

GENETICA, BIOLOGIA MOLECULARĂ ȘI AMELIORAREA

GENOTIPARE MULTILOCUS PENTRU MARKERII CANDIDAȚI AI SINTEZEI COMPUȘILOR TERPENICI LA *ORIGANUM VULGARE* SSP. VULGARE

Port Angela¹, Mutu Ana¹, Ciocârlan Nina²

1 – Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”

2 – Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”

Rezumat

A fost evaluată, în premieră, diversitatea genetică intra- și interpopulațională a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din colecția Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru” (GBNI) și flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi, s.

Butuceni) prin genotiparea cu 11 markeri funcționali (EST-SSR) în scopul identificării polimorfismului multilocus asociat sintezei compușilor terpenici. Analiza structurii alelice a locilor, indicilor de diferențiere genetică (He, Ho, F, GST, FSR, FRT), a pus în evidență diversitatea și frecvența alelelor, variabilitatea genetică intrapopulațională mare la subpopulațiile din flora spontană (42%) față de cele din colecție (26%) și interpopulațională moderată (7%). Sistemul multilocus studiat diferențiază bine subpopulațiile din habitatul natural și slab cele de la GBNI. Primerii specifici EST-SSR (OR09, OR10, OR12, OR13, OR14, OR27, OR40, OR44, OR64, OR75 și OR81) prezintă interes în cercetarea variabilității moleculare intraspecifice corelată cu profilul terpenic și în identificarea genelor TPS candidat la această specie de plantă medicinală și aromatică.

Cuvinte cheie: *Origanum vulgare*, flora spontană, marcheri funcționali, genotipare EST-SSR, terpen-sintetaze, diversitate multilocus

Depus la redacție: 02 decembrie 2019

Adresa pentru corespondență: Mutu Ana, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, str. Academiei, 3/2, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova; e-mail: anisoara.mutu@gmail.com.

Introducere

Specia *Origanum vulgare* L. este o plantă medicinală și aromată (PMA) din genul *Origanum* (familia *Lamiaceae*), foarte eterogen și cu o taxonomie complexă [13]. Actualmente, în baza caracterelor morfologice specifice sunt documentate șase subspecii de *O. vulgare* L.: *ssp. vulgare*, *ssp. glandulosum*, *ssp. gracile*, *ssp. hirtum*, *ssp. viridulum* și *ssp. virens*, dintre care *ssp. hirtum*, bogată în monoterpene fenolice, a constituit subiectul a numeroase cercetări științifice în decursul mai multor decenii [17, 25].

Se cunoaște că selecția direcționată pe identificarea și dezvoltarea formelor cu indici productivi sporiți deseori determină îngustarea fondului de gene și a variabilității moleculare, rezultând în consecință o capacitate joasă de adaptare la condițiile variabile de mediu [2]. În contextul științific actual, au sporit cercetările molecular-genetice complementare la caracteristica biochimică a genotipurilor valoroase din flora spontană, cu scopul introducerii acestora în cultură [4, 26, 27].

În flora Republicii Moldova se întâlnește subspecia *vulgare* și numeroase varietăți ale acesteia în dependență de arealul geografic și condițiile climatice [9]. Germoplasma locală a speciei *O. vulgare ssp. vulgare*, formată în condiții ecologice specifice regiunii (cantități reduse de precipitații, alternate cu perioade îndelungate de secetă, temperaturi scăzute, altitudini mici) poate reprezenta o sursă de fenotipuri și chemotipuri cu potențial ameliorativ. Informații cu privire la structura genetică a populațiilor de plante din habitatul natural, lipsesc, spre deosebire de alte țări, în care plantele *O. vulgare* L. indigene sunt pe larg explorate științific și economic [3, 5, 8]. Cunoașterea fondului de gene, a interrelațiilor în populațiile de plante sub acțiunea factorilor climaterici și antropici este prioritară în elaborarea strategiilor de conservare și valorificare la nivel național.

Variabilitatea în populații este investigată prin diferite metode de analiză moleculară, în dependență de datele genomice disponibile, capacitatea de rezoluție și alte caracteristici tehnice. În cazul lipsei de informații despre secvențele nucleotidice se apelează la analize RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), DAF-

PCR (DNA Amplification Fingerprinting), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), markerii RAPD fiind cei mai utilizați la diverse plante medicinale, inclusiv a celor din genul *Origanum* [16, 27]. În cazul speciilor cu genomul secvențiat, în totalitate sau parțial, genotiparea se realizează prin tehnicile SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) etc. [1, 28, 29].

Recent a luat amploare elaborarea markerilor microsateliți pe secvențe EST (Expressed Sequence Tag) din regiunile de codificare, astfel fiind posibil de evaluat profilul genetic asociat unui fenotip biochimic de interes. EST-urile sunt resurse importante pentru identificarea funcției și activității genelor, genomica comparativă și alte analize de genetică funcțională [12].

În cazul PMA, metaboliții secundari, în special terpenele manifestă specificitate înaltă de organ și țesut, având o semnificație fiziologică și ecologică prin implicarea în rezistența plantelor la diferiți factori de mediu, atacul microorganismelor, insectelor sau în calitate de atractanți pentru polenizatori etc. [14, 17, 30]. Variația calitativă și cantitativă înaltă a compoziției compușilor terpenici în cadrul speciei *Origanum vulgare*, în dependență de fenofază și/sau areal geografic, sugerează asupra variabilității la nivelul genelor ce codifică enzimele terpen-sintetaze (TPS).

Sunt puține lucrări privind activitatea enzimelor TPS la specia *O. vulgare* [8, 18], iar în cazul unor gene cu funcție adnotată lipsesc informații. În bibliotecile de secvențe nucleotidice se conțin colecții de ADNc din țesutul epidermic glandular cu funcție de producere și depozitare a mono- și sesquiterpenelor [8]. Pe bază acestor EST-uri, Novak J. și colab. (2008) au elaborat markeri EST-SSR [21].

În lucrarea de față sunt analizate rezultatele genotipării plantelor speciei *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană (rezervația cultural-naturală Orheiul vechi, s. Butuceni) și din colecția GBNI cu 11 markeri funcționali (EST-SSR) în scopul identificării polimorfismului multilocus asociat sintezei compușilor terpenici.

Material și metode

Materialul de cercetare a inclus 7 subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din rezervația cultural-naturală Orheiul Vechi (notate convențional Or1-Or7) investigate în aspect comparativ cu 3 subpopulații de plante din colecția de PMA a Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru”, mun. Chișinău (notate Ch8-Ch10) [20]. Probele de ADN au fost obținute din materialul biologic (20 indivizi/ subpopulație) colectat de la plante în faza de înflorire. Probele (frunze) au fost înghețate în azot lichid și păstrate la -20°C până la extragerea ulterioară a ADN-lui. Calitatea și concentrația ADN-lui extras cu reagentul stoc CTAB a fost determinată prin electroforeză în gel de agaroză de 1% și spectrofotometrie ($\lambda 260$, $\lambda 280$ nm) [24].

Analiza SSR s-a efectuat cu 11 primeri EST-SSR (OR09, OR10, OR12, OR13, OR14, OR27, OR40, OR44, OR64, OR75, OR81) elaborați de Novak J. [21] la amplificatorul Applied Biosystem PCR Veriti 96 well, conform programului de temperaturi: 95°C – 3 minute; urmat de 35 cicluri: 95°C – 45 secunde, 56°C – 1 minut și 72°C – 2 minute; elongația finală la 72°C pentru 7 min. Reacțiile de amplificare au fost realizate într-un volum de 20 μ L al mediului de reacție care a inclus: 140 ng ADN, 1,0 U/ μ L DreamTaq Green ADN Polimerază (Thermo Scientific), 200 μ M dNTP, 2,5 mM MgCl₂ și 0,9 μ M primeri. Separarea produșilor de amplificare s-a realizat în gel de poliacrilamidă de

8%, în tampon TBE (1x), la intensitatea de 230 V, în cameră de electroforeză verticală (Consort, Belgia). În calitate de marker molecular a fost utilizat GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Gelurile, după imersia în bromură de etidiu 0,05 µg/ml, au fost vizualizate la transiluminatorul UVITEC Cambridge (Franța), asociat cu sistemul de fotodocumentare DOC-PRINT-VX2 (model SXT-F20.M, Franța) și analizate prin intermediul programului specializat Photo-Capt (versiunea 15.02).

Prelucrarea statistică și interpretarea datelor. Pentru fiecare locus SSR a fost estimată dimensiunea (pb) și nr. alelelor, fiind ulterior incluse în matricea binară de date. Variantele alelice la un locus au fost notate reieșind din dimensiunea ampliconului, de ex. OR44170 (fragment cu dimensiunea de 170 pb amplificat cu markerul OR44). Frecvența alelelor (Fa) a fost determinată prin raportul nr. de alele de interes (N) la nr. total de alele dintr-o subpopulație (Nt) [31].

Estimarea diversității și diferențierii genetice a fost analizată în baza următorilor indici: nr. total (A) și mediu (NA) de alele/subpopulație; nr. efectiv de alele (NE); nr. de alele specifice (NS); ponderea procentuală a locilor polimorfi (PLP), conținutul informației polimorfe (PIC), heterozigoția totală, observată și așteptată (HT, Ho, He), indicii de fixare (F) și de diferențiere genetică GST, FSR, FRT. Analiza varianței moleculare (AMOVA) s-a realizat prin intermediul programului GenAlEx versiunea 6.5 [22].

Rezultate și discuții

Amprelele moleculare ale *O. vulgare ssp. vulgare* obținute cu 11 markeri EST-SSR pentru fiecare subpopulație studiată indică unul sau mai multe profile moleculare, diferite prin numărul și frecvența alelelor la același locus (fig. 1, A, B). Plantele prelevate din flora spontană se caracterizează printr-un grad mai mare de polimorfism alelic al secvențelor microsatelite, prezentând în total 11-29 profile diferite pentru un primer, câte 1-6 profile per subpopulație. Plantele din colecția GBNI, comparativ, sunt mai omogene, reieșind din numărul de 3-8 profile per primer (1-4 profile la o subpopulație). Markerii OR12, OR40 și OR75, s-au evidențiat prin cele mai diverse profile: mono, bi-, tri-, tetraalelice etc.

Pentru fiecare locus genic a fost determinat un număr diferit de alele (1-11) (fig. 2). De exemplu, markerii cei mai variabili după numărul de variante alelice între cele două populații sunt: OR10, OR12, OR75 cu o diferență de 5 alele. Intervalul de valori al lungimii alelelor este cel mai mare la locusul OR40 (de 112 pb).

Markerii analizați diferă atât după secvență, cât și după complexitatea motivului care se repetă, cu toate acestea, nu a fost observată o tendință relevantă pentru locii cu mai multe baze pe unitate repetată, sau mai multe repetări per alelă/dimensiune (pb), corelată cu niveluri mai mari de variație.

Un alt indicator relevant pentru măsurarea polimorfismului alelic la nivelul unui locus și al puterii de discriminare a markerului molecular este conținutul informației polimorfe (PIC) [7]. Conform mediei valorilor PIC, un grad înalt de polimorfism (PIC: 0,65±0,09) s-a constatat la plantele din habitatul natural și moderat (PIC: 0,52±0,19) la cele din colecție, rezultate convergente cu cele ale numărului de profile moleculare și de alele pe profil.

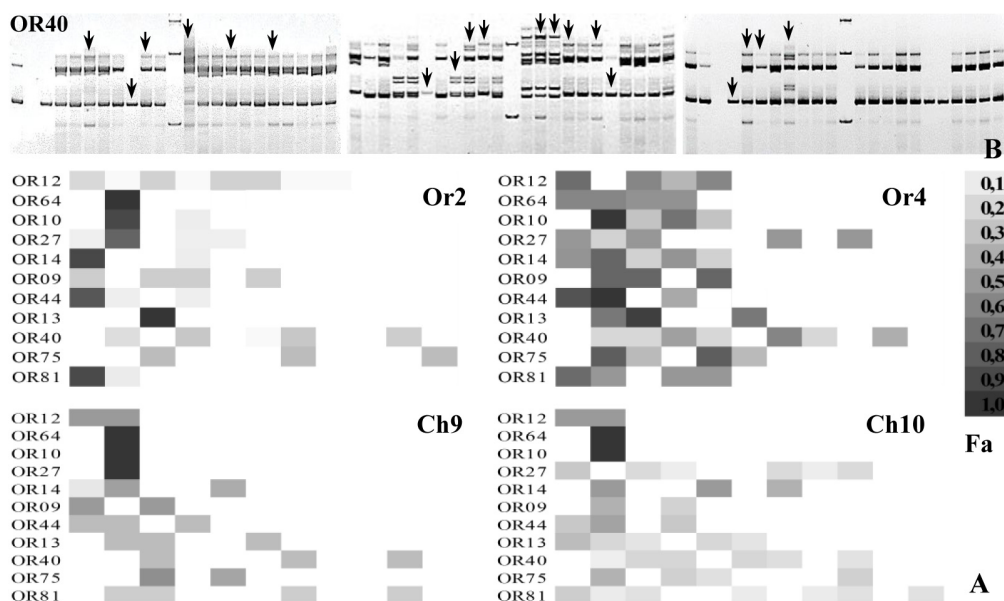


Figura 1. Exemple de amprente genetice EST-SSR. A – SSR-PAGE/primer, B – Prezentare schematică a amprente genetice sumare (11 primeri). Fa – frecvența alelelor (0,1-1,0). Prin săgeți sunt indicate tipuri de profile diferite.

În concluzie, markerii OR12, OR27, OR40 și OR75 sunt cei mai informativi, datorită unui potențial înalt de discriminare a plantelor de *O. vulgare*.

Diversitatea alelelor la nivelul unor regiuni de ADN microsatelit în genomul *O. vulgare ssp. vulgare*, analizat în baza numărului total (A) și mediu (NA) de alele/subpopulație, numărului efectiv de alele (NE) și alele specifice (NS), frecvenței alelelor (Fa) și ponderii procentuale a locilor polimorfi (PLP, %), a permis diferențierea pronunțată a subpopulațiilor din rezervația naturală comparativ cu cele din colecție (fig. 2).

Subpop.	A	N _A	N _E	N _S	PLP (%)	Loci cu alele specifice
Or1	29	2,64	2,36	2	55	OR44, OR75
Or2	35	3,18	2,26	0	82	-
Or3	49	4,46	3,64	3	100	OR10*, OR13
Or4	46	4,18	3,77	3	100	OR40*, OR81
Or5	44	4,00	2,82	1	91	OR13
Or6	25	2,27	2,26	0	73	-
Or7	25	2,27	2,21	0	55	-
Ch8	30	2,73	2,31	1	64	OR40
Ch9	25	2,27	2,22	1	73	OR81
Ch10	40	3,64	3,34	2	82	OR81*

* - loci cu 2 alele specifice unei subpopulații.

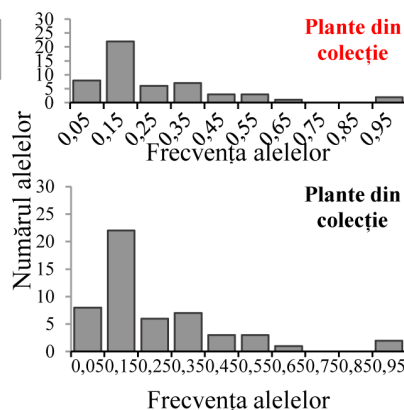


Figura 2. Indici de diversitate alelică (A) și frecvența alelelor locilor EST-SSR (B).

Numărul total al alelelor identificat cu 11 markeri funcționali pentru fiecare subpopulație a variat de la 25 la 49, cu o valoare medie de 36,14 alele în cazul plantelor

din habitatul natural și 31,67, în cazul celor de la GBNI. Cel mai mic număr de variante alelice (25) a fost constatat în subpopulațiile Or6, Or7 și Ch9, iar cel mai mare (49) la Or3. Respectiv și valoarea medie a NA este mai mare la populația din flora spontană (3,29) față de cele din cultura experimentală (2,88).

Diferențele între valorile NA și NE relevate în amprente moleculare ale indivizilor din rezervația naturală indică pe de o parte, prezența numărului mai mare de loci polimorfi și mai puține alele cu frecvențe relativ ridicate, iar pe de altă parte, a unui număr mai mare de alele rare.

Diferențierea subpopulațiilor din rezervația naturală după numărul mediu și efectiv de alele este mai pronunțată comparativ cu cele din colecție și poate fi prezentată sub forma următoarelor clasamente de valori în sens ascendent: NA – Or6, Or7 < Or1 < Or2 < Or5 < Or4 < Or3 și NE – Or7 < Or6, Or2 < Or1 < Or5 < Or3 < Or4.

Au fost identificate 25 alele rare, 5 abundente și 48 frecvente la indivizii din rezervația naturală și 4 alele rare, 6 abundente și 42 frecvente la cei din colecția GBNI. Alelele specifice unei subpopulații au frecvențe cuprinse între 0,005 și 0,083, majoritatea fiind rare. Cele mai abundente alele sunt OR10112 și OR6487 (frecvența de 0,82 și 0,61 respectiv). Pentru 6 loci SSR (OR10, OR13, OR40, OR44, OR75, OR81) au fost identificate alele specifice la 7 din cele 10 subpopulații studiate: OR13200 (Or5); OR44163, OR75114 (Or1); OR10102, 155, OR13172 (Or3); OR40133, 183, OR81158 (Or4); OR81197, 210 (Ch10); OR4086 (Ch8); OR81187 (Ch9).

Conform ponderii procentuale a locilor polimorfi, o valoare $\geq 70\%$ se constată la 7 din 10 subpopulații. PLP de 100% a fost pus în evidență doar la Or3 și Or4 și puțin mai mic – 91%, la Or5. În același timp, cea mai mică valoare a acestui indice (55%) este relevată, de asemenea, la subpopulații din flora spontană – Or1 și Or7.

Este important de menționat că Or3 și Or4 au valori maxime a indicilor de estimare a diversității alelice: PLP (100%), Ns (3 alele), NA (4,46 și respectiv 4,18), NE (3,64 și respectiv 3,77), A (49 și respectiv 46). Subpopulația Or5 are valori apropiate celor relevate pentru Or3 și Or4 (A= 44, NA= 4, NE =2,82, PLP=91%).

Cuantificarea diversității genetice s-a realizat la nivelul unui locus și al întregului sistem multilocus prin investigarea heterozigoției așteptate (He) și observate (Ho), indicelui de fixare (F), coeficienților de diferențiere genică (GST și FRT) și analiza varianței moleculare (AMOVA).

Structura și diferențierea genetică în calitate de componente principale ale analizei genetice populaționale are la bază unul dintre cele mai cunoscute principii, echilibrul Hardy-Weinberg (EHW), conform căruia frecvențele alelelor și genotipurilor rămân constante de la o generație la alta în absența unor factori destabilizatori [23]. Deși în mod natural populațiile tind să-și mențină structura genetică într-un anumit echilibru optim, în realitate acest lucru este practic imposibil (cel puțin pentru unele gene din genomul lor). Astfel, media indicelui de fixare F [11, 15] are valori apropiate de „0”, cu mici devieri, în cazul ambelor populații studiate, fapt care denotă că încrucișările s-au realizat în mod aleatoriu (tab. 1).

Valorile negative ale indicelui F indică un mic exces de heterozigoție la populația naturală ($F = -0,01 \pm 0,20$) și comparativ, puțin mai mare la cea de la GBNI ($F = -0,15 \pm 0,21$). Aceste rezultate sunt concludente cu valorile medii ale heterozigoției observate și cele ale heterozigoției așteptate între care nu există diferență statistic semnificativă ($p > 0,05$,

$p = 0,74$, $\alpha = 0,05$) la populația din flora spontană și nici la populația din colecție ($p > 0,05$, $p = 0,37$, $\alpha = 0,05$).

Tabelul 1. Diversitatea genetică multilocus (11 EST-SSR) a plantelor de *O. vulgare* ssp. vulgare la nivel de subpopulație/populație.

Populații	Subpopulații	He	Ho	F
Rezervația cultural -naturală Orheiul Vechi (s. Butuceni)	Or1	0,38±0,25	0,42±0,30	-0,06±0,16
	Or2	0,38±0,21	0,34±0,28	0,25±0,31
	Or3	0,71±0,05	0,66±0,14	0,06±0,20
	Or4	0,72±0,04	0,75±0,18	-0,02±0,24
	Or5	0,55±0,17	0,48±0,26	0,20±0,31
	Or6	0,45±0,20	0,68±0,30	-0,42±0,26
	Or7	0,36±0,24	0,42±0,30	-0,11±0,25
	Media	0,51±0,15	0,54±0,15	-0,01±0,20
GBNI (mun. Chișinău)	Ch8	0,38±0,23	0,45±0,30	-0,09±0,17
	Ch9	0,44±0,20	0,52±0,25	-0,13±0,16
	Ch10	0,57±0,20	0,73±0,26	-0,25±0,21
	Media	0,46±0,24	0,57±0,35	-0,15±0,21

Notă: He – heterozigoția așteptată; Ho – heterozigoția observată; F – indicele de fixare, testul Student de semnificație ($\alpha = 0,05$).

La nivel intrapopulațional, media heterozigoției pentru cei 11 loci analizați, relevă cea mai mare pondere a heterozigoților la subpopulația Or4 ($Ho = 0,745 \pm 0,18$ și $He = 0,723 \pm 0,04$), iar cea mai scăzută la subpopulațiile: Or7 ($He = 0,356 \pm 0,24$; $Ho = 0,42 \pm 0,30$), Or2 ($He = 0,38 \pm 0,21$; $Ho = 0,336 \pm 0,28$ și Or1 ($He = 0,38 \pm 0,25$; $Ho = 0,42 \pm 0,30$). Acest clasament se suprapune cu cel identificat la parametrul Ne, fapt ce subliniază o legătură strânsă între numărul efectiv de alele la o subpopulație și numărul de genotipuri heterozigote care rezultă din combinarea lor ($Or7 < Or1, Or2 < Or6 < Or5 < Or3 < Or4$).

Spre deosebire de Or2 ($F = 0,25 \pm 0,31$) și Or5 ($F = 0,20 \pm 0,31$), la care s-au constatat devieri de la echilibrul Hardy-Weinberg printr-un deficit de heterozigoție, la celelalte subpopulații, inclusiv de la GBNI (Ch8 și Ch9) abaterile sunt relativ mici, determinate de un exces de heterozigoție. Subpopulația Or6 s-a remarcat prin cele mai mari devieri ($F = -0,42 \pm 0,26$).

În cazul populației din colecție se evidențiază subpopulația Ch10 cu valoarea negativă a indicelui $F = -0,25$ fiind constatat de asemenea un exces de heterozigoție. Astfel doar în cazul a 2 subpopulații (Or2 și Or5), ambele din habitatul natural, sunt prezente alele homozigote (inbreeding).

Datele obținute în rezultatul investigării parametrilor diversității genetice sunt confirmate și completate de cele ale analizei ierarhice a varianței moleculare (AMOVA), care au evidențiat un grad mai mare de variație la nivel individual față de cel relevant la nivel intra- și interpopulațional (fig. 3). O particularitate deosebită, este determinată de valorile mai mari ale varianței moleculare între plantele speciei *O. vulgare* din colecția GBNI (74%) comparativ cu cele ale plantelor din rezervația naturală (58%). Contrar acestor date, varianța la nivel intrapopulațional este mai mare la subpopulațiile din flora spontană (42%), comparativ cu cele din colecție (26%). Analiza varianței moleculare la toate 10 subpopulații pune în evidență o diferențiere genetică semnificativă de 38% ($p < 0,001$). La nivel interpopulațional variația genetică reprezintă 7% ($p < 0,001$) din variația moleculară totală (fig. 3).

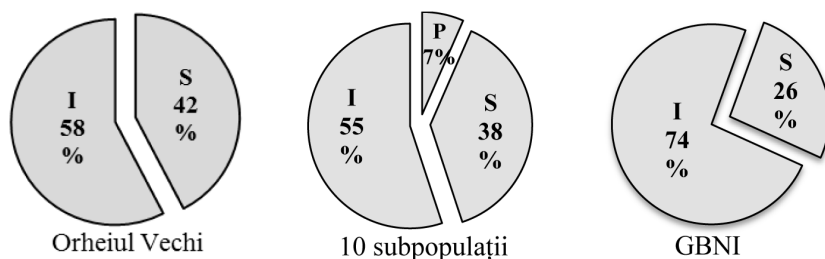


Figura 3. Analiza varianței moleculare (AMOVA). Notă: I – variația moleculară dintre indivizi; S – variația moleculară între subpopulații; P – variația moleculară dintre populații; $p < 0,001$, 999 de permutări; a fost folosit programul GenAlEx 6.5 [22].

În continuare se vor prezenta valorile parametrilor de diferențiere genetică pentru fiecare locus separat (tab. 2). Astfel, conform valorilor H_T , heterozigoția totală în populația din flora spontană este mai mare de 70% (0,7-0,84) în cazul a 5 loci (OR75, OR12, OR27, OR40, OR09). Valoare medie pentru toți 11 loci este 0,69 (69% genotipuri heterozigote). La nivelul populației din cultură, heterozigoția totală/11 loci are o valoare mai mică – 0,57 (57%). Analiza per locus a evidențiat și în acest caz, aceiași loci OR75, OR27, OR40 și OR75 cu valori mai mari (0,7-0,84) ai H_T .

Locii OR10 și OR64 discriminează populațiile între ele prin valoarea heterozigoției totale de 0,43 și respectiv 0,64 la plantele din flora spontană și homozigoție absolută la cele din colecția GBNI. Locii OR09, OR14, OR64 și OR81 diferențiază cel mai bine subpopulațiile indigene (F_{SR} : 0,3-0,45). Locii OR09 ($F_{SR} = 0,25$) și OR81 ($F_{SR} = 0,28$), de asemenea, diferențiază slab și subpopulațiile din GBNI. OR12 și OR40 diferențiază slab subpopulațiile din cadrul ambelor populații studiate.

În general, sistemul multilocus studiat diferențiază bine subpopulațiile indigene între ele ($F_{SR} = 0,27 \pm 0,07$) și mai slab cele din colecția GBNI ($F_{SR} = 0,15 \pm 0,09$).

Tabelul 2. Indici de diversitate inter- și intrapopulațională.

Loci SSR	H_T		F_{SR}		F_{RT}	G_{ST}
	Orhei	Chișinău	Orhei	Chișinău		
OR09	0,72	0,51	0,37	0,25	0,12	0,42
OR10	0,43	0,00	0,23	0,00	0,06	0,28
OR12	0,82	0,58	0,14	0,16	0,05	0,19
OR13	0,66	0,69	0,26	0,23	0,06	0,29
OR14	0,61	0,65	0,31	0,06	0,14	0,34
OR27	0,81	0,81	0,28	0,39	0,01	0,32
OR40	0,81	0,84	0,07	0,09	0,00	0,08
OR44	0,55	0,66	0,26	0,01	0,05	0,22
OR64	0,64	0,00	0,45	0,00	0,18	0,55
OR75	0,84	0,77	0,24	0,19	0,03	0,25
OR81	0,67	0,74	0,35	0,28	0,10	0,39
Valoarea medie	0,69 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,09	0,07 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,08

Notă: H_T – heterozigoția totală; F_{SR} – indicele de diferențiere genetică între subpopulațiile unei populații; F_{RT} – indicele de diferențiere între populații; G_{ST} – indicele de diferențiere genetică relativă între toate subpopulațiile.

Indicele F_{RT} indică o valoare medie/11 loci mai mică de diferențiere genetică (0,07 $\pm$ 0,04) între cele două populații. La nivelul unui locus se evidențiază markerii

OR14 (0,14), OR09 (0,12) și OR64 (0,18). După locii OR27 ($F_{RT} = 0,008$) și OR40 ($F_{RT} = 0,003$) populațiile aproape că nu se diferențiază între ele.

Coeficientul de diferențiere genetică (GST, după frecvența alelelor) între toate cele 10 subpopulații (flora spontană și colecția GBNI) are o valoare medie de $0,30 \pm 0,08$, sau 30%. La nivelul unui locus acest coeficient variază în intensitate:

- de la 0,05 la 0,15, diferențiere genetică moderată – OR40
- de la 0,15 până la 0,25, diferențiere genetică mare – OR12 și OR44
- de la 0,25 la 1, diferențiere genetică foarte mare – OR75, OR10, OR13, OR14, OR27, OR81 OR09, OR64.

Comarate între ele, valoarea medie a F_{RT} ($0,073 \pm 0,038$) este semnificativ mai mică ($p < 0,05$, $p = 7,53 \cdot 10^{-5}$) decât cea a G_{ST} ($0,302 \pm 0,084$). Acest fapt se constată și în cazul AMOVA, care indică o variabilitate intrapopulațională mare și interpopulațională moderată (fig. 3).

Structura genetică a unei populații de plante este rezultatul selecției naturale și artificiale, a recombinărilor și transferului de gene, a mutațiilor. S-a constatat că majoritatea microsateliților au rate de mutații ridicate, care apar la nivelul tipurilor de repetiții (di- tri- și tetranucleotide), unității repetitive [6], structurii (perfect, compus sau întrerupt). Secvențele flancante sau poziția pe cromozom, pot influența, de asemenea, gradul de variație al unui anumit microsatelit. Mai mult ca atât, chiar și la un anumit locus, rata de mutație poate varia, alelele lungi fiind în general mai predispuse la mutație decât cele scurte. Polimorfismul SSR este generat și de numărul de secvențe repetitive (diferențe de lungime ale alelelor) [28].

Unul dintre factorii majori ce influențează variabilitatea genetică este tipul de reproducere [10]. În acest context diversitatea semnificativă a plantelor speciei *O. vulgare* poate fi explicată și prin faptul că este o plantă alogamă, caracterizată prin polenizarea încrucișată [13].

În cadrul investigațiilor anterioare, genotiparea RAPD a variabilității genetice a plantelor din subpopulațiile vizate a relevat, de asemenea, gradul mic de variabilitate genetică (36,4%) a plantelor din colecția GBNI în comparație cu cele din flora spontană (45,0%) [20].

Polimorfismul mai înalt al plantelor indigene față de cele introduse în cultură, corelează cu rezultatele unor studii anologice. Astfel, prin tehnicile AFLP, SAMPL și RAPD a fost evidențiat un polimorfism semnificativ la 19 subpopulații de *O. vulgare ssp. vulgare*, 14 de *O. syriacum* L. din flora spontană și șase forme de *O. syriacum* și *O. majorana* L. din cultură [2, 5, 29]. Unii autori explică variabilitatea moleculară mai redusă a genotipurilor introduse în cultură prin activitatea de selecție direcționată, asociată deseori cu fenomenul de depresie inbreeding.

În concluzie generală, genotiparea plantelor de *O. vulgare* cu 11 markeri microsateliți, din regiunile de codificare a ADN-lui cu activitate de transcripție în țesutul epidermic glandular, a pus în evidență rezultate convergente privind numărul de profile moleculare, de alele/profil și conținutul informației polimorfe în diferențierea genetică a populațiilor, indicând un grad înalt de polimorfism la cele din habitatul natural și moderat la cele din colecție. Aceste date sugerează faptul că exploatarea și fragmentarea habitatelor naturale nu a afectat semnificativ diversitatea în interiorul populației, ceea ce este important pentru păstrarea unui potențial sporit de adaptare la

factorii de mediu. De asemenea, diversitatea alelică înaltă a locilor activi transcripțional în structuri cu funcții de sinteza a terpenelor la plantele din flora spontană demonstrează semnificația acestor compuși în dezvoltarea unui potențial de rezistență fiziologică optim la condițiile de creștere.

Primerii specifici EST-SSR studiați prezintă interes în cercetarea variabilității moleculare intraspecifice corelată cu profilul terpenic și în identificarea genelor TPS candidat la această specie de PMA.

Concluzii

În premieră a fost evaluată diversitatea genetică intra- și interpopulațională a plantelor de *O. vulgare ssp. vulgare* indigene și colecție, în baza amprentelor moleculare EST-SSR (11 microsateliți), prin analiza structurii alelice a locilor, indicilor de diversitate și diferențiere genetică (H_e , H_o , F , G_{ST} , F_{SR} , F_{RT}), fiind constatate:

- frecvența alelelor în genom: 25 alele rare, 5 abundente și 48 frecvente la indivizii din rezervația naturală și 4 alele rare, 6 abundente și 42 frecvente la cei din colecția GBNI. Alelele specifice unei subpopulații au frecvențe cuprinse între 0,05 și 0,083, majoritatea din ele fiind rare;
- prezența alelelor specifice pentru 6 loci SSR (OR10, OR13, OR40, OR44, OR75, OR81) la 7 din 10 subpopulații studiate;
- variabilitatea genetică intrapopulațională mare la subpopulațiile din flora spontană (42%) față de cele din colecție (26%) și interpopulațională moderată (7%);
- diferențierea genetică înaltă între subpopulațiile din flora spontană și cele din colecție determinată de markerul OR64 ($F_{RT} = 0,184$, $G_{ST} = 0,549$), OR09 ($F_{RT} = 0,115$, $G_{ST} = 0,416$), OR14 ($F_{RT} = 0,143$, $G_{ST} = 0,342$) și OR81 ($F_{RT} = 0,095$, $G_{ST} = 0,393$). Locii OR10 și OR64 au o valoare a heterozigotiei totale de 0,43 și respectiv 0,64 la plantele din flora spontană și homozigotie la cele din colecția GBNI. Sistemul multilocus studiat diferențiază bine subpopulațiile indigene ($FSR = 0,27 \pm 0,07$) și slab cele din colecție ($F_{SR} = 0,15 \pm 0,09$);
- ponderea mare a heterozigotilor (la nivelul 11 loci EST-SSR) la subpopulația Or4 ($H_o = 0,75 \pm 0,18$; $H_e = 0,72 \pm 0,04$) și redusă la Or1 ($H_e = 0,38 \pm 0,25$; $H_o = 0,42 \pm 0,30$), Or2 ($H_e = 0,38 \pm 0,21$; $H_o = 0,34 \pm 0,28$) și Or7 ($H_e = 0,36 \pm 0,24$; $H_o = 0,42 \pm 0,30$). Subpopulația Or6 s-a remarcat prin exces de heterozigotie semnificativ ($F = -0,42 \pm 0,26$).

Bibliografie

1. Aboukhalid K. et al. Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: Implication for conservation. Biological Conservation. 2017. vol. 212, p. 172-182.
2. Akeel R. N. et al. Genetic variation between and among *Origanum syriacum* L. and *Origanum majorana* L. populations collected from different locations in Jordan using RAPD marker. Journal of Crop Research. 2009. vol. 38(1,2,3), p. 245-257.
3. Andi S. A. et al. Morphological diversity of wild *Origanum vulgare* (Lamiaceae) in Iran. The Iranian Journal of Botany. 2011. vol. 17, p. 88-97.
4. Azizi A. et al. Correlations between genetic, morphological and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. Chemistry & Biodiversity. 2012. vol. 9, p. 2784-2801.
5. Azizi A., Wagner C., Honermeier B. Statistical analysis of the associations between phenolic monoterpenes and molecular markers, AFLPs and SAMPLs in the spice plant *Oregano*. Herba Polonica Journal. 2016. vol. 62(2), p. 42-56.

6. Bachtrog D. et al. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. Molecular Biology and Evolution. 2000. vol. 17(9), p. 1277-1285.
7. Botstein D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 1980. vol. 32, p. 314-331.
8. Crocoll C. et al. The terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. Plant Molecular Biology. 2010. vol. 73(6), p. 587-603.
9. Goncariuc M. și al. Genotipuri perspective de *Origanum vulgare* ssp.vulgare L. și *Origanum vulgare* ssp. hirtum (link) Ietswaart. Buletinul AȘM. Științele vieții. 2014. nr. 1, vol. 322, p. 41-50.
10. Hamrick J. L., Godt M. J. Allozyme diversity in plant species. BROWN, A. H. D. et al. eds. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer: Sunderland, 1989. p. 43-63.
11. Hartl D. L., Clark A. G. Principles of Population Genetics. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1997, vol. 116, 545 p.
12. Hu J., Wang L., Li J. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. Biologia Plantarum. 2011. vol. 55, p. 577-580.
13. Ietswaart J. H. A Taxonomie Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae). Leiden Botanical Series: Leiden University Press. 1980, vol. 4, 153 p.
14. Irmisch S. et al. The organ-specific expression of terpene synthase genes contributes to the terpene hydrocarbon composition of chamomile essential oils. BMC Plant Biology. 2012. vol. 12(84), p 1-13.
15. Keller L. F., Waller D. M. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology & Evolution. 2002. vol. 17(5), p. 230-241.
16. Koh H. J., Kwon S. Y., Thomson M. Current technologies in plant molecular breeding. New York, London: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2015. 352 p.
17. Morshedloo M. R. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. gracile at different phenological stages and plant parts. Journal of Food Processing and Preservation. 2017. vol. 42(2), p. 1-8.
18. Morshedloo M. R. et al. Prolonged water stress on growth and constituency of Iranian of Oregano (*Origanum vulgare* L.). Journal of Medicinally Active Plants. 2016. vol. 5, p. 7-19.
19. Mutu A. Diversitatea morfologică a populațiilor de *Origanum vulgare* L. din Republica Moldova. Buletinul AȘM. Științele vieții. 2018, nr. 1(334), p. 85-96.
20. Mutu A. Variabilitatea genetică în cadrul diferitor populații de *O. vulgare*. Studia Universitatis Moldaviae. Științe reale și ale naturii. 2014, nr. 1(71), p. 76-81.
21. Novak J. Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* expressed sequence tag. Molecular Ecology Resources. 2008, vol. 8, p. 599-601.
22. Peakall R., Smouse P. E. Genalex 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics. 2012, vol. 28, p. 2537-2539.
23. Pritchard J. K. M., Stephens-Donnell Y. P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000, vol. 155, p. 945-959.
24. Sambrook J., Russell D. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.: New York, vol. I-III, 2001, 1885 p.
25. Singh P., Kothiyal P., Ratan P. Pharmacological and phytochemical studies of *Origanum vulgare*: A review. International Research Journal of Pharmacy. 2018, vol. 9(6), p. 30-34.
26. Taşcioğlu T. et al. Molecular genetic diversity in the *Origanum* genus: EST-SSR and SRAP marker analyses of the 22 species in eight sections that naturally occur in Turkey.

Industrial Crops and Products. 2018, vol. 123, p. 746-761.

27. Tonk F. A. et al. Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. Plant Systematics and Evolution. 2010, vol. 288, p. 157-165.

28. Vieira M. L. C. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics and Molecular Biology. 2016, vol. 39(3), p. 312-328.

29. Vieira R., Goldsbrough P., Simon J. E. Genetic diversity of basil (*Ocimum spp.*) based on RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 2003, vol. 128, p. 94-99.

30. Yadav R. K. et al. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. Plant Physiology and Biochemistry. 2014, vol. 74, p. 70-83.

31. <https://www.khanacademy.org/science/biology/her/heredity-and-genetics/a/allele-frequency-the-gene-pool>