

VARIABILITATEA UNOR POPULAȚII DE LUPOAIE ORIGINARE DIN CHINA. *Genotiparea și determinarea polimorfismului genetic (II)*

<https://doi.org/10.52673/18570461.21.2-61.04>

CZU:581.169:582.952.6

Academician, profesor universitar **Maria DUCA**

E-mail: mduca2000@yahoo.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5855-5194>

Doctor în biologie **Ina BIVOL**

E-mail: bivolinga@yahoo.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6052-1540>

Doctor în biologie **Ana MUTU**

E-mail: ana.mutu@usm.md

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8603-142X>

Doctor în biologie **Steliana CLAPCO**

E-mail: stela.clapco@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7147-2740>

Masterand an. II **Chao WANG**

E-mail: wangchaochina@hotmail.com

Universitatea de Stat din Moldova

VARIABILITY OF SOME BROOMRAPE POPULATIONS FROM CHINA. *Genotyping and determination of genetic polymorphism (II)*

Summary. Genetic diversity within a population is reflected by variations in genetic material among individuals and can manifest at the phenotypic level through new characters or traits. The emergence of a large number of *O. cumana* races in a short period of time demonstrates that there are higher genetic variability in populations and a high ability to adapt in the face of environmental conditions. The aim of the research presented in this article was to study the intra- and interpopulation genetic diversity and genetic relationships between individuals of three populations of *O. cumana* from different geographical regions of the People's Republic of China based on molecular markers (ISSR and SSR). The high intrapopulation genetic variability calculated on the basis of the allelic diversity parameters and specific genetic diversity coefficients was revealed by SSR markers while as for the ISSR primers a high degree of genetic variations was found at the interpopulation level. UPGMA clustering and principal component analysis performed according to both sets of molecular markers allowed to divide all genotypes into 5 major groups for the degree of dissimilarity and level of aggression. This study is of interest in understanding the population genetic structure of the parasitic species of *O. cumana* from China and could contribute to the development of pathogen control durable strategies and effective sunflower breeding programs to broomrape resistance.

Keywords: genetic polymorphism, *Orobanche cumana*, population, ISSR and SSR genotyping.

Rezumat. Diversitatea genetică în cadrul unei populații este reflectată de variațiile materialului genetic la nivelul indivizilor și se poate manifesta la nivel fenotipic prin caractere sau însușiri noi. Apariția numeroaselor rase de *O. cumana* într-o perioadă scurtă de timp demonstrează un grad mare de variabilitate genetică în cadrul populațiilor și o capacitate înaltă de adaptare la condițiile de mediu. Scopul cercetărilor expuse în această lucrare a fost de a analiza diversitatea genetică intra- și interpopulațională și relațiile genetice dintre indivizii a trei populații de *O. cumana* provenite din diferite zone geografice ale Republicii Populare Chineze în baza markerilor moleculari (ISSR și SSR). Conform parametrilor diversității alelice și coeficienților de diversitate genetică specifici, calculați în baza markerilor SSR, a fost constatăată o variabilitate genetică intrapopulațională mare, în timp ce pentru primerii ISSR valorile acestor indici au prezentat un grad mare de variații genetice la nivel interpopulațional. Clusterizarea UPGMA și analiza componentelor principale efectuate după ambele seturi de markeri moleculari au permis clasificarea genotipurilor în 5 grupuri, care reflectă gradul de disimilaritate și corelează cu nivelul de agresivitate al acestora. Studiul prezintă interes în ce privește cunoașterea structurii genetice populaționale a speciei parazite de *O. cumana* din China și poate contribui la elaborarea strategiilor durabile de control al patogenului și a programelor de ameliorare a florei-soarelui cu rezistență la lupoaie.

Cuvinte-cheie: polimorfism genetic, *Orobanche cumana*, populație, genotipare ISSR și SSR.

INTRODUCERE

Variabilitatea genetică a indivizilor este reflectată prin polimorfismul molecular, care ilustrează variațiile la nivelul secvențelor ADN-ului genomic. Aceste variații induc deseori apariția unor polimorfisme, care se pot manifesta la nivel fenotipic prin caractere sau însușiri noi, ceea ce contribuie la sporirea eterogenității unei populații.

Diversitatea genetică este condiționată de un șir de mecanisme și procese precum mutațiile, recombinările genetice, migrațiile, driftul și fluxul de gene, selecția naturală și artificială. Toate aceste fenomene stau la baza adaptării la condițiile noi de mediu și a evoluției organismelor vegetale [1].

Evoluția rapidă a fitoparazitului de *O. cumana* (în ultimele șapte decenii s-au dezvoltat opt rase fiziologice A - H) demonstrează capacitatea înaltă de adaptare la efectele ameliorării, bazată pe selectarea monogenelor dominante *Or* [2; 3] și la modificarea factorilor ambientali în condițiile schimbărilor climatice [4]. Astfel, în cadrul populațiilor de lupoai apare un număr mare de variații genetice [5; 6]. Pentru a înțelege evoluția raselor de *O. cumana* și mecanismele dezvoltării unei agresivități în creștere, este necesară o cunoaștere fundamentală a diversității genetice inter- și intrapopulaționale.

În ultimele decenii se constată o creștere exponențială de utilizare a strategiilor experimentale bazate pe metoda PCR, care în comparație cu metodele clasice de studiu [7; 8] sunt mai rapide [9; 10], mai eficiente [11; 12], accesibile la preț [10], nu depind de condițiile de mediu și cuprind aproape toate regiunile genomului implicate în cercetare [10; 13].

Pe moment există o varietate bogată de markeri moleculari (RFLP, RAPD, SSR, AFLP, SCAR, ISSR etc.), dar niciunul dintre ei nu este universal. Prin urmare, alegerea unui tip adecvat de markeri se bazează pe proprietățile acestuia (polimorfism pronunțat, rezoluție înaltă, codominanță, frecvență și uniformitatea distribuției pe genom, reproductibilitate ridicată) în vederea obiectivelor de investigație propuse.

Unii dintre cei mai utilizați markeri moleculari în studiile de variabilitate intraspecifică sunt microsateliții, inclusiv markerii SSRs (*Simple-sequence repeats*) și ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeats*).

Sistemul de amorse SSR reprezintă secvențe scurte (1-10 pb), care se repetă în tandem preponderent la nivelul ADN-ului non-informațional [14]. Markerii SSR sunt ușor detectabili, multi-alelici cu capacitatea de a identifica alelele dominante și recesive ale aceleași gene (codominanți). Ca urmare a faptului că au o locație specifică pe cromozom (monocus) și o acope-

rare extinsă pe genom, ei posedă o reproductibilitate înaltă [14; 15].

Reproductibilitatea ridicată (92-95 %) este specifică și pentru sistemul de markeri moleculari bazat pe polimorfismul regiunilor microsatelitice (ISSRs), dezvoltat mai recent. Acești markeri sunt semi-arbitrari, bialelici cu o locație multilocus (la gene sau cromozomi diferiți) și se caracterizează în majoritatea cazurilor ca primeri dominanți [16; 17].

Ambele sisteme de markeri posedă un nivel înalt de polimorfism, fapt ce permite utilizarea lor pe larg în amprentarea și cartarea genomului, studiul relațiilor filogenetice și structura genetică a populațiilor de *O. cumana* [12; 13; 18-21]. Numărul semnificativ de lucrări, realizate la o gamă largă de specii (busuioc, bumbac, lucernă, năut, alge, pin, orz, crin, narcis etc.), demonstrează superioritatea acestor tipuri de primeri față de alte tehnici moleculare (RAPD, RFLP) în estimarea diversității genetice la nivel inter- și intraspecific [17; 22-29].

În contextul dat, scopul cercetărilor expuse în lucrarea de față a constituit elucidarea diversității moleculare și a relațiilor genetice dintre genotipurile diferitor populații de *O. cumana* originare din China în baza acestor două seturi de markeri moleculari (ISSR, SSR).

MATERIALE ȘI METODE

În calitate de material biologic pentru determinarea variabilității și structurii genetice au fost utilizate trei populații de lupoai care reprezintă două regiuni geografice ale Republicii Populare Chineze (Inner Mongolia și Hebei) și două rase fiziologice – rasa G (Ch1 și Ch3) și rasa H (Ch2), analizate și descrise anterior [30]. În analizele moleculare au fost incluși lăstari aerieni, colectați în experimentul realizat în condiții model în seră menit să identifice rasele fiziologice [30] care au fost depozitați și păstrați la -80 °C.

Izolarea și cuantificarea ADN-ului. ADN-ul genomic s-a extras din probe individuale, prelevate din fiecare populație, utilizând kitul GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791 în conformitate cu instrucțiunile oferite de producător (Thermo Scientific). Cantitatea ADN-ului total s-a determinat spectrofotometric (modelul T60 UV-VIS) și prin analiza electroforetică în gel de agaroză de 1 %, ultima metodă servind și pentru evaluarea calității ADN-ului izolat [31].

Condiții de realizare a ISSR-PCR. În vederea evaluării polimorfismului genetic au fost utilizați 14 primeri ISSR cu lungimea de 14-18 nucleotide, având regiuni repetitive di- (BC 807, BC 810, BC 835, BC 841, BC 857, (CA)₆RG, (CT)₈TC, (CA)₆AC, (AG)₈YA – 64,29 %), tri- ((CAA)₅, (CTC)₄RC, (CAG)₅ – 21,43 %)

și tetranucleotide ((GACA)₄, (GATA)₄ – 14,28 %) ancorate cu zero sau unu-două nucleotide (NN) la capătul 3'. Mediul de reacție PCR (15μl) a inclus: 60 ng ADN; 200 μM amestec dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,4 μM primer; 1 U/μL DreamTaq Green ADN polimerază în soluție tampon (1x); apă ultrapură; 2,5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific). Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a fost efectuată utilizând termociclul automat Genset 9700 (Applied Biosystem) în conformitate cu următorul program: denaturare inițială la 95 °C – 5 min; 35 cicluri cu denaturare la 95 °C – 30 sec, hibridare la 45 °C – 45 sec și elongare la 72 °C – 2 min; elongare suplimentară la 72 °C – 5 min [31].

Condiții de realizare a SSR-PCR. Genotiparea s-a efectuat cu 15 markeri microsateliți, care identifică regiunile genomice cu repetări di- (Ocum-52, Ocum-59, Ocum-70, Ocum-74, Ocum-75, Ocum-81, Ocum-160, Ocum-196, Ocum-197, Ocum-206 – 67 %), tri- (Ocum-87, Ocum-141, Ocum-174 – 20 %), tetra- și hexanucleotidice (Ocum-108, Ocum-122 – 13 %) [32]. Mediul de reacție PCR (15μl) a inclus: 60 ng de ADN; 200 μM de fiecare tip de dNTP; 0,4 μM de primer SSR; 1 U/μL DreamTaq Green ADN Polimerază în soluție tampon (1x); 2,5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific). Programul de amplificare (Veriti-96Well Thermal Cycler, Applied Biosystem): 95 °C – 3 min; 35 de cicluri cu 95 °C – 30 sec, 57 °C – 45 sec, 72 °C – 1 min; 72 °C – 5 min.

Separarea fragmentelor de ADN amplificate s-a realizat în gel de agaroză cu concentrația de 2 % utilizând tamponul TAE (1x) sub o tensiune a câmpului electric de 2,5 V/cm (ISSR) și în gel de poli-acrilamidă de 8 % folosind un sistem tampon TBE (1x) la intensitatea de 230 V (SSR) în cameră de electroforeză verticală (Consort) [31].

În calitate de markeri moleculari pentru estimarea mărimii fragmentelor amplificate s-au utilizat GeneRuler Express DNA Ladder ready-to-use SM1553 (ISSR) și GeneRuler Low Range DNA Ladder SM1191 (SSR), compania Thermo Scientific.

Vizualizarea ampliconilor a fost efectuată în raze ultraviolete la transiluminatorul UV după colorarea cu bromură de etidiu (concentrația finală de 0,5μg/ml). Pentru obținerea imaginilor gelul a fost fotografiat cu ajutorul sistemului de fotodocumentare DOC-PRINT-VX2, model SXT-F20.M (versiunea 15.02).

Prelucrarea statistică. Imaginile rezultate în urma reacțiilor PCR (ISSR, SSR) au fost analizate prin intermediul programului specializat Photo-Capt (versiunea 15.02) care a permis stabilirea mărimii fiecărui fragment amplificat. Datele generate de program au fost preluate de componenta Excel a pachetului Microsoft Office 2010, fiind transformate într-o matrice

binară și prelucrate ulterior cu programul XLSTAT 2014 version 2014.5.03 în vederea determinării distanței genetice. La final, pe baza coeficientului Jaccard și a metodei de clusterizare UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) s-au construit dendrograme filogenetice cu scopul asocierii genetice a indivizilor cercetați. Variabilitatea genetică și relațiile genotipurilor au fost determinate prin trimiterea matricei binare la o analiză a componentelor principale (ACP) [33] cu ajutorul programului XLSTAT versiunea 2014.5.03. Nivelul de polimorfism genetic al fragmentelor amplificate a fost calculat după Sivolap [34]: $P(\%) = \frac{P}{f} \times 100\%$ unde p – numărul f de ampliconi polimorfi și f – numărul total de ampliconi.

Numărul alelelor observate (na), numărul efectiv de alele (ne), numărul locilor polimorfi (NLP), ponderea procentuală a locilor polimorfi (PLP), indicele de diversitate genetică Nei (h), indicele de diversitate Shannon (I) s-au determinat utilizând programul de analiză statistică POPGENE versiunea 1.32.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Genotiparea ISSR. În urma analizei ISSR-PCR s-a constatat că 13 dintre cele 14 amorse (primeri, markeri) testate au generat produși de amplificare și posedă o reproductibilitate și specificitate înaltă și respectiv sunt suficient de rezultativi și informativi. Astfel, profilurile electroforetice obținute reflectă atât o diferențiere semnificativă, cât și similitudine care depinde de populația analizată și tipul de primer utilizat (figura 1).

Populațiile de lupoaie s-au caracterizat printr-un grad înalt de polimorfism genetic inter- 87,40 % și intrapopulațional 44,88 %, variind în limitele de 15,75-74,80 % între indivizii fiecărei populații (tabelul 1).

Analiza diversității genetice pentru cele trei populații de lupoaie a pus în evidență că cel mai mic număr de alele (na) s-a observat la nivelul populației Ch3 (1,16), nivelul mediu – pentru Ch1 (1,44), și cel mai mare – pentru Ch2 (1,75). Interesant este faptul că populația Ch2 se caracterizează prin cel mai mare număr de loci polimorfi (95), celelalte două populații remarcându-se printr-un număr mai mic (Ch1 – 56 și Ch3 – 20) al acestor tipuri de loci (tabelul 1).

Numărul efectiv de alele (ne), care cuantifică variația genetică luând în considerare frecvența relativă a alelelor, a relevat o valoare medie de 1,56 pentru întreg eșantionul analizat (3 populații). Acest indice este mai mare decât valoarea obținută pentru numărul efectiv de alele în fiecare populație: Ch3 (1,16), Ch1 (1,33), Ch2 (1,52).

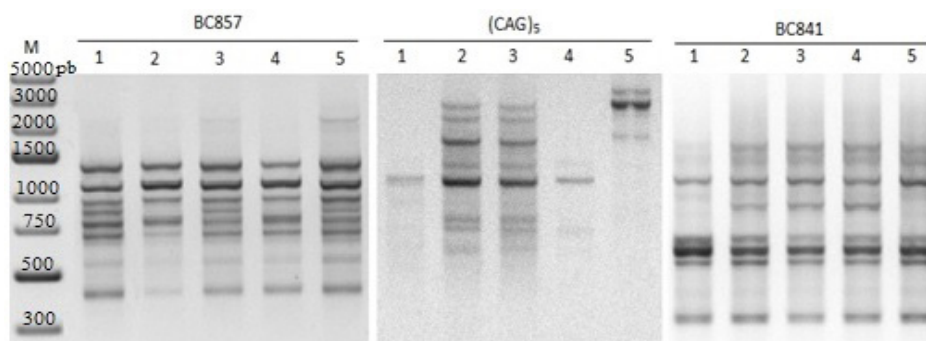


Figura 1. Exemple de geluri electroforetice a fragmentelor de ADN amplificate la populația Ch2 de *O. cumana* cu diferiți primeri ISSR.

Notă: M – marker GeneRuler Express DNA Ladder ready-to-use SM1553 (Thermo Scientific), 1-5 – indivizi de lupoaiie din diferite populații.

Astfel, în conformitate cu indicii de diversitate genetică *na*, *ne* și numărul locilor polimorfi se constată că populația Ch2, care reprezintă rasa H, se caracterizează prin valori mai mari comparativ cu populațiile Ch1 și Ch3 care reprezintă rasa G (tabelul 1).

Populația Ch2 se caracterizează și printr-un indice de diversitate genetică Nei (*h*) mai înalt (0,29), care elucidează o diversitate mai mare comparativ cu populația Ch1 (0,18) și populația Ch3 (0,08). Diferențe similare pentru aceste 3 populații au fost obținute și în privința indicelui de diversitate Shannon (Ch2-0,43, Ch1-0,27, Ch3-0,11), care este unul dintre cei mai utilizați indici în caracterizarea diversității unui sistem dintr-o comunitate și ia în considerare atât abundența, cât și echitatea distribuției acestuia. În cazul tuturor celor trei populații de lupoaiie valorile indicilor *h* și *I* s-au arătat a fi cu mult mai mari (0,34 și 0,51, respectiv) decât valorile acestora obținute pentru fiecare populație aparte (tabelul 1), date care confirmă nivelul înalt de diversitate între populațiile analizate.

Analiza integrală a indicilor de variabilitate *na*, *ne*, *h*, *I*, *NLP* și *PLP*, obținuți în baza datelor PCR-ISSR pune în evidență existența polimorfismului ridicat pentru întreg eșantionul analizat (3 populații) și o variabilitate mai scăzută în cadrul fiecărei populații (tabelul 1). Comparând datele experimentale pentru fiecare

populație aparte (tabelul 1) s-a observat o variabilitate ridicată la indivizii populațiilor Ch2 care reprezintă rasa H, în raport cu Ch1 și Ch3 care reprezintă rasa G. Totuși, valorile constatate pentru populația Ch1, superioare celor identificate la Ch3, sunt mai aproape de cele stabilite la Ch2, ambele populații fiind originare din provincia Inner Mongolia (orașele Bayanuur și Hohhot, respectiv). În această provincie se constată cele mai mari suprafețe (0,4 mil. ha sau 40,2 %), cultivate cu hibrizi locali și de import de floarea-soarelui [35], în timp ce în regiunea HeBei, de unde s-a colectat populația Ch3, ce se caracterizează printr-un grad de polimorfism genetic mai scăzut, se cultivă numai hibrizi locali [18]. Această diversitate a germoplasmei plantelor-gazdă, posibil să determine și polimorfismul genetic al parazitului. Rezultate similare pentru populația din Inner Mongolia (*I*=0,5067, *h*=0,3340) și pentru populația din HeBei (*I*=0,0504, *h*=0,0345) au fost reflectate și în studiile efectuate de către Shi et al. [18].

Genotiparea SSR. Amprelele moleculare ale plantelor de *O. cumana* cu 15 markeri specifici SSR, vizualizate în gel de poli-acrilamidă (SSR-Page), au pus în evidență pentru fiecare populație unul sau mai multe profile moleculare, diferite după numărul și frecvența alelelor pentru același marker SSR (figura 2).

Tabelul 1

Indicii diversității genetice pentru cele 3 populații de lupoaiie, calculați în baza markerilor ISSR

Populația	na±SD	ne±SD	h±SD	I±SD	NLP	PLP, %
Ch1, Ch2, Ch3	2,00±0,00	1,56±0,30	0,34±0,13	0,51±0,16	111	87,40
Ch1	1,44±0,50	1,33±0,40	0,18±0,21	0,27±0,31	56	44,09
Ch2	1,75±0,44	1,52±0,38	0,29±0,20	0,43±0,27	95	74,80
Ch3	1,16±0,37	1,16±0,37	0,08±0,18	0,11±0,25	20	15,75
Media	1,45±0,43	1,34±0,38	0,19±0,20	0,27±0,28	57	44,88

Notă: *na* – numărul de alele observate; *SD* – devierea standardă; *ne* – nr. efectiv de alele; *h* – indicele de diversitate genetică Nei; *I* – indicele de diversitate Shannon; *NLP* – nr. locilor polimorfi; *PLP* – ponderea procentuală a locilor polimorfi.

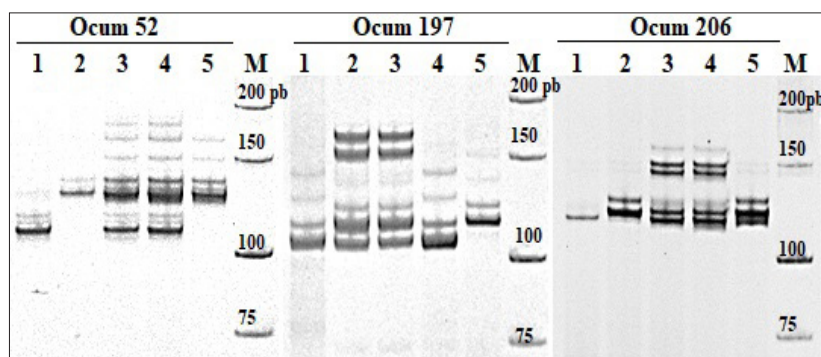


Figura 2. Profile electroforetice ale genotipării cu primeri SSR la *O. cumana*.
Notă: M – marker molecular, 1-5 – indivizi de *O. cumana* (populația Ch1).

În urma analizei amprentelor moleculare, populațiile de lupoaiă provenite din China au demonstrat un grad mare de polimorfism alelic al secvențelor SSR, prezentând în total de la 1 până la 11 profile diferite pentru un primer și câte 1-6 profile per populație la un singur primer, dintre care unele sunt similare.

Analiza moleculară cu 15 markeri a diferențiat populațiile din China după numărul (n) și distribuția frecvenței alelelor. Numărul total de variante alelice (198), generat de sistemul monocus SSR pentru fiecare populație separat (Ch1 – 65, Ch2 – 64 și Ch3 – 69) a evidențiat o diversitate interpopulațională scăzută cu variații între 1 și 5 alele (tabelul 2).

Analiza diversității genetice intra- și interpopulaționale a holoparazitului *O. cumana*, în conformitate cu indicii de diversitatea alelică (n , na , ne , ns) și coeficienții de diversitate genetică specifici (h , I), care pun în evidență nivelul de organizare a unei populații și cuantifică distribuția indivizilor sau alelelor într-o populație, a demonstrat o variabilitate genetică intrapopulațională mare în cadrul populațiilor de *O. cumana*.

Astfel, analiza numărului total de alele (n), a numărului mediu de alele (na) și a numărului efectiv de alele (ne) identificat cu markerii SSR pentru fiecare populație, a relevat cele mai multe variante alelice și valori pentru

populațiile Ch1 (65, 4,33 și 4,11, respectiv) și Ch3 (69, 4,60 și 4,35, respectiv), care sunt atribuite la rasa G, comparativ cu populația Ch2 (rasa H) la care se remarcă cele mai mici valori pentru acești trei parametri (64, 4,27 și 3,99, respectiv). Totuși, diferențele constatate între populații sunt statistic ($p > 0,05$) nesemnificative, relevând astfel un nivel scăzut de diversitate molecular-genetică între populații (tabelul 2). Pentru fiecare populație 8 dintre cei 15 primeri au pus în evidență alele specifice (ns) cu o frecvență cuprinsă între 0,02-0,40, inclusiv: Ch1 – 1 (OC52); Ch2 – 5 (OC108, OC160, OC196 și OC197); Ch3 – 6 (OC70, OC75 și OC81). Astfel, particularități specifice pentru populația Ch2, care reprezintă rasa H, au fost evidențiate în cazul a patru primeri comparativ cu Ch1 și Ch3, care reprezintă rasa G, unde specificitatea a fost identificată la nivelul unui și respectiv a trei perechi de primeri.

Conform coeficienților de diversitate genetică specifici Nei (h) și Shannon (I) a fost relevată intensitatea polimorfismelor la nivel intrapopulațional. Valorile indicelui h variază nesemnificativ de la 0,69 (Ch1, Ch2) până la 0,70 (Ch3), iar a indicelui I depășesc valoarea 1 la toate trei populații (Ch1 – 1,33, Ch2 – 1,32, Ch3 – 1,39), indicând o variabilitate înaltă a secvențelor microsatelite în interiorul populațiilor de lupoaiă investigate (tabelul 2).

Tabelul 2

Estimarea diversității genetice în baza markerilor SSR la 3 populații de lupoaiă

Populația	n	na±SD	ne±SD	ns	h±SD	I±SD
Ch1, Ch2, Ch3	198	5,20±2,70	3,85±1,95	12	0,67±0,21	1,31±0,20
Ch1	65	4,33±1,99	4,11±1,68	1	0,69±0,21	1,33±0,51
Ch2	64	4,27±1,79	3,99±1,54	5	0,69±0,21	1,32±0,49
Ch3	69	4,60±2,26	4,35±1,99	6	0,70±0,22	1,39±0,56
Media±SD	66,00±2,65	4,40±0,18	4,15±0,23	4,00±2,65	0,69±0,01	1,35±0,04

Notă: n – numărul de alele observate; na – nr. mediu de alele; ne – nr. efectiv de alele; ns – nr. de alele specifice; h – indicele Nei de diversitate genetică; I – indicele Shannon de diversitate; SD – devierea standard; testul t Student aplicat între populații ($p < 0,05$; $t95\%$).

În consecință, în baza datelor moleculare SSR și a indicilor calculați pentru fiecare populație individual s-a constatat că în conformitate cu majoritatea indicilor, cu excepția numărului specific de alele (*ns*), valori ridicate s-au remarcat la populațiile cu aceeași apartenență rasială, rasa G (Ch1 și Ch3), iar cu cele mai scăzute valori – la populația caracterizată ca rasa H (Ch2).

Populația Ch3, originară din regiunea Hebei, s-a evidențiat cu valori mai mari ale indicilor de diversitate comparativ cu Ch1 și Ch2 (Inner Mongolia), indicând un nivel sporit de variabilitate genetică în cadrul și între genotipurile acestei populații.

Este important de menționat că genotiparea cu primeri specifici SSR a evidențiat un nivel mai înalt al variabilității intrapopulaționale ($ne=4,15$, $h=0,69$ și $I=1,35$) comparativ cu cel interpopulațional ($ne=3,85$, $h=0,67$ și $I=1,31$), rezultate care sunt în concordanță și cu alte cercetări [13; 36]. Acest nivel înalt de polimorfism în cadrul populațiilor se poate explica prin natura codominantă și multialelică a secvențelor microsatelite. Întrucât polimorfismul SSR se reflectă prin variația numărului de repetiții în tandem al secvențelor, identificarea unui număr mai mare de alele la un locus SSR [32] și evidențierea formelor homo- și heterozigote, există un număr mare de lucrări științifice care demonstrează importanța markerilor SSR în studii de diversitate genetică la *O. cumana* [20; 21].

Aspecte comparative în structura genetică a populațiilor de lupoaie în baza ambilor tipuri de markeri moleculari. Analiza comparativă a celor două sisteme de markeri utilizați demonstrează că genotiparea cu primeri specifici SSR a evidențiat un nivel mai înalt al polimorfismului genetic și al variabilității intrapopulaționale ($ne = 4,15$, $h = 0,69$ și $I = 1,35$), comparativ cu cel interpopulațional ($h=0,67$ și $I=1,31$), în timp ce amorsele ISSR – invers ($ne=1,34$, $h=0,19$ și $I=0,27$). Datele obținute sunt în corespundere cu rezultatele relevate într-un studiu similar efectuat cu utilizarea a 38 de populații de *O. cumana* din diverse zone ale Republicii Moldova [36] și pot fi explicate prin natura genetică și mecanismul specific al sistemelor de markeri. Markerii SSR sunt multi-alelici și specifici pentru anumite secvențe pe cromozom (monolocus), în timp ce primerii semi-arbitrari ISSR, prin identificarea regiunilor dintre aceste secvențe, au o acoperire mai mare a genomului (multilocus), fapt ce justifică valorile comparativ mai înalte ale indicilor de diversitate genetică interpopulațională la nivelul fragmentelor ISSR.

Ulterior, pentru a releva gradul de asociere a structurii genetice cu rasele sau originea geografică, s-a determinat coeficientul de disimilaritate Jaccard (*CDJ*) calculat la trei populații de lupoaie în baza datelor amplificării cu primeri ISSR, SSR și ISSR/SSR. Rezultatele au pus în evidență diferite valori, care depind de populația inclusă în studiu și de tipul markerilor (tabelul 3).

Tabelul 3

Coeficientul de disimilaritate după Jaccard la trei populații de *O. cumana* în baza markerilor SSR, ISSR și SSR/ISSR

	Ch1, rasa G			Ch2, rasa H			Ch3, rasa G		
	ISSR	SSR	ISSR/SSR	ISSR	SSR	ISSR/SSR	ISSR	SSR	ISSR/SSR
Ch1, rasa G	****	****	****	0,737	0,282	0,522	0,429	0,354	0,394
Ch2, rasa H	0,737	0,282	0,522	****	****	****	0,742	0,371	0,560
Ch3, rasa G	0,429	0,354	0,394	0,742	0,371	0,560	****	****	****

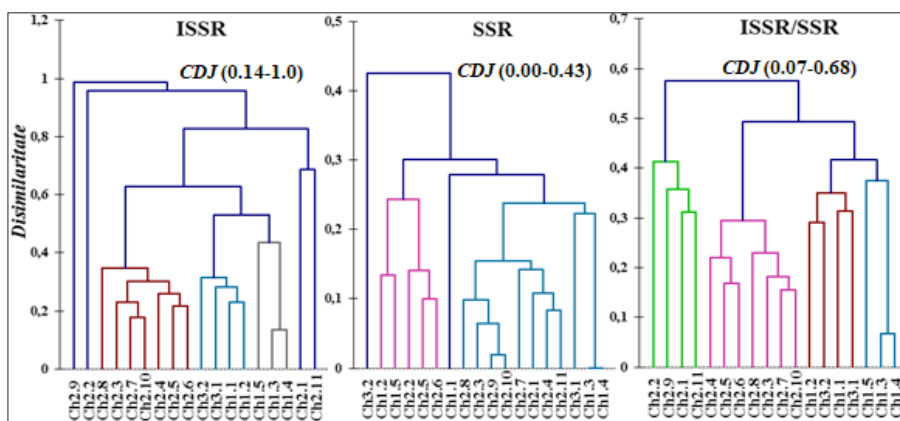


Figura 3. Dendrograma alcătuită pe baza distribuției genetice dintre genotipurile de *O. cumana* în baza markerilor moleculari generată prin analiza UPGMA.

Notă: Ch1, Ch2 – populații din regiunea Inner Mongolia și Ch3 – populație din provincia HeBei.

Deși sistemul de markeri SSR a prezentat valori mai mici comparativ cu ISSR și cu datele SSR/ISSR analizate împreună, totuși în toate cazurile analizate s-a relevat că cea mai mare distanță genetică se constată între populația Ch2, care reprezintă rasa H și este colectată din Inner Mongolia și Ch3, care reprezintă rasa G originară din HeBei. Diferențe semnificative au fost constatate și între populațiile Ch2 (rasa H) și Ch1 (rasa G), iar cea mai mică a fost observată între Ch1 și Ch3, ambele aparținând rasei G (0,429 și 0,394, respectiv) (tabelul 3).

În cazul datelor obținute cu markerii SSR s-au arătat a fi genetic cel mai apropiate populațiile din Inner Mongolia Ch2 și Ch1 (0,282) (tabelul 3; figura 3).

Rezultatele obținute relevă un grad înalt de asocieră a nivelului de disimilaritate genetică cu apartenența rasială, care confirmă date deja publicate [12], precum și un anumit grad de înrudire a populațiilor în funcție de locația geografică, constatată în studiul diferențierii interpopulaționale a lupoaiei provenite din Rusia, Kazahstan și România [13].

Legitatea stabilită se reflectă și în cele două dendrograme realizate în baza ampliconilor ISSR și ISSR/SSR cu ajutorul algoritmului UPGMA, care au reliefat în mod clar aceleași grupuri de lincaj în funcție de gradul de disimilaritate și statut rasial (Ch1 și Ch3 rasa G – un cluster; Ch2 rasa H – câteva clusterse separate) (figura 3).

Rezultate similare despre existența unei corelații pozitive între distanțele genetice și statutul rasial în baza profilelor moleculare ISSR/SSR au fost confirmate totodată și prin aplicarea analizei componentelor principale (ACP) (figura 4).

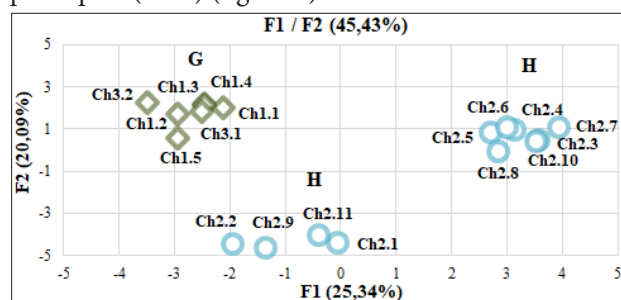


Figura 4. Repartizarea grafică a genotipurilor de *O. cumana* în baza markerilor moleculari (ISSR/SSR) prin analiza componentelor principale (ACP).

Populația Ch2 din orașul Bayanuur, Inner Mongolia, identificată ca rasa H de *O. cumana* [30], formează două grupe cu caracteristici de asemănare între genotipuri. Populațiile Ch1 și Ch3, rasa G, conform metodei ACP au format al treilea grup prezentând similitudine după profilele moleculare analizate ISSR și SSR. Astfel, modelul ACP, care caracterizează 45 % din variabilitatea totală a datelor moleculare, prezintă o repartizare bidimensională a genotipurilor de *O. cumana* similară cu analiza clusteriană.

CONCLUZII

Diversitatea genetică este gradul de variabilitate al materialului genetic în interiorul unei grupe taxonomice și joacă un rol central în abilitatea populațiilor/speciilor de a se adapta și persista, ca răspuns la un mediu care este în continuă schimbare. Estimarea statutului și a tendințelor diversității genetice, precum și a factorilor care influențează această diversitate, pentru speciile parazite prin utilizarea tehnicilor moleculare reprezintă o prioritate în asigurarea managementului durabil al ecosistemelor agricole.

În baza rezultatelor obținute privind studiul polimorfismului genetic al unor populații de *O. cumana* Wallr. originare din China s-a constatat un nivel înalt de diversitate și diferențiere genetică intra- și interpopulațională, demonstrând astfel un genofond favorabil pentru apariția de noi rase fiziologice.

Analiza variabilității moleculare, efectuate cu markerii ISSR în baza unor indici de diversitate genetică (na , ne , h , I , NLP , PLP), a demonstrat un polimorfism sporit între populațiile cercetate (2,00, 1,56, 0,34, 0,51, 111, 87, 40, respectiv) și un nivel mai mic în cadrul fiecărei populații (1,45, 1,34, 0,19, 0,27, 57, 44, 88, respectiv), iar genotiparea cu primeri specifici SSR a evidențiat un nivel înalt al variabilității intrapopulaționale ($h=0,69$ și $I=1,35$), comparativ cu variabilitatea interpopulațională ($h=0,67$ și $I=1,31$).

Populația Ch2 din Inner Mongolia, care reprezintă rasa H, se caracterizează printr-un număr sporit și o pondere procentuală mai mare a locilor polimorfi după markerii ISSR, precum și o diversitate mai mare a profilurilor moleculare SSR, comparativ cu celelalte 2 populații (Ch1 și Ch3), care reprezintă rasa G.

Coeficientul de disimilaritate după markerii ISSR și în combinație ISSR/SSR indică faptul că dendrogramele generate au reliefat în mod clar aceleași grupuri de lincaj în funcție de gradul de disimilaritate și de statut rasial (Ch1 și Ch3 rasa G – un cluster; Ch2 rasa H – câteva clusterse separate), această legitate nefiind constatată la analiza efectuată în baza ampliconilor SSR.

Modelul ACP, construit în baza profilelor moleculare ISSR/SSR, a format aceleași grupe distincte în funcție de gradul de disimilaritate și statut rasial, care confirmă rezultatele obținute prin analiza clusteriană.

NOTĂ. Rezultatele expuse în articol au fost obținute în cadrul proiectului din Programul de Stat 20.80009.5107.01 – „Studii genetico-moleculare și biotehnologice ale florii-soarelui în contextul asigurării managementului durabil al ecosistemelor agricole”.

Aducem sincere mulțumiri d-nei doctor, profesor universitar Jun ZHAO, Inner Mongolia Agriculture University (China), pentru materialul biologic semincer oferit cu amabilitate în scopul realizării acestui studiu.

BIBLIOGRAFIE

1. Richman A. Evolution of balanced genetic polymorphism. In: *Mol. Ecol.*, 2000, vol. 9(12), pp. 1953-1963.
2. Velasco L., Pérez-Vich B., Fernández-Martínez J. M. Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision. *OCL*, 2016, vol. 23(2), D203, <https://doi.org/10.1051/ocl/2016002>.
3. Cvejić S., Radanović A., Dedić B., Jocković M., Jocić S., Miladinović D. Genetic and genomic tools in sunflower breeding for broomrape resistance. In: *Genes*, 2020, vol.11 (2), 152, <https://doi.org/10.3390/genes11020152>
4. Duca M., Clapco S., Nedelcov M., Dencicov L. Influence of environmental conditions on the virulence and distribution of *Orobanche cumana* Wallr. in the Republic of Moldova. In: *OCL*, 2019, vol. 26 (3), <https://doi.org/10.1051/ocl/2018049>
5. Molinero-Ruiz L., Delavault P., Pérez-Vich B., Pacureanu-Joita M., Bulos M., Altieri E., Domínguez J. History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. In: *Span. J. Agric. Res.*, 2015, vol. 13(4) pp. 1-19.
6. Duca M., Acciu A., Clapco S. Distribuția geografică și caracteristica unor populații de *O. cumana* din Republica Moldova. În: *Bul. AȘM. Șt. vieții*, 2017a, nr. 2(332), pp. 57-65.
7. Duca M., Port A., Cernolev E., Mutu A., Chilari R. Afinitatea și unele particularități fiziologice ale diferitor rase de lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.). În: *Știința Agricolă*, 2016, nr. 2, pp. 41-46.
8. Lu W., Li L., Li S. K. Virulence determination and field efficacy evaluation of water-soluble trifluralin nanoparticles against *Orobanche cumana*. In: *Plant Prot.*, 2019, vol. 45 (3), pp. 237-240.
9. Lynch M., Milligan B.G. Analysis of population structure with RAPD markers. In: *Mol. Ecol.*, 1994, vol. 3 (2), pp. 91-99.
10. Duca M., Pacureanu-Joita M., Port A., Martea R., Boicu A., Risnoveanu L., Clapco S. Genetic diversity analysis of sunflower broomrape populations from RM using ISSR markers. In: *Rom. Agric. Res.*, 2020a, nr. 37, pp. 89-97.
11. Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., van de Wiel C, Bredemeijer G. et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. In: *Mol. Breed.*, 1997, vol. 3 (5), pp. 381-390.
12. Duca M., Martea R. Using different dataset and different algorithms for genetic diversity analysis in broomrape. In: *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 2020b, vol. 7 (8), pp. 99-110.
13. Guchetl S., Antonova T. S., Tchelustnikova T. Interpopulation genetic differentiation *Orobanche cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania using molecular genetic markers. In: *Helia*, 2014, vol. 37 (61), pp. 181-191.
14. Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma P.C., Ramesh B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. In: *Curr. Sci.*, 1996, vol. 70 (1), pp. 45-54.
15. Sukhareva A.S., Kuluyev B.R. DNK-markery dlya geneticheskogo analiza sortov kul'turnykh rasteniy. V: *Biomika*, 2018, tom 10, nr. 1, pp. 69-84.
16. Alansi S., Tarroum M., Al-Qurainy F., Khan S., Nadeem M. Use of ISSR markers to assess the genetic diversity in wild medicinal *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. collected from different regions of Saudi Arabia. In: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2016, vol. 30 (5), pp. 942-947.
17. Sadhu S.K., Jogam P., Thampu R. K., Abbagani S., Penna S., Peddaboina V. High efficiency plant regeneration and genetic fidelity of regenerants by SCoT and ISSR markers in chickpea (*C. arietinum* L.). In: *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2020, vol. 141, pp. 465-477.
18. Shi B. X., Zhang, J., Gu Y., Lai C., Lei Z., Sha H., Gao Y., Mayila Y., Zhao J. Application of ISSR markers to reveal the genetic diversity of sunflower broomrape in China. In: *Chin. J. Oil Crop Sci.*, 2019, vol. 41 (4), pp. 629-637.
19. Abdalla M. M. F., Saleh H.A.M.A., Khater M.A. Detection of genetic variations in *Orobanche crenata* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. In: *Bull. Natl. Res. Cent.*, 2020, vol. 44 (139), <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00390-0>
20. Ziadi S., Şahin E. Ç., Aydın Y., Evci G., Uncuoğlu A. A. Molecular assessment in estimation of race composition and genetic polymorphism in *Orobanche cumana* causal agent of sunflower broomrape. In: *Interciencia Journal*, 2018, vol. 43(3), pp. 301-323.
21. Duca M., Port A., Mutu A., Clapco S. Variabilitatea genetică a unor populații de *O. cumana* Wallr. din Republica Moldova. În: *Bul. AȘM. Șt. vieții*, 2020c, nr. 1(340), pp. 81-97.
22. Noormohammadi Z., Hasheminejad-Ahangarani F. Y., Sheidai M., Ghasemzadeh-Baraki S, Alishah O. Genetic diversity analysis in Opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. In: *Genet. Mol. Res.*, 2013, vol. 12(1), pp. 256-269.
23. Touil L., Bao A.K., Wang S.M., Ferchichi A. Genetic diversity of Tunisian and Chinese Alfalfa (*Medicago sativa* L.) revealed by RAPD and ISSR markers. *Am. J. Plant Sci.*, 2016, vol. 7 (6), pp. 967-979.
24. Abbasi S., Afsharzadeh S., Saeidi H. Genetic diversity of *Potamogeton pectinatus* L. in Iran as revealed by ISSR markers. In: *Acta Bot. Croat.*, 2017, vol. 76(2), pp. 177-182.
25. Zukauskienė J., Paulauskas A., Varkuleviciene J., Marseliene R., Gliaudelyte V. Genetic diversity of five different lily (*Lilium* L.) species in Lithuania revealed by ISSR markers. In: *Am. J. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, pp. 2741-2747.
26. Pyne R. M., Honig J. A., Vaiciunas J., Wyenandt C. A., Simon J. E. Population structure, genetic diversity and downy mildew resistance among *Ocimum* species germplasm. In: *BMC Plant Biol.*, 2018, vol. 18(69). 15 p.
27. Rai K.C., Ginwal H. S. Microsatellite analysis to study genetic diversity in Khasi pine (*Pinus kesiya* Royle ex.

Gordon) using chloroplast SSR markers. In: *Silvae Genet.*, 2018, vol. 67(1), pp. 99-105.

28. Ben Naceur A., Chaabane R., El-Faleh M., Abdelly C., Ramla D., Nada A., Sakr M., Ben Naceur M. Genetic diversity analysis of North Africa's barley using SSR markers. In: *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2012, vol. 10(1), pp. 13-21.

29. Rehman S.I., Sheikh M.Q., Bhat Z.A., Khan M.H. Genetic diversity analysis based on SSR markers in daffodils (*Narcissus*). In: *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2019, vol.8 (5), pp. 2418-2427.

30. Duca M., Mutu A., Bivol I., Wang C. Variabilitatea unor populații de lupoai (*Orobanche cumana* Wallr.) originare din China. I. Morfometria și identificarea raselor. În: *Akademos*, 2021, vol. 60, nr. 1, pp. 42-50.

31. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001, vol. I-III, 1885 p.

32. Vieira M. L. C., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. Microsatellite markers: what they mean and why

they are so useful. In: *Genet. Mol. Biol.*, 2016, vol. 39(3), pp. 312-328.

33. Jolliffe I. T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. In: *Phil. Trans. R. Soc.*, 2016, vol. 374(2065), pp. 1-16.

34. Sivolap Yu. N., Solodenko A.Ye., Burlov V.V. RAPD-analiz molekulyarno-geneticheskogo polimorfizma podsolnechnika. În: *Genetika*, 1998, tom 34, nr. 2, pp. 266-271.

35. Bai Q. J., Yun X. P., Gao, Z.M., Xu, L.M., Li, Y.M., Zhang, H.L., Du, L. and Li, X.S. The occurrence and control techniques of sunflower broomrapes in Inner Mongolia. In: *Inn. Mong. Agric. Sci. Technol.*, 2013, vol. 1, pp. 75-76.

36. Duca M., Port A., Clapco S., Boicu A. Asocieri corelative dintre marcherii morfologici și moleculari în studiul variabilității genetice a lupoaii din Republica Moldova. În: *Bul. AȘM. Șt. Vieții*, 2020d, nr. 1(340), pp. 7-23.



Ecaterina Ajder. *Rodul pământului*, tehnică de autor, 2020, 1000 × 1000 mm.