

ELABORAREA SI OPTIMIZAREA METODOLOGIEI DE CERCETARE

Urmatoarele metodologii de cercetare caracteristice materialului studiat si obiectivelor propuse au fost elaborate si optimizate in primul an de proiect :

a. Analiza transcriptionala (cDNA-AFLP)

Tehnica cDNA-AFLP este una din tehnologiile ultramoderne folosite in cercetare pentru determinarea diferentelor intre genotipuri in ceea ce priveste expresia genica in conditii fiziologice sau de stres. Tehnica se bazează pe digestie cu enzime de restrictie a template-ului de AND complementar(ADNc) urmată de ligarea de adaptor pentru fragmentele de restricție și amplificarea PCR selectivă ale acestor fragmente folosind primeri selectivi care corespund ca si secventa adaptorului si secventei recunoscuta de enzima de restrictie. Selectivitatea lor apare de la una sau mai multe baze suplimentare la capatul 3' numite nucleotide selective. Aceste nucleotide selective asigura faptul ca numai un subset de fragmente de restricție este amplificat la un nivel detectabil. Metoda implică transcriere inversa de ARN mesager în ADNc dublu catenar, urmată de generarea unui complex amestec de fragmente derivate din transcripte (TDF) prin digestie cu enzime de restricție și ligarea de adaptorii specifici enzimelor de restrictie, amplificarea selectivă PCR și în cele din urmă vizualizarea si secventierea TDFs. Etapele parcurse pentru elaborarea protocolului de lucru la Rubus au fost:

1. Izolarea, purificarea si cuantificarea ARN-ului total

Ca material biologic pentru izolarea ARN-ului total s-au folosit frunze recoltate atat de la soiuri de zmeur ,cat si de mur. Acestea s-au mojarat in azot lichid si din pulberea obtinuta s-a facut extragerea ARN-ului folosind coloane si solventi incluse in kitul Spectrum Plant Total RNA in conformitate cu instructiunile oferite de producator. S-a avut in vedere respectarea cu strictete a conditiilor de asepsie pentru a se evita degradarea materialului obtinut de catre ARNaze sau contaminarea ARNului cu ADN. Cantitatea si calitatea ARN-ului total s-a determinat prin trei metode :

a) metoda spectrofotometrica. Intrucat acizii nucleici absorb lumina UV intre 250 si 270 nm cu un maximum la 260 nm citirile la 260 nm permit calcularea concentratiei de acid nucleic din proba. Un indice OD de 1 corespunde in cazul ARN-ului unei concentratii de 40 µg/ml. Pentru a vedea puritatea ARN-ului izolat am calculat raportul dintre citirile la 260 si 280 nm si am folosit pentru etapele ulterioare numai ARN cu un A_{260}/A_{280} intre 1.8 si 1.95.

b) metoda RNA Nano folosind Bioanalizatorul 2100 achizitionat in cadrul proiectului si RNA 6000 Nano Kit care ne permite nu numai vizualizarea subunitatilor 18S si 28S de ARN ribozomal (ARNr) dar si calcularea integritatii ARN-ului (RIN) conditie de baza pentru evaluarea calitatii ARN-ului.

c) metoda electroforetica; Electroforeza in gel de agaroză a probelor de ARN poate fi suficientă in a vedea integritatea și calitatea unui preparat de ARN total prin inspectarea aspectului benzilor de 28S și 18S de ARNr. In acest sens am migrat probele de ARN total in geluri de agaroză de 1% care s-au colorat cu bromura de etidium si vizualizat la lumina UV.

Dupa optimizarea protocoului in vederea obtinerii unei cantitati de ARN total de calitate superioara (in ceea ce priveste integritatea si concentratia) am trecut la izolare si purificare de ARN mesager. S-a folosit

NucleoTrap mRNA care are la baza capturarea ARNului mesager pe bile de oligodT intrucat acest tip de ARN este poliadenilat la capatul 3'.

2. Sinteza primei catene de ADNc

Pentru obtinerea primei catene de ADNc s-a folosit ca matrita atat ARN-ul total cat si ARNm izolat din ARN-ul total. In acest sens s-a realizat tratarea ARN-ului total cu enzima ADNaza (DNase). Acest tratament a avut ca scop digestia ADN-ului genomic care ar putea contamina proba de ARN, ceea ce ar duce la rezultate fals pozitive in cazul unei analize ulterioare cum ar fi real time PCR. Pentru sinteza primei catene de ADNc s-a folosit reverstranscriptia PCR (RT-PCR) intr-o reactie catalizata de enzima reverstranscriptaza si respectand instructiunile furnizate de producator. Ca primer am folosit oligodT.

3. Sinteza celei de-a doua catene de ADNc

Sinteza celei de-a doua catene de ADNc s-a realizat folosind sistemul Universal Riboclone cDNA synthesis system folosind instructiunile furnizate de producator. Protocolul a fost optimizat prin modificarea conditiilor de reactie, respectiv reducerea temperaturii de incubare a reactiei. Dupa obtinerea de ADNc dublu catenar, acesta a fost purificat folosind sistemul Nucleospin Extract II si utilizat pentru efectuarea analizei AFLP. Concentratia de ADNc s-a determinat spectrofotometric si de asemenea calitatea acestuia sa-a vizualizat in gel de agaroză. Pentru etapele urmatoare s-a folosit aceeași concentratie de ADNc la toate probele.

4. Efectuarea analizei AFLP

Pentru analiza AFLP propriu-zisa s-au parcurs mai multe etape, si anume:

4.1. Digestia ADNc cu enzime de restrictie

Pentru a se pregati un profil AFLP, ADN-ul este digerat cu două endonucleaze de restricție simultan. Acest pas generează substratul necesar pentru ligarea și amplificarea ulterioară. Fragmentele de restricție pentru amplificarea sunt generate de două endonucleaze: EcoRI și MseI. . Enzimele de restricție recunosc secvențe specifice de nucleotide din ADN și le fragmentează la anumite situsuri generand fragmente de restricție. In acest sens am folosit enzime incluse in kitul comercial AFLP care au aceleasi conditii de incubare si mediu de reactie cu compozitie similara, inasa si enzime comandate separat (EcoRI si Tru9I care e similar lui MseI) care au conditii de incubare diferite. Cele doua metode s-au testat pentru a gasi cea mai economica solutie de realizare a analizei AFLP. EcoRI are un site de recunoastere 6-bp, și a MseI de 4-bp. Atunci când sunt utilizate împreună, aceste enzime generează mici fragmente de ADN care vor fi ulterior amplificate si separate pe geluri de poliacrilamidă avand dimensiuni optime (<1 kb) pentru separare. Enzima EcoRI recunoaste secventa G↓*A*ATT*C si genereaza fragmente cu capetele 5' coezive. Enzima Tru9I sau MseI T↓TAA si genereaza tot fragmente cu capetele 5' coezive.

4.2. Legarea adaptorilor

Endonucleazele de restrictie sunt inactivate prin caldura anterior legarii adaptorilor. Ca adaptorii se folosesc secvențe specifice capetelor generate de taierea cu digestia cu EcoRI (reverse si forward) si la fel pentru MseI care se vor lega la capetele fragmentelor generate si vor servi ca matrita pentru primers folosit in reactiile de preamplificare si amplificare. In cazul nostru am folosit adaptorii inclusi in kitul AFLP dar si „custom” pe care i-am desenat si comandat noi in vederea optimizarii metodei dar si gasirii unei solutii mai economice. Ideea marcarii unuia din adaptorii este ca in felul acesta toate amplificariile ulterioare vor fi facute la fragmente cu doi adaptari diferiti ceea ce va simplifica separarea si analiza fragmentelor. Dupa legarea adaptorilor care s-a facut prin incubarea fragmentelor digerate cu amestecul de adaptorii si incubarea in anumite conditii s-a trecut la urmatoarea etapa.

4.3. Reactia PCR de preamplificare

Fragmentele de ADN cu adaptori sunt amplificate cu primers avand cate o nucleotida selectiva (adica secventa complementara adaptorului plus o nucleotida la alegere). Am folosit atat primers inclusi in kitul AFLP (preamp primer mix) dar si custom primers desenati si comandati de noi. Dupa preamplificare s-au analizat produsii obtinuti prin electroforeza in gel de agaroză.

4.4. Reactia PCR de amplificare selectiva

Produsii PCR din reactia de preamplificare sunt diluati și folositi ca matrita pentru amplificarea selectivă folosind seturi de doi primers fiecare conținand trei nucleotide selective. Cel mai important factor în determinarea numărului obtinut de fragmente de restricție este numărul de nucleotide selective în primerul selectiv precum si numarul de combinatii de primers. Un al doilea factor în determinarea numărului de fragmente amplificate este prezenta C și G ca nucleotide selective. În general, utilizarea primerilor bogati in G si C duce la un numar mai redus de fragmente. Noi am testat 64 combinatii de primers iar dintre acestia un numar de 16 combinatii dau profile cu un grad ridicat de polimorfism.

5. Separarea prin electroforeza si vizualizarea produsilor AFLP

Fragmentele amplificate au fost separate prin electroforeza. Pentru a obtine o separare cat mai buna a fragmentelor s-au optimizat conditiile de migrare electroforetica. S-au testat geluri de agaroză de diferite concentratii (1%, 2% si 5%) precum si geluri de poliacrilamida nondenaturante de 8 si 12% pentru a se vedea unde se obtine cea mai buna separare. Vizualizarea fragmentelor s-a realizat prin expunerea gelurilor colorate cu bromura de etidium la lumina ultravioleta. A fost de asemenea elaborat protocolul de colorare a gelurilor cu argint, acest protocol urmand a fi aplicat in cazul in care observam diferente importante in ceea ce priveste raspunsul soiurilor expuse la factori de stres. In acest caz fragmentele vor fi separate prin electroforeza pe gel de poliacrilamida de 6% si in conditii de denaturare. De asemenea, fragmentele obtinute in urma amplificarii au fost analizate si prin electroforeza capilara cu Bioanalizatorul 2100 folosind kitul Agilent DNA 1000 Kit pentru separarea, cuantificarea si masurarea fragmentelor de ADN dublu catenar de 25 pana la 1000 bp.

6. Izolarea purificarea si multiplicarea fragmentelor de ADN utilizand diferiti transcriptori

Pentru analiza raspunsului genomic este necesara purificare, amplificarea si secventierea fragmentelor particulare unui anumit soi sau situatie de stres. In acest sens a fost elaborat protocolul de extragere, elutie si purificare a fragmentelor de ADN din gel. Materialele folosite sunt componente ale kitului Nucleospin Extract II. Dupa extragere, ADN-ul se cloneaza folosind pGEMT Easy Vector system. In acest sens, s-au elaborat protocelele de purificare si multiplicare a fragmentelor de ADN izolate din gel precum si de ligare a acestora in vectori si urmeaza ca aceste protocele sa fie aplicate in cazul in care se obtin benzi polimorfice specifice unei anumite situatii de stres.

7. Transformarea celulelor competente de E coli cu ADN plasmidial

Fragmentele particulare de ADN izolate in urma analizei AFLP si clonate in plasmide vor fi multiplicare in celule bacteriene. In acest sens s-a elaborat protocolul de transformare a celulelor bacteriene cu ADN plasmidial ce contine secventa de interes urmand ca acesta sa fie optimizat in functie de rezultatele obtinute pe parcursul derularii experimentelor.

8. Izolarea si secventierea coloniilor de interes

Secventierea fragmentelor de interes se va face in urma izolarii ADN-ului pasmidial din coloniile dezvoltate pe medii selective. Protocolul de izolare si purificare a ADN-ului plasmidial a fost elaborat urmand sa se aplice in conditiile in care analiza AFLP va indica un existenta unui raspuns indus de stres.

Secventierea se va face la momentul respectiv urmand instructiunile furnizate de producatorul aparatului de secventiere.

9. Determinarea potentialelor functii ale genelor multiplicatae utilizand BlastX search

Aceasta etapa presupune compararea secventei obtinute in urma secventierii cu alte secvente existente in baza de date folosind programul Blast. In functie de rezultatele obtinute fragmentele de interes ar putea fi asociate unor gene sau nu.

In urma practergerii etapelor descrise mai sus s-a elaborat protocolul de analiza AFLP a ADN-ului complementar la zmeur si mur (Figura 1). In literatura de specialitate nu exista nici o lucrare care sa vizeze analiza diferentelor in expresia genica prin tehnica cDNA-AFLP la mur iar pentru zmeur exista doar o referinta insa metodologia nu este descrisa in detaliu. Prin urmare, protocolul elaborat va constitui un element de noutate pentru speciile mentionate si obiectivul abordat si anume analiza raspunsului genomic in functie de interactiunea dintre cultivar si conditiile de mediu suboptimale.

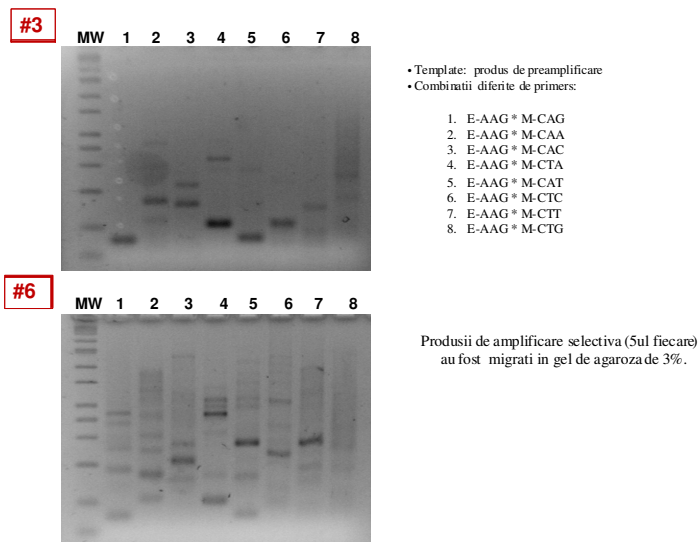


Figura 1: Exemplu de profil cDNA-AFLP la zmeur (#3) si mur (#6) obtinut in urma amplificarii fragmentelor de restrictie cu primeri avand trei nucleotide selective.

In exemplele respective separarea fragmentelor s-a facut pe gel de agaroză inasa am testat si separarea pe gel nativ de poliacrilamida (Figura 2) precum si prin electroforeza capilara cu Bioanalizatorul (Figura 3). In unele situatii am folosit ca si control pozitiv probe de ADN de la rosii si Arabidopsis furnizate odata cu kitul AFLP.

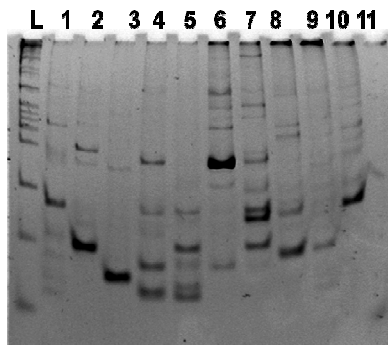


Figura 2: Fragmente polimorfice separate in gel de poliacrilamida (L= ladder; 1-6 probe de zmeur; 7-11 probe de mur)

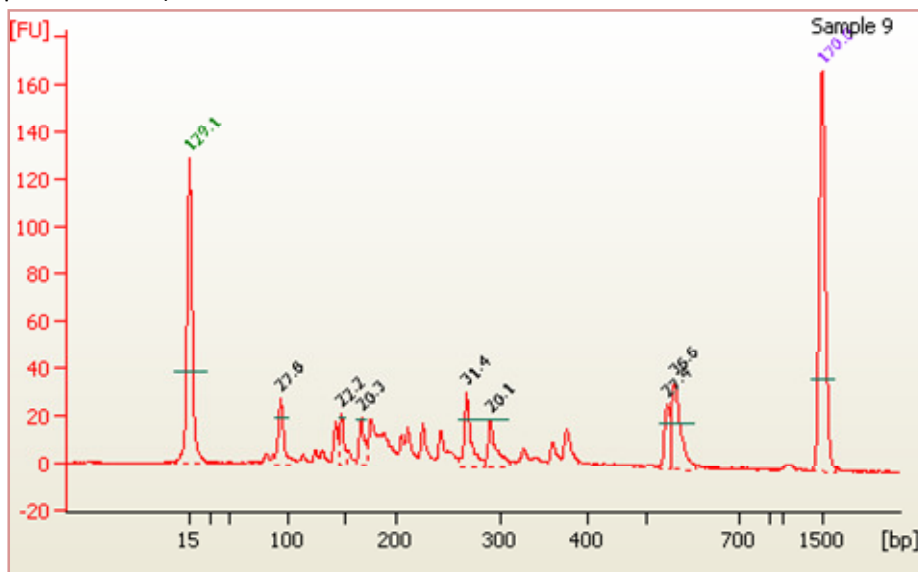


Figura 3: Fragmente polimorfice (probe de zmeur) separate prin electrofoeza capilara folosind Bioanalizatorul 2100

Tehnica astfel elaborata a fost testata experimental pentru a vedea daca stresul hidric induce modificari in profilul fragmentelor de restrictie si, respectiv, in expresia genica. In acest scop s-au facut experimente cu plante de zmeur din soiul Ruvi, care s-au mentinut pentru doua saptamani in conditii de sera cu temperatura si umiditate constante. Plantele s-au impartit in doua loturi, si anume martorul care a fost hidratat 100% pe toata durata experimentului si proba care a fost mentinuta in conditii de hidratare de 35% ceea ce a reprezentat un stress pentru planta. Dupa cum se vede din Figura 4, exista diferente semnificative in profilul cDNA-AFLP intre martor (hidratare 100%) si proba (hidratare 35%) ceea ce sugereaza ca stresul hidric induce alterari in expresia genelor. Fragmentele specifice vor fi detasate din gel urmand ca ADN-ul sa fie eluat din acestea si purificat in vederea clonarii si secventierii.

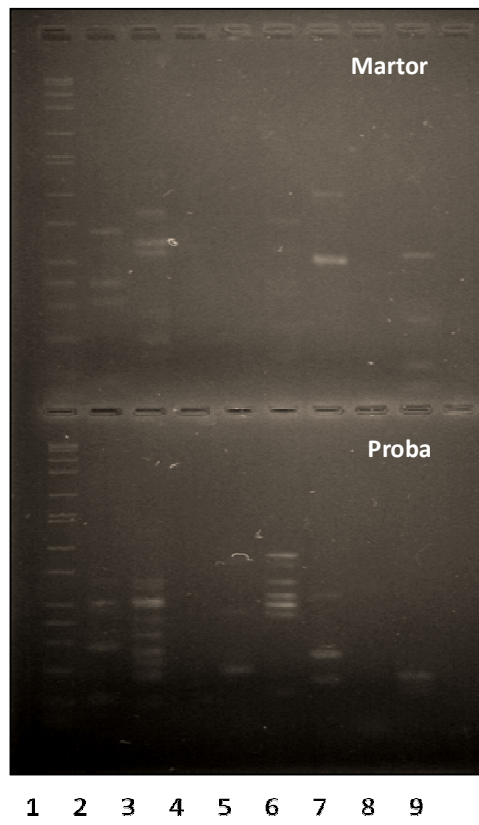


Figura 4: Diferente in profilul cDNA –AFLP induse de stresul hidric la plante de zmeur (soiul Ruvi) folosite ca martor (hidratare 100%) sau proba (hidratare 35%) . In cazul respectiv, amplificarea selectiva s-a realizat cu aceleasi combinatii de primeri selectivi (probele 2-9) si folosind aceeasi concentratie de template, atat pentru martor cat si pentru proba. Proba 1 din gel este ADN ladder. Migrarea fragmentelor s-a realizat in gel de agaroză de 2% colorat ulterior cu bromura de etidiu si vizualizat la sistemul de documentare cu lumina ultravioleta

ELABORAREA SI OPTIMIZAREA PROTOCOALELOR PENTRU ANALIZA METABOLISMULUI FENILPROPANILOR

Elaborarea si optimizarea protocoalelor de analiza a metabolismului fenilpropanilor la unele soiuri ale speciei *Rubus* este mentionata in calendarul activitatilor din CF ca fiind componenta a activitatii 3 si anume “Elaborarea metodologiei de cercetare si caracterizarea materialului biologic luat in studiu”. Aceasta subactivitate (3.2.) a fost planificata a se desfasura in lunile 4-9 de proiect urmand ca pe baza protocoalelor elaborate sa se analizeze influenta conditiilor de cultura asupra metabolismului secundar al fenilpropanilor la genotipurile de zmeur si mur incluse in lotul experimental. Urmatoarele subactivitati au fost realizate in cadrul activitatii mentionate mai sus:

1. Extractia si cuantificarea proteinelor totale

Pentru studierea activitatii genice la nivel translational sau post-translational este necesara in primul rand elaborarea si optimizarea metodelor de extractie a proteinelor, produsi genici care indeplinesc roluri structurale sau functionale in celula vegetala. Metodele de extractie depind de caracteristicile tesutului investigat. In cazul experimentelor noastre materialul vegetal utilizat a fost reprezentat de frunze de zmeur si mur, tesuturi nelignificate astfel ca omogenizarea lor nu a necesitat metode speciale de distrugere mecanica a celulelor. Omogenizarea tesuturilor s-a realizat prin mojararea acestora in azot lichid, cu adaos de polivinilpirolidona pentru a diminua efectul negativ al compusilor fenolici, prezenti in tesutul vegetal, asupra activitatii enzimelor. Pentru extractia proteinelor am testat doua solutii tampon cu pH diferit, precum si cantitati diferite de material vegetal. Acest lucru a fost facut intrucat este necesara stabilirea raportului optim intre greutatea materialului vegetal si volumul mediului de extractie astfel incat sa se poata extraga o cantitate suficienta de proteine active. Cuantificarea proteinelor in extractele obtinute s-a realizat prin metoda spectrofotometrica cu reactivul Bradford si pe baza unei curbe standard de albumina serica de bovine (BSA). Alternativ, s-a utilizat si extractia proteinelor, dupa mojarare, in solutie tampon colorata cu albastru de bromofenol care se foloseste ca solutie de migrare a proteinelor in electroforeza. In acest caz, s-a folosit un raport de 1:1 intre cantitatea de material vegetal (g) si solutia de migrare (mL).

2. Separarea proteinelor prin SDS-PAGE

Spre deosebire de electroforeza clasica in care migrarea proteinelor depinde de incarcarea electrica a proteinelor la un anumit pH a mediului, masa moleculara, marimea proteinelor dar si intensitatea campului electric, SDS-PAGE foloseste dodecil sulfat de sodiu (SDS) care denatureaza proteinele si confera o incarcatura electrica negativa complexului SDS-proteina astfel incat migrarea proteinelor se va realiza in functie de masa moleculara a acestora. In stare denaturata marimea proteinelor este aproximativ proportionala cu masa lor moleculara. Aceasta corelatie face posibila estimarea masei moleculare a proteinelor necunoscute cu ajutorul unor proteine martor a caror masa moleculara este deja cunoscuta. Pentru studierea si analiza proteomica al extractului din frunze de zmeur si mur s-au utilizat extracte obtinute prin metodele mentionate anterior. Dupa adaugarea solutiei de migrare cu bromofenol, acestea au fost fierte la 100 grade celsius pentru a se denatura proteinele. Probele pregatite astfel au fost incarcate in geluri de acrilamida adaugata in diferite concentratii. Compozitia gelurilor de migrare in acrilamida depinde de greutatea proteinelor care trebuiesc separate. Tinand cont

de faptul ca proteinele care vor fi studiate in cadrul proiectului au greutatea moleculara de pana la 100 kD pentru testarea conditiilor optime de migrare si separare a benzilor proteice s-au utilizat geluri cu concentratie de acrilamida de 10%, 12,5% si 15 % . In plus, pentru a obtine o separare optima a proteinelor, s-au testat diferite variatii ale tensiunii la care se face migrarea (de la 100 pana la 140 V) cat si concentratii diferite de proteine. Cuantificarea continutului de proteina optima pentru incarcare a fost efectuata utilizand dilutii succesive de albumina serica (BSA). Dupa migrare gelurile au fost colorate cu colorant Coomassie, decolorate si scanate pentru a se face analiza eficientei electroforezei.

3. Immunoblotting of PAL and CHS cu antibiotici specifici

Tehnica Western Blot permite determinarea prezentei unei proteine specifice intr-o proba dupa separarea prin SDS-PAGE. Proteinele astfel separate sunt transferate (pe baza campului electric) de pe gel pe o membrana adsorbanta pe care proteinele sunt retinute prin forte hidrostactice sau interactiuni hidrofobe. Dupa transfer membrana este incubata cu o proteina nespecifica (cum ar fi cazeina sau albumina) care se leaga de locurile neocupate de pe membrana. Un anticorp primar capabil sa se lege de proteina specifica este adaugat, apoi are loc o spalare si o a doua incubare in solutie cu anticorpul secundar. Anticorpul secundar conjugat cu o enzima recunoaste anticorpul primar de pe membrana permitand astfel detectia prin chemiluminescenta sau colorimetrie. In cadrul experimentelor de optimizare a metodei s-au testat diferite conditii de transfer al proteinelor separate prin SDS PAGE pe o membrana de Polivinilidene Difluoride (PVDF). Pentru transfer s-au utilizat geluri pe care s-au migrat atat extracte proteice cu dilutii diferite cat si BSA in diferite concentratii pentru a quantifica cantitatea optima de proteina care poate fi transferata in anumite conditii. Conditiiile de transfer au fost determinate prin variatia intensitatii campului electric (intre 30V si 100V) si a timpului de transfer (intre 60 si 180 de minute). Eficienta transferului a fost testata prin colorarea membranei cu reactiv Ponceau si respectiv a gelului cu Coomassie. Dupa decolorare, atat membrana cat si gelul s-au scanat si s-au comparat semnalele obtinute. In conditiile in care semnalele corespunzatoare benzilor proteice de interes erau intense pe membrana si absente sau foarte putin vizibile pe gel am considerat ca s-au atins conditiile optime de transfer.

4. Incercari de cuantificare enzimatica a activitatii PAL and CHS

Pentru determinarea activitatii enzimei PAL am folosit o metoda directa spectrofotometrica. Principiul acestei metode se bazeaza pe masurarea productie de cinamat prin monitorizarea schimbarilor in absorbtia la 290 nm a unei solutii de extract proteic incubate, in prealabil, cu fenilalanina la 30-40 grade

Celsius in baie de apa. Din valorile obtinute se extrag cele obtinute pentru martor (proba fara extract proteic). Activitatea PAL se apreciaza tinand cont de regula ca orice schimbare de 0.01 in absorbția la 290 nm este echivalenta cu producerea a 3.09 nanomoli de acid cinamic. Metoda aplicata s-a optimizat in sensul stabilirii conditiilor de reactive cum ar fi: cantitatea de substrat, concentratia de protein folosita, conditiile de reactie. Dupa optimizare metoda s-a testat cu success atat pentru genotipurile de zmeur cat si pentru cele de mur. Pentru determinarea activitatii enzimei CHS am folosit o metoda indirecta biochimica, intrucat o metoda directa ar presupune folosirea de material radioactive ceea ce contravene regulamentului de protective a muncii de la USAMV. Intrucat CHS este prima enzima in calea metabolica de sinteza a flavonoizilor, am estimat activitatea acestei enzime prin determinarea calitativa si cantitativa a productiei de flavonoizi. Extractia flavonoizilor s-a facut prin omogenizarea materialului vegetal cu acetona. Dupa centrifugare si decantare, supernatantul care contine flavonoizi a fost tratat cu o solutie acida de DMACA si citit la spectrofotometru la 640 nm. Valorile obtinute s-au calculat pe baza ecuatiei obtinute dupa alcatuirea unei curbe standard din solutii de catechina cu concentratii intre 2 si 12 mg/L. Rezultatele care reprezinta continutul total de flavonoli s-au exprimat in miligrame de echivalenti de catechina pe 100 g material vegetal. Determinarea calitativa s-a realizat prin cromatografie in urma careia diferitele categorii de flavonoizi au fost separate si ulterior cuantificate.

5. Analiza expresiei genice codificata de PAL si CHS prin RT-PCR

Pentru analiza expresiei genice codificata de PAL si CHS s-a folosit tehnica de real time RT-PCR. ADN-ul complementar obtinut in urma reactiei de reverstranscriptie a ARN-ului total izolat din frunze (conform protocolului prezentat la subactivitatea 3.1.) a fost amplificat cu primeri specifici pt CHS si PAL care s-au desenat pe baza informatiei existente in baza de date pubmed. Intrucat CHS si PAL sunt familii de multigene am folosit doua perechi de primers pentru amplificarea specifica a celor doua gene PAL si trei perechi de primers pentru amplificarea specifica a trei gene CHS. In plus, s-au amplificat si genele actina si histona 3 care s-au luat ca gene de referinta. Metoda a trebuit testata si optimizata in ceea ce priveste compozitia amestecului de reactive precum si a conditiilor de PCR in timp real.

6. Determinarea cantitativa a fenolilor si antocianilor

Pentru determinarea cantitativa a fenolilor s-a folosit metoda o metoda spectrofotometrica si reactivul Folin-Ciocalteu. Acesata metoda se bazeaza pe determinarea intensitatii culorii albastre a complexelor formate in urma transferului de electroni in mediu alcalin de la fenoli la complexele acide fosfomolibdric/fosfotungstic ale reactivului Folin-Ciocalteu prin masuratori la spectrofotometru la 760

nm. Concret, tesutul vegetal se mojară în azot lichid iar fenolii se extrag cu solvent (metanol). Extractul obținut se incubează în mediu alcalin cu reactivul Folin-Ciocalteu, după care, se citește absorbția la spectrofotometru la 730 nm. Din valorile obținute se calculează cantitatea de fenoli pe baza ecuației rezultată din curba standard. Aceasta din urmă se obține în urma determinării absorbției unor soluții standard (acid galic cu molaritate cuprinsă între 50 și 2.5 mmoli) ca urmare a incubării acestora cu reactivul Folin-Ciocalteu în mediu alcalin. Rezultatele finale se exprimă în nanomoli echivalenți de acid galic pe gram de țesut vegetal.

Antocianii s-au extras în acetona iar extractul obținut s-a incubat inițial în soluție tampon cu pH 1. Absorbția s-a citit la 510 și 700 nm. După aceasta extractul respectiv s-a incubat în tampon cu pH de 4.5 și absorbția s-a măsurat la aceleași lungimi de undă ca cele menționate mai sus. Din valorile obținute pentru cele două tipuri de pH s-a calculat conținutul total de antociani monomerici. Conținutul de antociani a fost ulterior exprimat în miligrame de echivalenți de cianidin 3-glucozid per 100 g material proaspăt întrucât acest tip este cel mai bine reprezentat în speciile de *Rubus*. O altă metodă folosită pentru determinarea antocianilor a constat în incubarea acestora în metanol acidificat pentru 2-3 zile, la temperatura scăzută și citirea absorbției la 530 și 657 nm. Valorile calculate în urma diferenței între A₆₅₇ și A₅₃₀ nm reprezintă un estimat al conținutului în antociani al țesutului folosit ca material biologic. Cele două metode au fost comparate cu datele obținute în urma determinării cantitative și calitative a flavonoizilor prin HPLC pentru a stabili care din ele permite stabilirea cât mai exactă a conținutului în antociani. În urma analizelor făcute am stabilit ca prima din cele două metode descrise mai sus să fie aplicată, ulterior, în studierea răspunsului la stres a genotipurilor de *Rubus*.

ELABORAREA ȘI OPTIMIZAREA PROCOALELOR PENTRU ANALIZA FOTOSINTEZEI

Elaborarea și optimizarea protocoalelor de analiză a fotosintezei la unele soiuri ale speciei *Rubus* este menționată în calendarul activităților din CF ca fiind componenta a activității 3 și anume "Elaborarea metodologiei de cercetare și caracterizarea materialului biologic luat în studiu". Această subactivitate (3.3.) a fost planificată să se desfășoare în lunile 4-9 de proiect urmând ca pe baza protocoalelor elaborate să se analizeze răspunsul la stres al aparatului fotosintetic la genotipurile de zmeur și mur incluse în lotul experimental.

Pentru a analiza răspunsul aparatului fotosintetic la stres am utilizat o tehnologie modernă și non-invazivă care permite monitorizarea în timp real a schimbărilor intervenite în funcționalitatea aparatului fotosintetic. Această tehnologie se bazează pe măsurarea fluorescenței emise de clorofila *a* în urma

excitării centrilor de reacție fotosintetici cu un puls de lumină roșie de 650 nm a cărui intensitate și durată este de $3000 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ și, respectiv, 1 secundă. Pentru a analiza schimbările survenite în structura moleculară a aparatului fotosintetic, am determinat cantitativ și calitativ pigmentii fotosintetici în urma extragerii acestora și aplicării unei tehnici de măsurare spectrofotometrică. Etapele parcurse pentru elaborarea protocoalelor de lucru pentru analiza fotosintezei la diferite soiuri de *Rubus* au fost următoarele:

1. Monitorizarea activității PSII in vivo prin determinarea fluorescenței clorofilei

Odată ajunsă pe plantă energia luminoasă poate fi convertită în sursă de energie prin declansarea reacțiilor fotochimice care stau la baza procesului de fotosinteză sau poate fi disipată ca urmare a incapacității centrilor de reacție de a utiliza toată cantitatea de energie absorbită de frunză. Disiparea energiei în exces poate fi sub formă de fluorescență sau sub formă de căldură. Măsurarea fluorescenței și calcularea anumitor parametrii din valorile obținute pentru fluorescență la anumite timp (la scara de microsecunde până la milisecunde) permite estimarea eficienței fotosintetice precum și a factorilor care afectează eficiența fotosintetică în condiții fiziologice sau de stres. Aparatele de măsurare a fluorescenței se numesc fluorimetre iar, dintre acestea am utilizat Handy PEA. Acest fluorimetru, pe de o parte, poate excita centrul de reacție a fotosistemului II (PSII) întrucât este prevăzut cu LED-uri care emit lumină roșie de 650 nm și, pe de altă parte, este prevăzut cu un senzor care detectează semnalul de fluorescență emis la intervale de timp de până la 10 microsecunde. Pe baza valorilor obținute s-a construit graficul O-J-I-P din analiza cărui ne putem da seama de schimbările survenite în funcționalitatea fotosistemului II (PSII). Atât intensitatea, cât și durata pulsului de lumină roșie emisă de HandyPea sunt factori care trebuie stabiliți în funcție de materialul biologic folosit. Ca material biologic, s-au folosit plante de zmeur și de mur care au fost menținute în condiții de seră pe sol cu pH 6. În plus, pentru a determina cu acuratețe activitatea fotosintetică este necesar ca plantele să fie expuse - anterior măsurării fluorescenței - la întuneric pentru o perioadă de timp care este determinată de genotip. Prin urmare, pentru stabilirea protocolului de măsurare a fluorescenței și construirea graficului O-J-I-P s-au parcurs următoarele etape:

- a. Determinarea intensității pulsului de lumină roșie. Pentru aceasta s-a măsurat fluorescența emisă în urma excitării PSII cu pulsuri egale ca durată dar cu intensități cuprinse între 1500 până la $3500 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. În urma acestor teste am stabilit că intensitatea optimă care saturează centrul fotosintetic și permite estimarea activității PSII este de $3000 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

- b. Determinarea duratei pulsului de lumina rosie. Pentru aceasta s-a masurat fluorescenta cu pulsuri avand intensitate optima dar cu durata de la 1 pana la 10 secunde. In urma acestor teste am stabilit ca durata optima a pulsului luminos este de 1 secunda.
- c. Determinarea perioadei de timp de adaptare la intuneric. S-au incubat frunzele la intuneric pentru diferite perioade de timp dupa care s-a masurat fluorescenta. In urma compararii datelor am stabilit ca perioada optima de adaptare la intuneric este de 30 minute.

2. Calculul parametrilor fotosintetici

Pe baza valorilor fluorescentei obtinute la anumiti timpi s-au calculat o serie de parametrii care permit estimarea activitatii fotosintetice in conditii de stres sau fiziologice. Acesti parametrii sunt:

- **F_o** – permite estimarea gradului de oxidare a moleculelor de plastoquinona care sunt acceptori de electroni
- **F_m** - permite estimarea gradului de reducere a moleculelor de plastoquinona care sunt acceptori de electroni.
- **F_v/F_m** – reprezinta eficienta fotosintetica maxima dupa adaptare la intuneric
- **T_{fm}** – reprezinta timpul necesar pentru a se atinge F_m
- **Area** – este direct proportionala cu marimea bazinului de acceptori de electroni din PSII
- **TR/RC** – reprezinta capacitatea centrilor de reactie de a captura energia luminoasa
- **RC/CS** – reprezinta densitatea centrilor de reactie activi din PSII
- **ET/RC** – reprezinta intensitatea fluxului de electroni in lantul fotosintetic

3. Masurarea functionalitatii dimensiunilor antenei

Estimarea marimii antenei fotosintetice s-a facut prin doua metode. Prima este o metoda de calcul matematic si se bazeaza pe valorile obtinute pentru fluorescenta clorofilei la timpi definiti. Parametrul obtinut (ABS/RC) permite aprecierea marimii antenei si, in consecinta, ofera informatii cu privire la modul in care planta reactioneaza la mediul inconjurator. O crestere a acestui parametru poate fi insotita de o intensificare a disiparii energiei sub forma de caldura si pentru a verifica aceasta s-a calculat si rata de disipare a energie pe centru de reactie, DI/RC . O a doua metoda de apreciere a marimii antenei fotosintetice este biochimica si se bazeaza pe calcularea raportului dintre cantitatea de clorofila a si respectiv b ($Chla/b$), in urma valorilor obtinute prin aplicarea metodei de separare si cuantificare a pigmentilor fotosintetici.

4. Separarea si cuantificarea pigmentilor fotosintetici

Pentru separarea si cuantificare pigmentilor asimilatori, materialul vegetal a fost omogenizat in azot lichid si ulterior extras cu acetona. Omogenatul obtinut s-a centrifugat si supernatantul care contine pigmentii fotosintetici a fost masurat la spectrofotometru la anumite lungimi de unda de lumina vizibila. Cantitatea de pigment s-a calculat conform ecuatiilor de mai jos:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 11.24 A_{6616} - 2.04 A_{6448}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g/ml}) = 20.13 A_{644.8} - 4.19 A_{6616}$$

$$\text{Carotenoizi } (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.90 ca - 63.14 cb)/214$$

Din datele obtinute s-au mai calculat continutul total de clorofila; raportul dintre clorofila *a* si *b* si raportul dintre moleculele de clorofila si cele de carotenoizi intrucat toti acesti parametrii ofera informatii cu privire la schimbarile biochimice din aparatul fotosintetic.