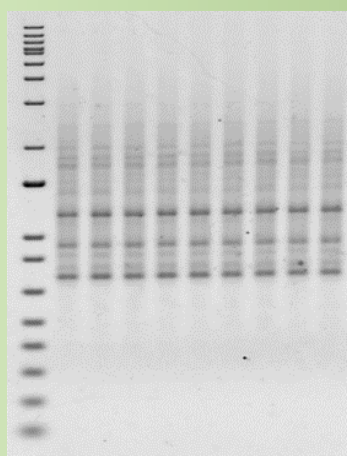
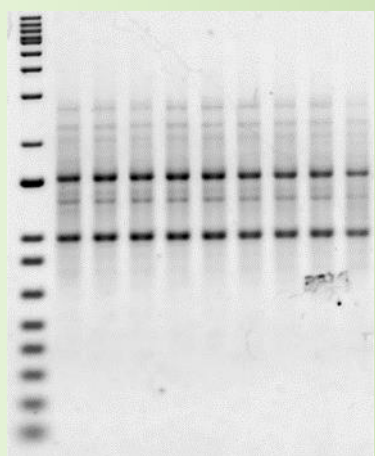
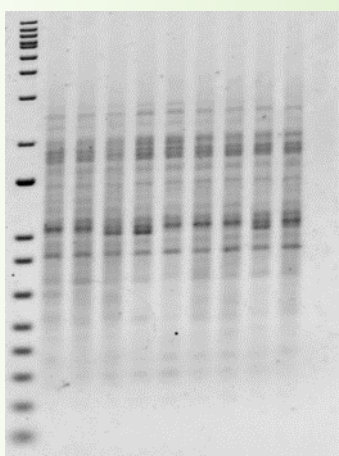




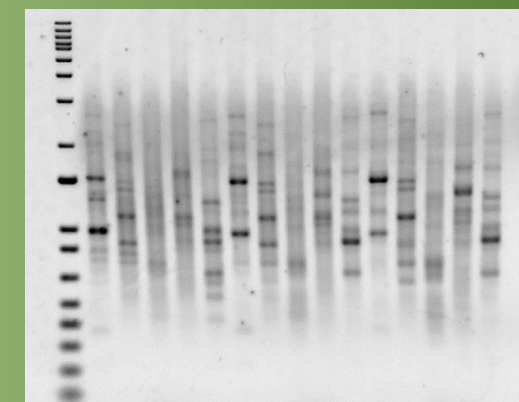
MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Profilul ISSR pentru 9 varietăți de *Solanum lycopersicum* luate în studiu, produs cu primerii selectați



- 698 fragmente de PCR
- fiecare primer a amplificat între 1-15 fragmente ADN per probă
- dimensiuni variabile de 700-2800bp

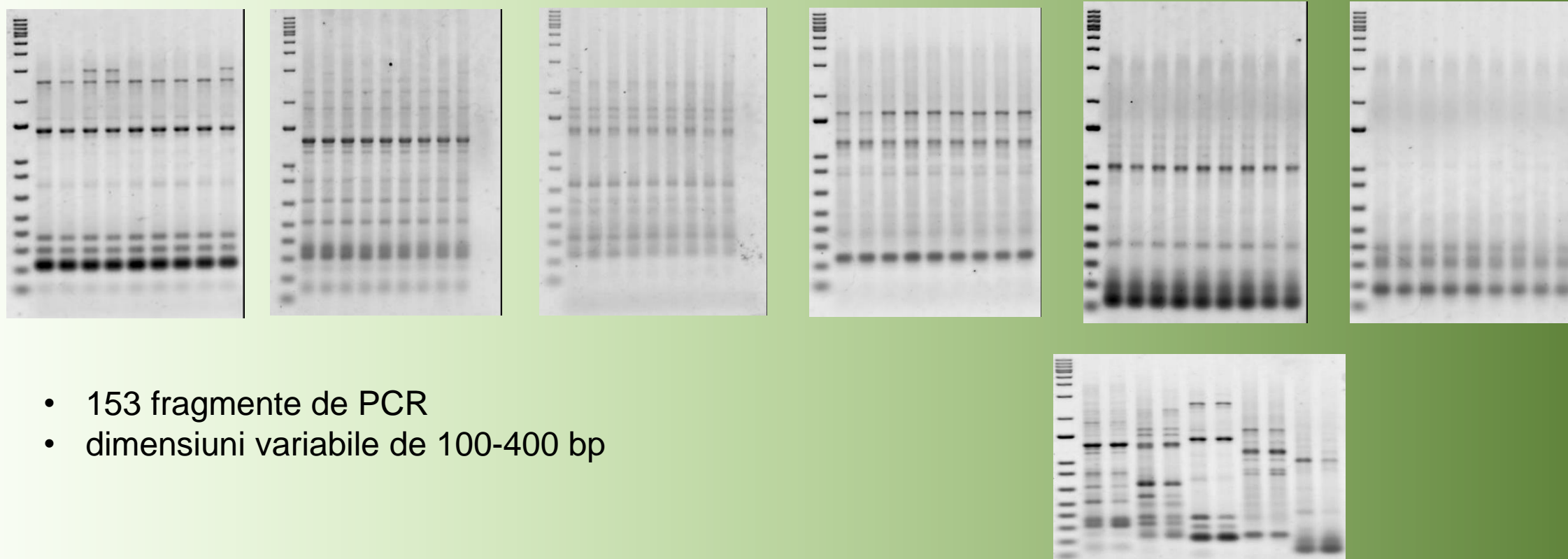




MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## Profilul SSR pentru 9 varietăți de *Solanum lycopersicum* luate în studiu, produs cu primerii selectați





MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE

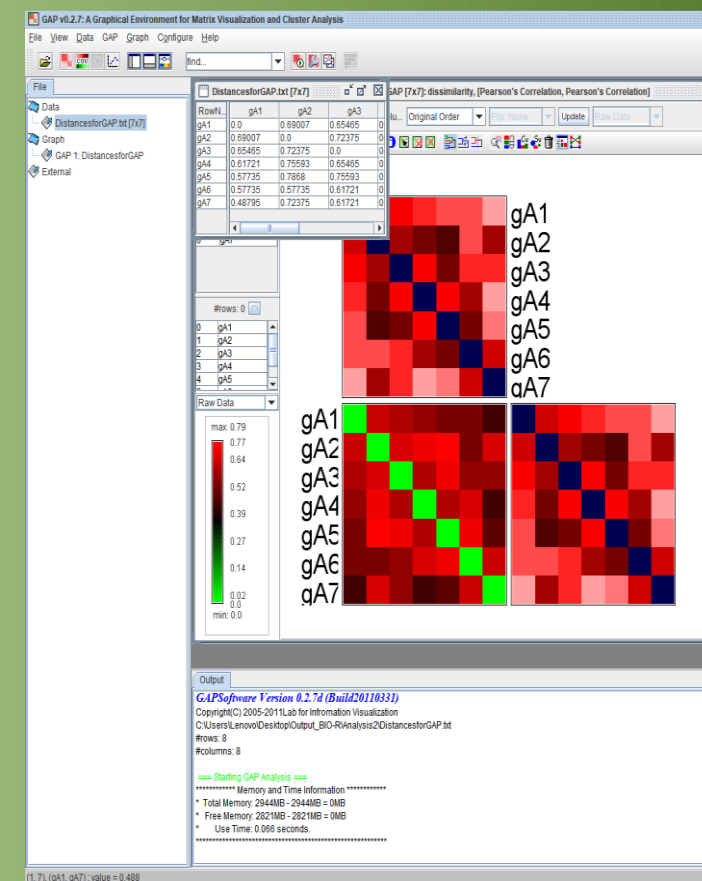


# Analiza diversității genetice a varietăților de ardei generată bioinformatic- *R programming for data science*

ID	NAME	1	2	3	4	5	6	7
1	gA1	0	0.69007	0.65465	0.61721	0.57735	0.57735	0.48795
2	gA2	0.69007	0	0.72375	0.75593	0.7868	0.57735	0.72375
3	gA3	0.65465	0.72375	0	0.65465	0.75593	0.61721	0.61721
4	gA4	0.61721	0.75593	0.65465	0	0.65465	0.72375	0.48795
5	gA5	0.57735	0.7868	0.75593	0.65465	0	0.75593	0.53452
6	gA6	0.57735	0.57735	0.61721	0.72375	0.75593	0	0.69007
7	gA7	0.48795	0.72375	0.61721	0.48795	0.53452	0.69007	0

Diversity	
% of polymorphic loci	0.525
Expected Heterozygosity	0.369290573
Standar deviation for HE	0.020788714
Observed Heterozygosity	0
Standar deviation for HO	0
Number of effective allele	1.619372476
Standar deviation for Ae	0.051706104
Shannon diversity Index	0.795896556
Standar deviation for ShanIn	0.033824756

- SC=0,48 pentru 1/7 și 4/7
- SC=0,78 pentru 2/5
- Reprezentarea grafică a distanței genetice în matricea GAP





MINISTERUL AGRICULTURII ȘI DEZVOLTĂRII RURALE



# Analiza diversității genetice a varietăților de ardei generată bioinformatic- *R programming for data science*

Genotype	He	Ho	Ae	Shannon	rareness	%NA
gA1	0.489795918	0	1.96	0	1.8141898	0
gA2	0.471655329	0	1.892703863	0	3.110877742	0
gA3	0.471655329	0	1.892703863	0	2.499312555	0
gA4	0.498866213	0	1.995475113	0	2.372317028	0
gA5	0.471655329	0	1.892703863	0	2.792475072	0
gA6	0.498866213	0	1.995475113	0	2.380730412	0
gA7	0.471655329	0	1.892703863	0	1.743925072	0

Marker	He	Ho	Ae	Shannon	SpeAllele1	SpeAllele2	%NA
P31800	0.408163265	0	1.689655172	0	0.485426827	1.807354922	0
P31750	0.489795918	0	1.96	0	0.807354922	1.222392421	0
P321300	0.408163265	0	1.689655172	0	1.807354922	0.485426827	0
P341800	0.408163265	0	1.689655172	0	0.485426827	1.807354922	0
P341600	0.408163265	0	1.689655172	0	0.485426827	1.807354922	0
P341100	0.244897959	0	1.324324324	0	2.807354922	0.222392421	0
P34900	0.408163265	0	1.689655172	0	1.807354922	0.485426827	0
P34700	0.489795918	0	1.96	0	1.222392421	0.807354922	0
P34500	0.408163265	0	1.689655172	0	1.807354922	0.485426827	0
P34350	0.244897959	0	1.324324324	0	2.807354922	0.222392421	0
P291500	0.244897959	0	1.324324324	0	2.807354922	0.222392421	0
P372000	0.244897959	0	1.324324324	0	0.222392421	2.807354922	0
P371600	0.489795918	0	1.96	0	0.807354922	1.222392421	0
P371400	0.489795918	0	1.96	0	0.807354922	1.222392421	0
P37650	0.244897959	0	1.324324324	0	0.222392421	2.807354922	0
P37350	0.244897959	0	1.324324324	0	2.807354922	0.222392421	0
P381300	0.408163265	0	1.689655172	0	1.807354922	0.485426827	0
P381200	0.244897959	0	1.324324324	0	2.807354922	0.222392421	0
P38950	0.408163265	0	1.689655172	0	0.485426827	1.807354922	0
P38700	0.408163265	0	1.689655172	0	1.807354922	0.485426827	0
P38500	0.408163265	0	1.689655172	0	0.485426827	1.807354922	0

Calculul pe genotip:

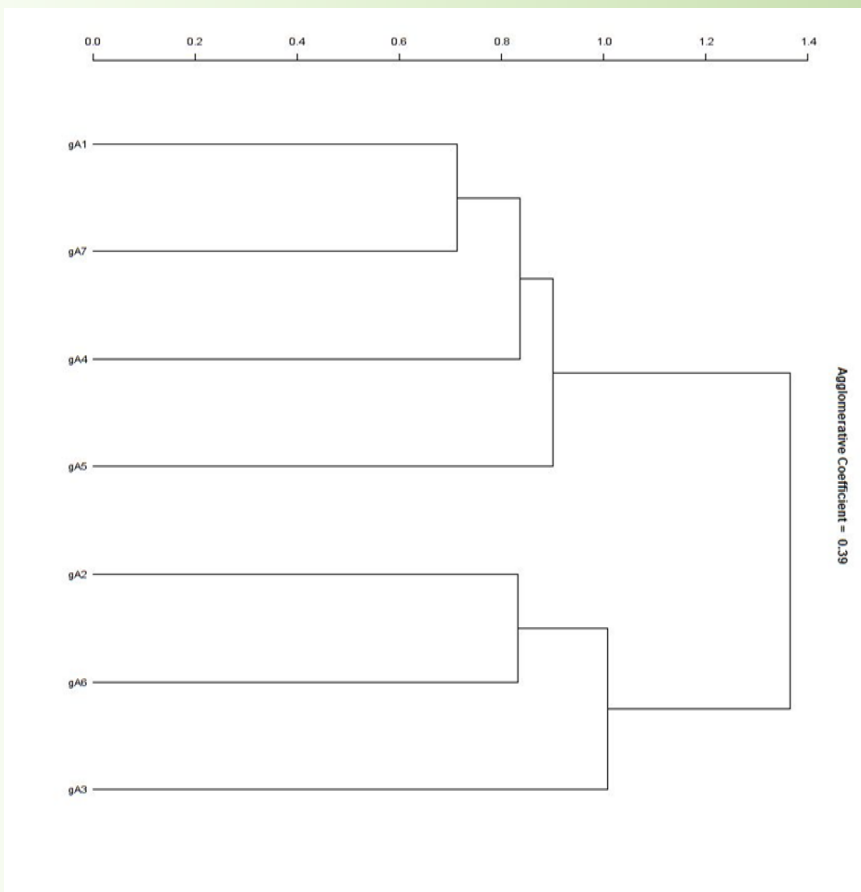
- heterozigoția așteptată (He) de 0.47-0.49,
- numărul de alele eficiente (Ae) în interval de 1.89-1.99,
- particularitatea (*rareness*) în interval de 1.74-3.11
- proporția de valori lipsă (% NA) pentru fiecare genotip.

Calculul pe locus:

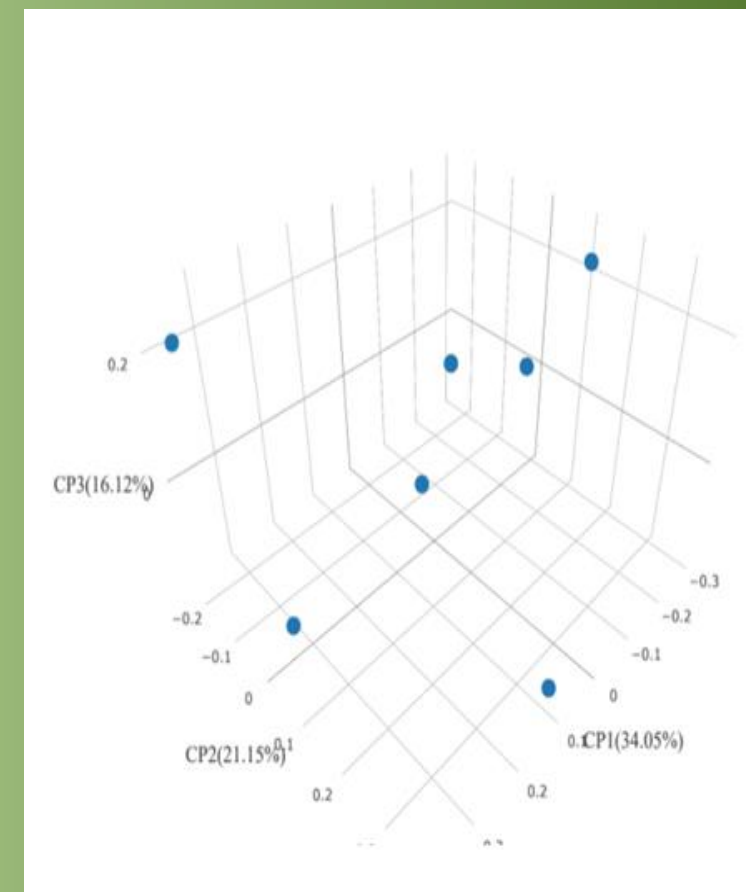
- specificitatea markerului pe fiecare alelă și proporția de valori lipsă (% NA) pentru fiecare marker.



## Analiza diversității genetice a varietăților de ardei generată bioinformatic- *R programming for data science*



- dendogramă cu 2 cluster majore pentru genotipurile de ardei studiate
- diagrama 3D pentru genotipurile de ardei studiate







MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



**Scopul proiectului** este de a optimiza metodele și tehnicile de analiză moleculară:

- analiza genotipurilor de interes economic ale speciilor legumicole și pomicole autohtone
  - bază de date a variațiilor genetice specifice speciilor autohtone
  - creșterea producției autohtone
- Analiza bazei de date publice existentă la nivel internațional
  - Caracterizarea fenotipică a genotipurilor luate în studiu.
  - Monitorizarea în cultură a caracterelor
  - Analiza diversității genetice la soiurile autohtone selecționate
  - Genotiparea prin secvențiere a polimorfismului obținut prin tehnologia NGS
  - Secvențierea ADN-ului (NGS) pentru a stabili indentitatea variațiilor de nucleotide specifice secvențelor genice.
  - 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.



MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



## IMPORTANȚĂ ȘI BENEFICIARI

### Baza de date a variațiilor genetice specifice speciilor autohtone de tomate și ardei

- fundamentarea politicilor MADR în domeniul ameliorării speciilor de interes economic,
- protejarea soiurilor și varietăților autohtone,
- accelerarea programelor de ameliorare prin selecția genelor valoroase,
- creșterea valorificării potențialului agricol conform Strategiei naționale pentru competitivitate și a Strategiei naționale de cercetare, dezvoltare și inovare, inclusiv PAC 2021-2027,
- furnizarea de metode moderne și sigure de identificare și selecție a markerilor moleculari prin:
  - analiza polimorfismului fragmentelor de ADN,
  - screening-ul mutațiilor,
  - identificarea de noi markeri moleculari,
  - genotiparea prin secvențiere
  - studiul diversității genomice prin analiza filogenetică a speciilor analizate.



### Beneficiari

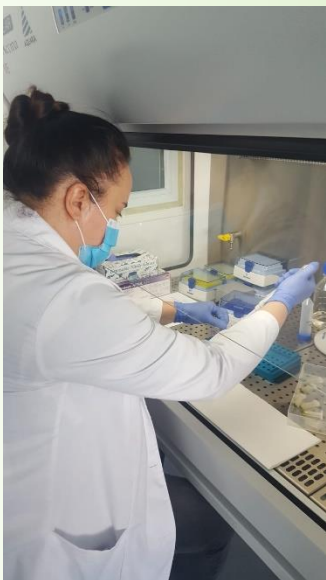
- unitățile de CD ale institutelor de profil, firme particulare cu preocupări în domeniu, fermieri – atât din țară, cât și din străinătate
- cercetătorii din USAMV București, institutele de cercetare aflate în rețeaua MEC și MADR, precum și din universități



MINISTERUL AGRICULTURII ȘI  
DEZVOLTĂRII RURALE



Vă mulțumesc  
pentru atenție !



**Acest studiu a fost finanțat de către MADR, PS2019-2022, în cadrul proiectului ADER 7.2.6.**

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