

SPECIFICUL POLIMORFISMULUI ZEINEI ENDOSPERMULUI LA HIBRIDIZII AUTOHTONI DE PORUMB DIN DIFERITE GRUPE DE MATURITATE

Batîru Grigorii, *doctor, conferențiar universitar*, Comarova Galina, *doctor, conferențiar universitar*, Bounegru Serghei, *doctorand, cercetător științific*, Adamciuc Arcadii, *master, cercetător științific stagiar*, Cojocari Dumitru, *doctorand, cercetător științific, asistent universitar*, Rotari Eugen, *doctor, conferențiar cercetător, Facultatea de Științe Agricole, Silvicultură și ale Mediului, UTM*.

The paper presents the results of using the polymorphism of zein (the prolamin fraction of the maize endosperm protein) under an applied aspect to solve the problem of accelerating and improving the quality of corn seed production in the Republic of Moldova. The null hypothesis of the presented work is focused on the possible specificity of zein polymorphism and the protein marker system, depending on the maturity group of more than 50 Moldovan corn hybrids.

Based on the use of the zein electrophoresis method, as well as the developed and tested algorithm for obtaining digital electrophoretic passports of the protein profiles of maize hybrids and their parental forms, the paper discusses the quantitative characteristics of the forms molecular values of zein (MFZ) for each of the studied genotypes, depending on their maturity group. The experimental material submitted for publication was obtained within the project „*Creation of the catalog of electrophoretic passports of parental forms and hybrids of corn approved in the Republic of Moldova and intended for export*” under the code 20.80009.5107.21.

Key words: *maize, maturity group, polyacrylamide gel electrophoresis, zein polymorphism, electrophoretic matrix parameters.*

INTRODUCERE

Studiul polimorfismului proteinelor utilizate în calitate de markeri ai materialului genetic de ameliorare este în prezent o direcție recunoscută în domeniul geneticii biochimice a plantelor agricole și, în special, al culturii de porumb. O dovadă clară a implementării acestei direcții în aspectul teoretic, și mai ales în cel aplicativ, este utilizarea practică a polimorfismului proteinelor de rezervă a porumbului în ameliorarea și producerea de semințe din Republica Moldova (RM), începând cu anul 1989. Rezultatele obținute relevă o gamă largă de posibilități privind studiul și utilizarea practică a fenomenului de polimorfism al proteinei de rezervă a porumbului – zeina - în genetică și ameliorare [4, 5, 7].

Eficiența dezvoltării acestor direcții, aplicare lor în practica producerii de semințe de porumb, nu numai în Moldova, ci și în Belarus și Kazahstan, au câștigat recunoașterea de la originatorii hibridilor exportați din RM, companiile naționale de semințe; laboratorul central de calitate a semințelor din Belarus și alte centre de certificare străine [8].

Prioritatea creării Pașapoartelor electroforetice (EF) cu matricele spectrelor de zeină la hibridizii studiați și formele lor parentale, precum și furnizarea către țările importatoare, aparține în prezent exclusiv părții

moldovenești. Cu toate acestea, până în 2020, această procedură a purtat un caracter spontan, adică, crearea matricelor EF a fost îndeplinită la solicitare după necesitate. Prin urmare, din ianuarie 2020, a fost aprobat un Proiect instituțional, a cărui idee de lucru a constat în necesitatea creării unei baze de date sub forma unui „Catalog de pașapoarte electroforetice ale formelor parentale și hibridilor de porumb, omologați în RM și destinați pentru export”, elaborat în formă digitală pe baza standardul național SM-2003 pentru utilizarea sa la nivel internațional [3].

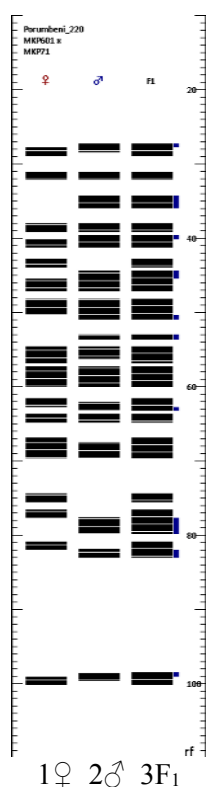
Până la moment, a fost efectuat studiul electroforetic și pașaportizarea profilurilor electroforetice ale zeinei pentru mai mult de 50 de hibridi de porumb omologați și formele lor parentale, care aparțin la diferite grupe de maturitate (FAO 100-500). Pe baza unui eșantion statistic mare, a devenit posibilă testarea ipotezei alternative privind specificul polimorfismului zeinei și a sistemului de markeri proteici, în funcție de apartenența la diferite grupe de maturitate. Verificarea experimentală a acestei ipoteze de lucru a fost scopul principal al prezentei lucrări.

MATERIAL ȘI METODE

Ca **obiect de studiu**, au fost utilizați 54 hibridi de porumb de generație nouă și formele lor parentale, selectați după principiul celei mai mari cereri comerciale în RM și în străinătate, de la doi originatori din R.M.: IP Institutul de Fitotehnie Porumbeni și compania „MTI Maize Technologies International” SRL. Hibridii selectați pentru studiu au fost împărțiți în următoarele grupe de maturitate: grupa de coacere timpurie (FAO 100-199) - 7 hibridi; grupa semitimpurie (FAO 200-299) - 23 hibridi; grupa medie (FAO 300-399) - 16 hibridi, și grupa semitardivă (FAO 400-499) - 8 hibridi.

Pentru a obține spectrele electroforetice inițiale (EF) ale proteinei de rezervă a semințelor de porumb (zeina) pentru liniile parentale ale hibridilor selectați, a fost utilizată metoda electroforezei zeinei pe geluri de poliacrilamidă în mediu acid conform standardului național SM 233:2003 [6]. Spectrele EF ale electroforegramelor inițiale au fost calculate și procesate pe baza unei versiuni noi a Programului FOREZ-2 în următoarea succesiune de acțiuni: 1) binarizarea intensității: banda prezentă (1) sau banda lipsă (0); 2) determinarea graniței benzilor (subunități peptidice ale zeinei - SPZ): rf_{in} și rf_{fin} ; 3) formarea unui fișier text cu o listă a limitelor benzii EF [$rf_{in} - rf_{fin}$] pentru fiecare genotip analizat. Ca urmare a executării pas cu pas a algoritmului programului FOREZ-2, a fost realizată modelarea computerizată a matricelor electroforetice pentru 54 hibridi împreună cu liniile lor parentale prin identificarea automată pe matricele generate computerizat a următoarelor caracteristici: a) specificitatea cantitativă a polimorfismului zeinei pentru fiecare genotip în funcție de formele moleculare ale zeinei (FMZ), reprezentate prin grupe (benzi) de „**subunități peptidice ale zeinei**” (SPZ) pe matricea spectrului sintetizat al hibridului; b) specificitatea cantitativă de marcarea binară a intensității „**formelor moleculare ale zeinei**” (FMZ) ale hibridilor de porumb, care sunt componente ale benzilor EF („subunităților peptidice ale zeinei” - PSZ) [1].

Astfel, pentru a discuta posibilitățile de rezolvare a ipotezei de lucru formulate, au fost create 54 de pașapoarte electroforetice. Pentru fiecare pașaport, în conformitate cu programul FOREZ-2, a fost programată includerea matricelor EF ale liniilor parentale și matricea hibridului corespunzător, a căror sinteză se realizează automat conform principiului codominanței [2].



Hibrid Porumbeni_220

SPZ in forma hibrid

rf_{fin}	rf_{fin}	$[rf_{fin} - rf_{fin}]$
27.20;	28.90;	1.70
31.00;	32.10;	1.10
34.20;	35.90;	1.70
37.90;	39.10;	1.20
39.50;	41.20;	1.70
42.70;	43.90;	1.20
44.30;	47.10;	2.80
48.10;	50.90;	2.80
52.90;	53.60;	0.70
54.50;	56.80;	2.30
57.20;	60.00;	2.80
61.50;	63.20;	1.70
63.60;	64.80;	1.20
66.80;	69.60;	2.80
74.30;	75.50;	1.20
76.50;	79.80;	3.30
80.80;	83.00;	2.20
98.40;	100.10;	1.70

Caracteristica

zonelor de marcare

FMZ mm (semnul ■)

f_{in}	Rf_{fin}	$[Rf_{fin} - Rf_{fin}]$
27.20;	27.70;	0.50;
34.20;	35.90;	1.70;
39.50;	40.10;	0.60;
44.30;	45.40;	1.10;
50.30;	50.90;	0.60;
52.90;	53.60;	0.70;
62.70;	63.20;	0.50;
77.60;	79.80;	2.20;
81.90;	83.00;	1.10;
98.40;	99.00;	0.60;

ÎN TOTAL:

$nr.SPZ_{total} = 18$

$ar-H-SPZ_{tot} = 34.10$

$nr.FMZmk = 10$

Fig. 1. Matricea EF a hibridului de porumb semi-timpuriu Porumbeni 220, precum și rezultatele prelucrării computerizate a spectrului hibrid (nr.3 - F₁) conform algoritmului programului FOREZ-2.

Pentru comoditatea înțelegerii algoritmului experimentelor efectuate cu 54 hibridi de porumb în Fig. 1 este prezentată, ca exemplu, matricea EF a unui hibrid semi-timpuriu de porumb, Porumbeni 220, precum și rezultatele analizei computerizate și determinării următorilor patru parametri finali care caracterizează matricele hibridului corespunzător:

- nr.SPZ suma totală** - cantitatea grupelor de „subunități peptidice ale zeinei” (SPZ), totalitatea cărora vizual, sub formă de benzi, caracterizează spectrul EF general al hibridului;
- ar.SPZ suma totală** - „aria totală” a întregului set de zone EF care caracterizează profilul proteic al matricei hibridului corespunzător;
- nr.FMZmk suma markerilor totală** - este suma caracterelor cantitative ai **markerilor formelor moleculare ale zeinei** (mFMZ) detectate în benzile EF ale subunităților peptidice ale zeinei din spectrul EF al hibridului dat;
- ar.FMZmk suma markerilor totală** - „suprafața totală” a FMZ-urilor markeri de hibridare pentru profilul proteic corespunzător al hibridului studiat.

Prelucrarea datelor experimentale a fost realizată prin metode statistice tradiționale în sistemul Microsoft Office Excel.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul a 54 de matrice hibride a permis obținerea unui volum suficient de mare de date privind cei patru parametri indicați: **nr.SPZ**; **ar.SPZ**; **nr.FMZmk**; **ar.FMZmk**. Pentru prelucrarea și analiza acestora s-au folosit elemente de statistică descriptivă în scopul generalizării primare a datelor obținute pentru fiecare dintre cele 4 grupe de maturitate în funcție de următorii indicatori de variabilitate:

A - coeficientul de variație (V%), determinat de valorile mediei aritmetice și ale abaterii standard;

B - intervalul de încredere [$\Delta = \max - \min$] - intervalul valorilor analizate, care, cu o anumită probabilitate, conține valoarea aevărată a parametrului analizat corespunzător.

Tabelul 1. Variabilitatea indicilor polimorfismului zeinei la hibridi de porumb omologați din diferite grupe FAO

Grupa FAO	Nr hibrizilor studiați	Indicele statistic	Nr. SPZ -suma totală	Aria SPZ -suma totală	Nr. FMZ mk suma markerelor totală	Aria FMZmk -suma markerelor totală
100-199	7	V%	9,5	22,6	45,3	60,2
200-299	23	V%	14,4	13,9	30,0	39,1
300-399	16	V%	18,8	19,8	26,6	38,3
400-499	8	V%	11,3	18,3	25,3	33,9
100-199	7	media	13	38,1	7	7,5
		min	12	31,2	3	2,7
		max	15	56,2	12	14,9
200-299	23	media	15	37,3	10	9,3
		min	11	25,8	5	2,9
		max	18	49,2	14	15,2
300-399	16	media	15	34,1	12	11,0
		min	12	22,9	7	3,7
		max	21	43,4	17	16,6
400-499	8	media	16	40,8	11	13,6
		min	13	30,1	6	5,6
		max	18	50,1	15	19,8
100-199	7	Δ	3	25,0	9	12,2
200-299	23	Δ	7	23,4	9	12,3
300-399	16	Δ	9	20,5	10	12,9
400-499	8	Δ	5	20,0	9	14,2

Toate aceste date sunt sintetizate în Tabelul 1, precum și sub formă de diagrame tridimensionale prezentate în Fig. 2, datorită cărora este posibil să se compare vizual coeficienții de variație, V% (diagrama A) și intervalul de încredere Δ [=max-min] (diagrama B) atât pentru patru indicatori ai polimorfismului zeinei la hibridii omologați, cât și pentru apartenența lor la grupa FAO.

După coeficientul de variație, s-a constatat că doar prima grupă de hibridi de maturitate timpurie (FAO 100-199) se evidențiază după manifestarea specifică a polimorfismului zeinei. Această specificitate se exprimă într-o valoare nesemnificativă a coeficientului de variație ($V < 10\%$) pentru numărul total de grupe de subunități peptidice ale zeinei (*nr.SPZ*) și un coeficient de variabilitate semnificativ ($V > 20\%$) pentru alți 3 parametri: *ar.SPZ*; *nr.FMZmk*; *ar.FMZmk*.

Coeficienții de variație (V%) pentru celelalte trei grupe de maturitate (FAO 200-299, FAO 300-399, FAO 400-499) se caracterizează prin valori de semnificație medie atât pentru numărul total de grupe de subunități peptidice (*nr.SPZ*), cât și pentru suprafața totală a întregului set de zone EF ale matricei proteice (*ar.SPZ*). Valoarea semnificativă a variabilității ($V > 20\%$) pentru aceste trei grupe de maturitate a fost remarcată pentru zonele markeri de hibridare atât după numărul lor total (*nr.FMZmk*), cât și după aria lor totală (*ar.FMZmk*) pentru întregul set de markeri de hibridare *ar.FMZmk* ai profilului proteic a hibridului corespunzător.

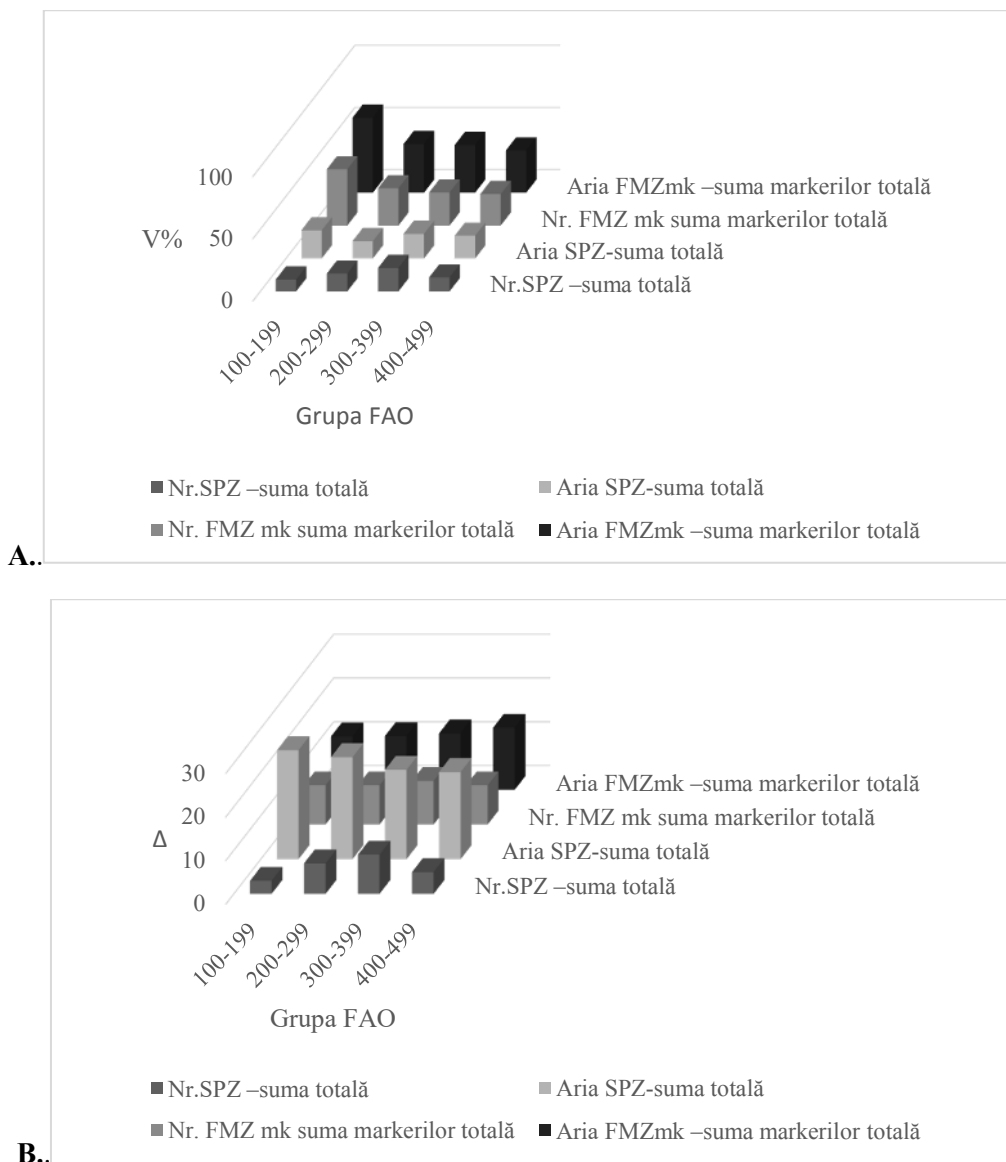


Fig. 2. Comparația coeficienților de variație, $V\%$ (diagrama A) și intervalele de încredere, Δ [max - min] - (diagrama B) pentru patru indicatori ai polimorfismului zeinei la hibridii zonați în funcție de apartenența la grupul FAO.

Astfel, în funcție de coeficientul de variație pentru eșantionul de hibridi studiați prin metoda de electroforeză, se poate afirma că s-a stabilit un nivel mai ridicat de manifestare a polimorfismului zeinei nu în funcție de grupa de maturitate, ci în funcție de utilizarea unor parametri specifici precum: numărul total și aria totală a FMZ-urilor markeri de hibridare: *nr.FMZmk* și *ar.FMZmk* (Fig. 2 A). Totodată, este posibil, sub acest aspect, să presupunem că un rol mai semnificativ ar avea apartenența genotipurilor heterozigote studiate la unul dintre cele 4 tipuri de hibridi (simplu, simplu modificat, trilinear, dublu interliniar). Dar o astfel de interpretare nu corespunde scopului formulat pentru evaluarea ipotezei de lucru a materialului experimental prezentat.

În urma analizei unui alt indicator de variabilitate - intervalul de încredere (Δ) - numai pentru numărul de subunități peptidice ale zeină (*nr.SPZ*), un interval relativ îngust al parametrului discutat variază pentru grupele de maturitate studiate: de la 3 la 9 SPZ. În ceea ce privește „aria totală” a întregului set de zone EF ale matricei proteice a hibridului corespunzător (*ar.SPZ*), există o tendință ușoară de reducere a intervalului de încredere pentru FAO de la 100 la 399, cu o ulterioară egalare a acestei valori în spectrele electroforetice ale zeinei a 8 hibridi de porumb semi-tardiv.

Un interes deosebit prezintă informația despre numărul și aria totală a markerilor formelor moleculare ale zeinei - *nr.FMZmk* și *ar.FMZmk*. Indiferent de grupa de maturitate, intervalul de încredere pentru numărul de markeri ai formelor moleculare ale zeinei (*nr.FMZmk*) aproape nu se schimbă: intervalul de valori este de 9-10 *FMZmk*. Constatarea unei dependențe similare este caracteristică și pentru parametrul „suprafață totală” a FMZ-urilor markeri de hibridare pentru profilul proteic hibridului corespunzător studiat (*ar.FMZmk*): intervalul de încredere aproape nu se modifică și variază de la 12,2 la 12,9 în procesul de creștere a grupei FAO de la 100 la 399. Numai în grupa hibridilor semi-tardivi intervalul parametrului discutat crește la 14,2. Stabilitatea relativă determinată a intervalelor de încredere pentru parametrii EF studiați pentru toate grupele de maturitate este destul de clar demonstrată în Fig. 2B.

CONCLUZII:

1. Pentru eșantionul total al hibridilor studiați, în funcție de coeficientul de variație, s-a constatat că nivelul mai ridicat de manifestare a polimorfismului zeinei nu depinde de apartenența la grupa de maturitate, ci este determinat de utilizarea unor astfel de parametri specifici, ca numărul total și aria totală a markerilor formelor moleculare ale zeinei: *nr.FMZmk* și *ar.FMZmk*.
2. Stabilitatea relativă apreciată pentru intervalele de încredere pentru patru parametri electroforetici ai polimorfismului zeinei la 54 de hibridi de porumb este un argument semnificativ că acest indicator de variabilitate nu evidențiază specificul polimorfismului zeinei în funcție de grupa de maturitate a hibridilor studiați.
3. În rezultatul verificării ipotezei de lucru alternative privind specificul polimorfismului zeinei și a sistemului de markeri proteici în funcție de apartenența la 4 grupe de maturitate în diapazonul FAO 100-499 s-a formulat concluzia principală: după caracteristicile cheie ale polimorfismului zeinei și ale sistemului de markare a proteinelor (*nr.SPZ*; *ar.SPZ*; *nr.FMZmk*; *ar.FMZmk*) nu a fost evidențiată o specificitate clară în funcție de grupele de maturitate ale hibridilor studiați.

MULȚUMIRI

Autorii sunt recunoscători conducerii Institutului de Fitotehnie Porumbeni și a Companiei „MTI Maize Technologies International” SRL pentru materialul semincer de hibridi de porumb asigurat pentru pașaportizarea EF și consultantului Proiectului Dlui dr. hab.șt. biol. Rotari A.I. pentru sfaturi valoroase în planificarea studiului și recomandări pentru proiectarea articolului.

Bibliografie:

1. Adamciuc, A.; Batiru, Gr.; Comarova, G.; Bounegru, S., Rotari E. *Algorithm for creating electrophoretic passports of maize hybrids*. In: Materials of Scientific International Symposium “Advanced Biotechnologies - Achievements and Prospects”. - Chisinau, Republic of Moldova, 2022, pp.7-9.
2. Batiru, Gr.; Comarova G.; Rotari, A.; Rotari, E. *Protein markers as a tool for accelerating the sale of maize hybrids of the Moldovan breeding for export*. In: *Abstract book The XIth International Congr. of Geneticists and Breeders*. - Chișinău, 2021, p. 19.
3. Batiru, G.K.; Komarova, G.E.; Adamchuk, A.N.; Rotari, A.I.; Bounegru, S.N.; Rotari, E.A. *Novye podhody v modelirovanii elektroforeticheskikh pasportov gibridov kukuruzy i ih roditel'skikh linij*. V: Sbornike Materialov V Mezhdunarodnoj Nauchnoj Konferencii «Genetika I Biotehnologija XXI Veka: Problemy, Dostizhenija, Perspektivy». Minsk. Nojabr' 2022. - C. 22.
4. Comarova, G.E. Roli fiziologo-biohimicheskikh issledovanij v razrabotke sovremennyh napravlenij v oblasti selekcii i genetiki rastenij. UASM. *Lucrări științifice*, Vol.29: Agronomie. UASM. - Chișinău, 2011, p. 67-77.
5. Comarova, G.E.; Ротарь, Е.А.; Ротарь, А.И. *Metodologicheskie podhody k izucheniju polimorfizma zeina kak osnovy ocenki chistoty linij, stepeni gibridnosti i opredelenija jeffekta geterozisa na urovne belkovykh molekul*. Registrată la Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a R.Moldova (AGPI) , CERTIFICAT de înregistrare a obiectelor dreptului de autor și drepturilor conexe. Seria OȘ Nr. 3369 din 08 05. 2012, Chișinău, 72 pag.
6. Rotari, A.; Comarov, G.; Guțanu, C. *Standard Moldovean SM 233:2003. Semințe de porumb. Determinarea purității biologice a liniilor consangvinizate și a gradului de hibridare la semințele hibridilor de porumb de prima generație prin metoda de electroforeză a proteinelor*. În: Depart. „Moldova-Standard”. - Chișinău, 2003. - 34 p.

7. Rotari, A.I.; Мику, В.Е.; Комарова, Г.Е. Vozmozhnosti ispol'zovanija metoda jelektroforeza zeina v selekcii i semenovodstve kukuruzy. V: Sb. nauchn. trudov – 90 let KNIISH “*Jevoljucija nauchnyh tehnologij v rastenievodstve*”. Tom 2. Tritikale. Sortoizuchenie i semenovodstvo. Jachmen'. Kukuruz. Krasnodar 2004, s. 288-295.
8. Rotari, A.I.; Мику, В.; Петрова Н.; Комарова, Г. Sopostavimost' i effektivnost' elektroforeticheskih metodov, ispol'zuemyh v Respublike Moldova i Respublike Belarus' dlja sertifikacii gibridnyh semjan kukuruzy. În: *Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor*. - Chișinău, Î.S.F.E.-P. 2008, p. 443–447.