

# VARIABILITATEA GENETICĂ A UNOR POPULAȚII DE *OROBANCHE CUMANA* WALLR. DIN REPUBLICA MOLDOVA

Duca Maria, Port Angela, Mutu Ana, Clapco Stela

*Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”*

## Rezumat

*Orobanche cumana* Wallr. este o plantă holoparazită cu potențial înalt de distrugere a recoltei agricole de floarea-soarelui din numeroase țări, preponderent cele din Asia centrală și sud-estul Europei. Cunoașterea diversității și structurii genetice a populațiilor de *O. cumana* este necesară pentru elucidarea evoluției raselor și a patosistemului în scopul ameliorării rezistenței genetice cu efecte de durată. Obiectivul cercetărilor a fost de a analiza diversitatea alelică a unor loci SSR și a relațiilor genetice dintre indivizii a patru populații autohtone de *O. cumana* colectate din Sărata-Mereșeni, municipiul Chișinău, Popeasca și Gura-Galbenii. Genotiparea a pus în evidență polimorfismul a 13 loci microsatelici, diferențiind populațiile prin profil, număr și frecvența alelelor la același locus. S-a constatat că majoritatea alelelor sunt frecvente și foarte puține rare (4-8%). Modelul generat de ACP a pus în evidență tendințele de covariație în frecvența a 32 din 51 de alele (14 loci SSR) și alelele cu cele mai mari contribuții procentuale în caracteristica populațiilor. Nu au fost identificate variante alelice specifice indivizilor doar unei populații. Conform indicilor de estimare și cuantificare a diversității genetice populația colectată de la Sărata-Mereșeni prezintă cel mai mic grad de variație genetică la nivel intrapopulațional și cel mai mare la cel interpopulațional. Între populațiile din mun. Chișinău (IGFPP) și Gura-Galbenii (Hâncești) nu sunt diferențe genetice semnificative, intrapopulațional sunt heterogene, indivizii prezentând profile caracteristice ambelor fonduri de gene.

*Cuvinte cheie:* *Orobanche cumana* Wallr., genotipare SSR, variabilitate genetică, analiza componentelor principale (ACP).

*Depus la redacție* 28 ianuarie 2020

---

*Adresa pentru corespondență:* Port Angela, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, str. Academiei 3/2, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova; e-mail: portang@yahoo.com.

## Introducere

*Orobanche cumana* Wallr. (lupoaia) este o specie de antofită parazită din familia *Orobanchaceae* cu un potențial sporit de infectare prin depășirea mecanismului de rezistență a plantelor-gazdă. Holoparazitul întâlnit preponderent în centrul și sud-estul Europei, Spania, Turcia, Israel, Iran, Kazahstan, China constituie unul dintre factorii limitativi de bază în obținerea producției agricole de floarea-soarelui (*Helianthus*

*annuus* L.) [32]. Actualmente sunt cunoscute opt rase (de la A la H), dintre care F, G și H sunt cele mai virulente și se răspândesc într-un ritm ascendent, ocupând noi suprafețe în întreaga lume [19, 48].

*O. cumana* se caracterizează prin specificitate înaltă de gazdă, floarea-soarelui fiind unica plantă de cultură parazitată. Această particularitate poate fi asociată cu modul preponderent vertical (monogenic, dominant) de moștenire a rezistenței genetice la fitopatogen [18, 41]. Introducerea rezistenței specifice, oligogenice, provoacă apariția unor gene de virulență, de rase capabile să paraziteze formele noi. Deși evoluția raselor fiziologice decurge concomitent cu ameliorarea rezistenței genetice a florii-soarelui, în patosistemele formate, deseori dezvoltarea este în favoarea parazitului, spre deosebire de plantele sălbatice la care coexistența plantă-parazit este rezultatul selecției stabilizatoare.

În câmpurile de floarea-soarelui din țară au fost identificate diferite rase prin utilizarea liniilor diferențiatorie cu gene dominante *Or1-Or5* [13, 15]. În ultimii 5-10 ani se atestă populații mai virulente care devin din ce în ce mai expansive în regiunea de centru și sud-est a Republicii Moldova [23]

Extinderea suprafeței de culturi infectate cu lupoaie și evoluția spre forme mult mai agresive demonstrează capacitatea înaltă de adaptare la condițiile mediului înconjurător, sugerând asupra variabilității genetice largi în populațiile locale. Se cunoaște că premisele de bază în evoluția și apariția de noi rase sunt astfel de evenimente ca recombinările genetice, mutațiile, driftul și fluxul de gene care generează diversitate [36, 38].

Există și alți factori care induc dezechilibre în raportul de coexistență între parazit și gazdă, soldate cu pierderi mari de recoltă, de exemplu, numărul mic de soiuri și hibridi intensivi autohtoni, aplicarea dozelor mari de îngrășăminte, nerespectarea perioadelor de rotații, unor procedee tehnologice etc. Astfel, în funcție de condițiile agroecologice, potențialului economic, de cunoștințele și competențele dobândite se formează decalaje mai mult sau mai puțin pronunțate în materie de producție. Identificarea raselor de *O. cumana* este o componentă prioritară în ameliorarea rezistenței la parazit, iar investigațiile cu markeri moleculari pot furniza informații relevante în acest scop.

La nivel național, specia *O. cumana* a făcut subiectul diferitor investigații axate preponderent pe fiziologia și aspectul molecular al dezvoltării gazdă-parazit [14, 24, 39, 42], identificarea genelor specifice de rezistență [13, 23], diferiți indici de virulență, caracteristici agro-economice a culturilor afectate [16, 21, 22]. În contextul elucidării variabilității genetice a reprezentanților acestui patogen pot fi menționate unele studii comparative ale polimorfismului fragmentelor RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) și SSR (*Simple Sequence Repeats*) [12, 17].

Markerii RAPD sunt frecvent utilizați în analiza genomului diferitor specii de plante, întrucât identifică un procent relativ mare de polimorfisme generate de inserții ale fragmentelor mari de ADN între cele două *situs*-uri de fixare ale *primer*-ului, deleții ale fragmentelor de ADN cu unul sau mai multe regiuni de fixare ale amorsei, substituții de nucleotide etc. [1]. Deși genotiparea RAPD continuă să rămână o etapă primară în elaborarea markerilor specifici, nu este informativă în studii de genetică populațională, deoarece frecvența alelelor genelor nu poate fi calculată (cca. 95% din fragmentele RAPD sunt apreciate ca markeri dominanți) [46].

Tehnicile de genotipare SSR, spre deosebire de cele cu primeri arbitrari, au căpătat, în ultimii 20 de ani, un rol considerabil în analiza molecular-genetică, ca urmare a

faptului că au o locație specifică pe cromozom, sunt codominanți, multi-alelici, reproductibili experimental și pot fi utilizați la speciile înrudite [49]. Întrucât, diferite alele pot exista la un anumit locus SSR, secvențele microsatelite sunt mai informative decât alți markeri, inclusiv SNP-urile (*Single Nucleotide Polymorphism*) [31]. Tehnica SSR este în special utilă în cazul diferențierii speciilor/formelor sălbatice, în studii privind diversitatea măsurată pe baza distanței genetice, evaluarea fluxului de gene și identificarea relațiilor genetice intraspecifice [26, 49].

Reieșind din importanța cunoașterii diversității și structurii genetice a populațiilor de lupoaie din culturile agricole locale de floarea-soarelui și lipsa informațiilor la acest subiect, scopul cercetărilor expuse în lucrare a constituit analiza diversității alelice a unor loci SSR și a relațiilor genetice dintre indivizii diferitor populații de *O. cumana*.

Studiile de genetică populațională a speciei *O. cumana* din diferite regiuni geografice pot aduce contribuții esențiale în elucidarea particularităților evolutive și funcționale ale patosistemului și respectiv în dezvoltarea strategiilor naționale de control și ameliorare a rezistenței florii-soarelui față de parazit.

### Material și metode

**Materialul biologic.** Analiza diversității genetice intra- și interpopulaționale a holoparazitului epirizoid *Orobancha cumana* Wallr. s-a realizat la patru populații de indivizi colectați în anul 2018 din câmpurile de floarea-soarelui cu antofitoze din localitățile: Sărata-Mereșeni (SM), Popeasca (PoP), Gura-Galbenii (GuG) și mun. Chișinău (IGFPP- Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor). Probe vegetale individuale au fost prelevate de la plante înainte de înflorire, înghețate în azot lichid și păstrate la  $-20^{\circ}\text{C}$  până la extragerea ulterioară a ADN-lui.

Pentru analiza SSR s-au utilizat eșantioane de ADN genomic de la 22 plante individuale din fiecare populație, obținute prin metoda de extragere cu soluția-tampon CTAB [33]. Extragerea, purificarea și cuantificarea probelor de acizi nucleici s-a realizat prin metode descrise în literatură [40].

**Analiza SSR.** Genotiparea s-a efectuat cu 14 primeri SSR elaborați de Pineda-Martos R. et al. [14]. Reacțiile de amplificare au decurs în  $15\ \mu\text{L}$  de mediu de reacție care a inclus: 60 ng de matrită ADN,  $0,03\ \text{U}/\mu\text{L}$  DreamTaq Green ADN Polimerază în soluție tampon (1x) (*Thermo Scientific*), dNTP  $200\ \mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $2,5\ \text{mM}$  (*Thermo Scientific*) și primeri SSR  $0,4\ \mu\text{M}$ .

A fost utilizat amplificatorul PCR Veriti (Applied Biosystem) programat astfel:  $95^{\circ}\text{C}$  – 3 minute; 35 de cicluri:  $95^{\circ}\text{C}$  – 30 secunde,  $57^{\circ}\text{C}$  – 45 secunde,  $72^{\circ}\text{C}$  – 1 minute;  $72^{\circ}\text{C}$  - 5 minute.

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 –  $0,05\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 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 datelor moleculare.** Pentru fiecare locus SSR a fost estimată dimensiunea (pb) și numărul alelelor, care au fost incluse ulterior în matricea binară de date (0-lipsă/1-prezență). Fragmentele de ADN la un singur locus, considerate

alele diferite au fost notate convențional, reieșind din dimensiunea ampliconului, de exemplu OC52.179 (fragment cu dimensiunea de 179 pb amplificat cu *primer*-ul OC52). Frecvența alelelor ( $F_a$ ) a fost determinată prin raportul numărului de alele de interes ( $N$ ) la numărul total de alele dintr-o populație ( $N_t$ ) [50].

Estimarea diversității și diferențierii genetice s-a realizat în baza: numărului de alele la un locus ( $N_a$ ) și sumar, pentru toți 14 loci, într-o populație ( $N_a/p$ ), numărului de alele specifice pentru o singură populație ( $N_s$ ), conținutului informației polimorfe (PIC), heterozigoției observate și așteptate ( $H_o$  și  $H_e$ ), indicelui de fixare ( $F$ ) și de diferențiere genetică  $F_{ST}$  [34]. Analiza varianței moleculare (AMOVA) s-a realizat prin intermediul programului GenAlEx versiunea 6.5 [35]. Pentru determinarea structurii genetice a fost aplicată Analiza componentelor principale (ACP) [28] prin programul biostatistic XLSTAT (<https://www.xlstat.com/>).

### Rezultate și discuții

Genotiparea cu 14 markeri microsatelici (tab. 1) a diferențiat populațiile prin număr și distribuția frecvenței alelelor. Cinci dintre ei: OC52, OC174, OC59, OC196, OC197 s-au remarcat în cadrul unei populații prin diverse profile (mono, bi-, tri-, tetraalelice etc.). Locusul OC122 este monomorf, iar ceilalți 13 sunt polimorfi. Reieșind din numărul de profile diferite (1-6) generate de un marker, populațiile din localitățile Sărata-Mereșeni și Popeasca sunt relativ omogene (1-2) comparativ cu cele colectate din Gura-Galbenii (1-6) și IGFPP (1-4).

Locii OC197, OC196, OC160, OC52 sunt eterogeni după numărul de variante alelice, spre deosebire de: OC70, OC74, OC75, OC81, OC87, OC122, OC141 și OC206 (tab. 1). De asemenea, variază și lungimea secvenței nucleotidice ale alelelor, cel mai larg interval de valori fiind constatat la OC196 (120 pb).

Analiza polimorfismului alelic (PIC) a pus în evidență puterea de discriminare a markerilor. Astfel, la șapte dintre ei: OC52, OC70, OC74, OC75, OC87, OC196, OC197 s-a constatat un nivel înalt ( $> 0,5$ ) al valorii PIC, iar la patru: OC59, OC81, OC160, OC141, OC206 - un nivel moderat al conținutului informației polimorfe ( $0,25 < \text{PIC} < 0,5$ ).

În concluzie, datele privind numărul de profile, alele/profil și indicele PIC, caracterizează locii SSR: OC196, OC197, OC52, ca fiind unii din cei mai informativi pentru genotiparea populațiilor de lupoaie.

Conform indicelui  $N_a/p$  populațiile s-au grupat astfel: GuG cu IGFPP cu câte 50 și 51 de alele și SM cu PoP cu 39 și respectiv 42 de alele (tab. 2).

Variante alelice specifice indivizilor ce aparțin doar unei populații nu au fost identificate. Însă, este important de menționat că patru alele ale locilor OC197, OC52 și OC160 (OC197.105, OC197.95, OC52.135, OC160.145) sunt prezente în genomul indivizilor din trei populații: SM, GuG și IGFPP. Alte trei alele ale locilor OC197 și OC52 (OC197.152, OC52.196, OC52.179) sunt specifice indivizilor din GuG, IGFPP și PoP. Șase alele (locii OC196, OC160 și OC174) diferențiază GuG și IGFPP de PoP și SM (OC160.133, OC196.311, OC196.198, OC196.189, OC174.216, OC174.205), dintre care trei sunt la locusul OC196. Doar o singură alelă – OC59.103 diferențiază ambele populații IGFPP și PoP de SM și GuG.

Tabelul 1. Particularități ale markerilor SSR utilizați în genotiparea plantelor de *O. cumana*.

Loci SSR	Lungimea alelelor ( <i>pb</i> )	Numărul alelelor					PIC
		Na	SM	PoP	GuG	IGFPP	
OC52	135-196	6	4	5	6	6	0,73 ±0,05
OC59	92-103	3	2	3	2	3	0,43 ±0,13
OC70	106-128	3	3	3	3	3	0,59 ±0,00
OC74	114-142	4	4	4	4	4	0,70 ±0,00
OC75	104-147	4	4	4	4	4	0,70 ±0,00
OC81	91-97	2	2	2	2	2	0,38 ±0,00
OC87	111-148	4	4	4	4	4	0,70 ±0,00
OC122	237	1	1	1	1	1	0,00 ±0,00
OC160	133-159	4	3	2	4	4	0,50 ±0,30
OC141	195-221	3	3	3	3	3	0,50 ±0,17
OC174	191-216	3	1	1	3	3	0,21 ±0,41
OC196	189-311	5	2	2	5	5	0,54 ±0,30
OC197	95-152	7	4	6	7	7	0,75 ±0,08
OC206	122-130	2	2	2	2	2	0,38 ±0,00

Notă: Na – numărul de alele; PIC – conținutul informației polimorfe. Nivel înalt PIC > 0,5; nivel moderat 0,25 < PIC < 0,5; nivel scăzut PIC < 0,25 [7].

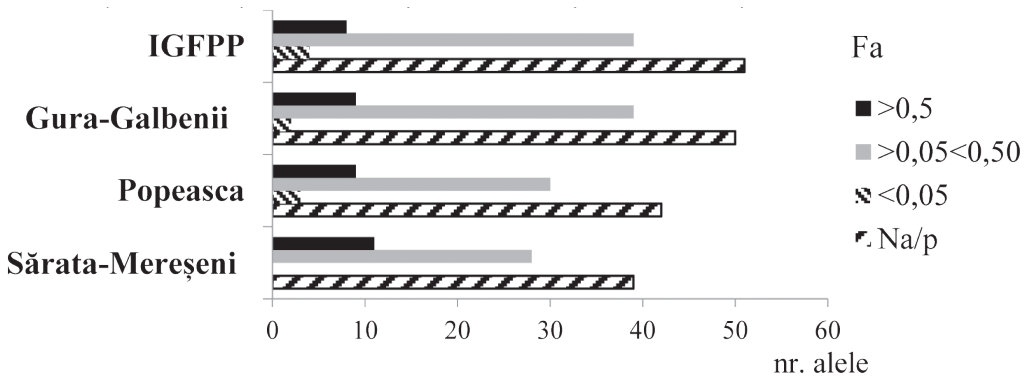
Tabelul 2. Indici de diversitate genetică.

Indici	Populații			
	SM	GuG	IGFPP	PoP
Na/p	39	50	51	42
Ns	4	13	14	4
Loci cu alele specifice	OC197.105; OC197.95; OC52.135; OC160.145			
	OC197.152; OC52.196; OC52.179			
	OC160.133; OC196.311; OC196.198; OC196.189; OC174.216; OC174.205			
	OC59.103			
He	0,53±0,15	0,61±0,16	0,61±0,11	0,53±0,15
Ho	0,80±0,23	0,71±0,24	0,83±0,20	0,79±0,23
F	-0,44	-0,42	-0,15	-0,33

Prezența aceluiași variante alelice la indivizii diferitor populații, în proporție mai mare la GuG și IGFPP, poate fi explicată atât prin natura comună a secvențelor microsatelite, cât și prin existența unui flux de gene între aceste populații.

Analiza frecvenței (%) cu care se întâlnesc alelele (14 loci SSR) a relevat faptul că majoritatea din ele sunt frecvente (72 – SM, 71 – PoP, 78 – GuG și 76 – IGFPP), un procent relativ mare de alele sunt abundente (28 – SM, 21 – PoP, 18 – GuG și 16 – IGFPP), iar cele rare sunt puține (7 – PoP, 4 – GuG și 8 – IGFPP). În cazul populației SM nu s-au identificat alele cu frecvența < 0,05. (fig. 1).

Alelele cu cea mai mare frecvență ( $>0,5$ ) pentru toate cele 4 populații sunt OC81.97, OC81.91, OC206.130, OC122.237, OC174.191, OC59.98.



**Figura 1.** Numărul și frecvența alelelor locilor SSR identificate în amprentele indivizilor din populațiile de *O. cumana*. Notă: Fa – frecvența alelelor:  $<0,05$  (rare);  $0,05-0,50$  (frecvente);  $>0,5$  (abundente) [9]; Na/p – numărul de alele total pe populație.

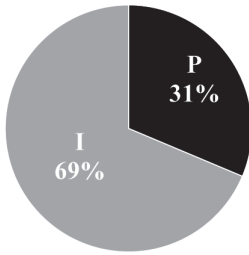
Cuantificarea diversității genetice s-a realizat prin estimarea heterozigoției așteptate ( $H_e$ ) și observate ( $H_o$ ), indicelui de fixare ( $F$ ), coeficientului de diferențiere genică ( $F_{ST}$ ) și analiza varianței moleculare (AMOVA).

Astfel, valoarea medie a heterozigoției observate pentru cei 14 loci analizați este mare pentru toate populațiile (tab. 2). Indicii heterozigoției au valori similare în cazul populațiilor PoP ( $H_e = 0,53 \pm 0,15$ ;  $H_o = 0,79 \pm 0,23$ ) și SM ( $H_e = 0,53 \pm 0,15$ ;  $H_o = 0,80 \pm 0,23$ ) și cu unele diferențe în cazul GuG ( $H_e = 0,61 \pm 0,16$ ;  $H_o = 0,71 \pm 0,24$ ) și IGFPF ( $H_e = 0,61 \pm 0,11$ ;  $H_o = 0,83 \pm 0,20$ ). Întrucât valorile medii ale heterozigoției așteptate sunt mai mici comparativ cu cele ale heterozigoției observate se constată exces de heterozigoție la toate populațiile de *O. cumana*. Cea mai mare pondere a indivizilor heterozigoți a fost relevată în populațiile SM și PoP.

În conformitate cu valorile indicelui  $H_e$ , populațiile studiate prezintă un grad mare de diversitate genetică. Datele obținute în rezultatul investigării indicilor diversității genetice sunt completate de cele ale analizei AMOVA care au relevat că 69% din variația moleculară revin diferențelor între indivizii din populații (88 de indivizi) iar 31% sunt determinate de diferențele între populații ( $p < 0,001$ ) (fig. 2).

Coeficientul de diferențiere la nivel interpopulațional ( $F_{ST}$ ) indică populația SM cu un grad de diferențiere genetică foarte mare față de celelalte trei populații. Indivizii din PoP prezintă divergențe genetice mari față de cei din IGFPF și GuG, iar populațiile IGFPF și GuG sunt similare la nivelul secvențelor celor 14 loci SSR studiați.

Pentru a identifica alelele cu cele mai mari contribuții procentuale în diferențierea genetică a populațiilor de *O. cumana* a fost efectuată Analiza componentelor principale (ACP). Conform datelor generate de program, 3 componente principale (CP) prezintă cumulativ 100% din varianța totală a datelor moleculare. Primele două CP recuperează 93% din informația totală conținută în datele inițiale, fapt pentru care au fost alese în interpretarea structurilor spațiale, în corespundere cu criteriul lui Benzécri [2]. Au fost stabilite asocieri corelative (Pearson) de intensitate puternică între variabile și componentele principale (tab. 3).



Pop/Pop	F <sub>ST</sub>	Nivel de diferențiere genetică [10]
SM/PoP	0,86	foarte mare (0,25-1)
SM/IGFPP	0,39	
SM/GuG	0,34	
PoP/GuG	0,22	mare (0,15-0,25)
PoP/IGFPP	0,17	
<b>GuG/IGFPP</b>	<b>0,00</b>	<b>nu sunt diferențiate genetic</b>

**Figura 2. Analiza varianței moleculare a populațiilor de *O. cumana* și valorile coeficientului de diferențiere genetică (F<sub>ST</sub>). Notă:** I – variația moleculară dintre indivizi (88); P – variația moleculară dintre populații (p < 0,001; 999 de permutări); a fost utilizat programul GenAlEx 6.5 [35].

Astfel, din totalul de 51 de alele, 16 corelează cu CP1 iar 16 cu CP2:

- 9 alele corelate pozitiv (r=0,78-1,0) cu componenta CP1 (OC197.100; OC197.95; OC70.128; OC160.133; OC196.311; OC196.198; OC196.189; OC174.216; OC174.205),
- 7 alele corelate negativ (r=0,89-1,0) cu componenta CP1 (OC197.136; OC197.125; OC197.115; OC160.140; OC196.206; OC196.193; OC174.191),
- 7 alele corelate pozitiv (r=0,76-0,97) cu componenta CP2 (OC197.152; OC70.106; OC52.196; OC52.179; OC141.221; OC141.207; OC59.103),
- 9 alele corelate negativ (r=0,76-0,97) cu componenta CP2 (OC197.105; OC70.112; C52.162; OC52.149; OC52.142; OC52.135; OC160.145; OC141.195; OC59.92).

În ansamblu, tendințele de covariație în frecvența alelelor ale unui și mai mulți loci, indică asupra implicării potențiale a acestora în interacțiuni genice cu efecte aditive și nonaditive.

**Tabelul 3. Combinațiile de variabile corelate cu primele 2 CP.**

Variabile (alele ale locilor SSR)	Loci SSR, ale căror alele sunt variabile corelate	
	cu ambele CP	cu CP1/CP2
<b>CP1, 16 variabile</b> OC197.100; OC197.95; OC70.128; OC160.133; OC196.311; OC196.198; OC196.189; OC174.216; OC174.205; OC197.136; OC197.125; OC197.115; OC160.140; OC196.206; OC196.193; OC174.191.	OC70 OC160 OC197	OC196 OC174
<b>CP2, 16 variabile</b> OC197.152; OC70.106; OC52.196; OC52.179; OC141.221; OC141.207; OC59.103; OC197.105; OC70.112; C52.162; OC52.149; OC52.142; OC52.135; OC160.145; OC141.195; OC59.92.		OC52 OC141 OC59

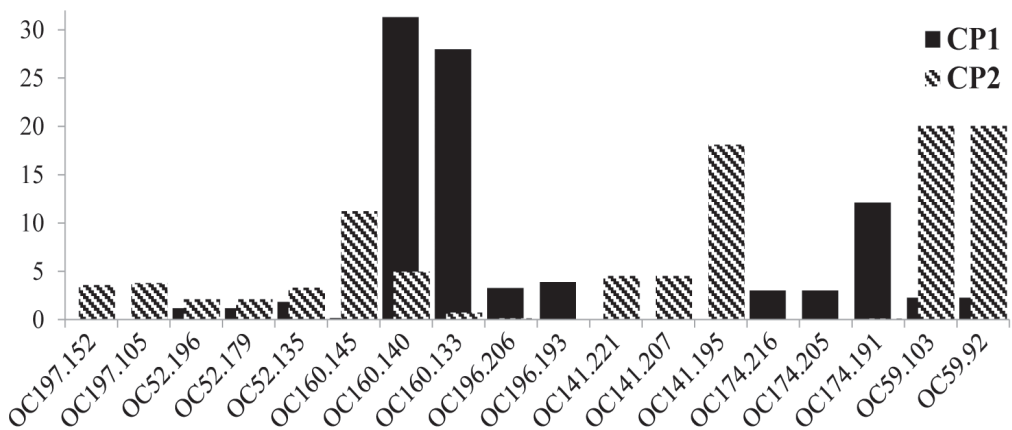
Trei loci (OC70, OC160, OC197) prezintă alele a căror variație în frecvență este explicată de ambele componente principale (tab. 3). Variantele alelice ale OC196, OC174 se regăsesc doar în CP1, iar cele ale locilor OC52, OC141 și OC59 se află în combinația liniară a CP2.

Ambele componente sunt relevante pentru prezentarea modelului de variație moleculară intra- și interpopulațională a indivizilor de *O. cumana*, întrucât au aproximativ aceeași pondere informațională 44 și respectiv 49%.

Valoarea medie a contribuției așteptate a unei variabile, calculată reieșind din numărul total de variabile este de 1,95% (fig. 3). Astfel, conform tabelului de date, generat de ACP, numărul alelelor care contribuie cu o valoare mai mare decât valoarea procentuală medie per total, în cadrul primei componente este 9, dintre care 3 prezintă contribuții relevante și pentru CP2. Din 12 variante alelice ale locilor studiați, cu contribuție mare în formarea CP2, doar 9 sunt exclusiv pentru aceasta.

În concluzie, alelele cu cele mai mari contribuții procentuale în caracterizarea varianței moleculare a populațiilor sunt:

- OC160.140 (31%), OC160.133 (28%), OC174.191 (12%), OC196.193 (4%), OC196.206 (3%), OC174.216 (3%) OC174.205 (3%) – CP1;
- OC59.103 (20%), OC59.92 (20%), OC141.195 (18%), OC160.145 (11%) OC141.221 (5%), OC141.207 (5%) OC197.152 (4%), OC197.105 (4%), OC52.135 (3%), OC52.196 (2%), OC52.179 (2%) – CP2.



**Figura 3. Contribuția procentuală a variantelor alelice în formarea componentelor principale.**

În baza informațiilor extrase din reprezentarea grafică a modelului de variație a observațiilor (indivizi, populații), a celor care indică contribuția variabilelor la construcția CP, a fost pus în evidență grupul de alele (și frecvența acestora, %), care caracterizează cel mai bine fiecare populație (fig. 4):

- SM: OC141.195 (73%), OC59.92 (50%), OC160.145 (40%), OC196.193 (50%), OC196.206 (50%), OC197.105 (25%), OC52.135 (25%), OC141.221 (33%), OC141.207 (33%), OC174.191 (100%);
- GuG: OC141.195 (68%), OC59.92 (50%), OC174.216 (21%), OC174.205 (21%), OC160.133 (45%);
- IGFPP: OC160.133 (50%), OC141.221 (33%), OC141.207 (33%), OC59.103 (30%), OC174.191 (79%);
- PoP: OC59.103 (48%), OC160.140 (85%), OC52.179 (20%) OC52.196 (20%), OC174.191 (100%), OC196.193 (51%), OC196.206 (49%), OC197.152 (24%).

Norul de puncte ce reprezintă indivizii din populația colectată de la Sărata-Mereșeni indică cel mai mic grad de variație intrapopulațională și cel mai mare nivel de diferențiere genetică față de celelalte 3 populații studiate.



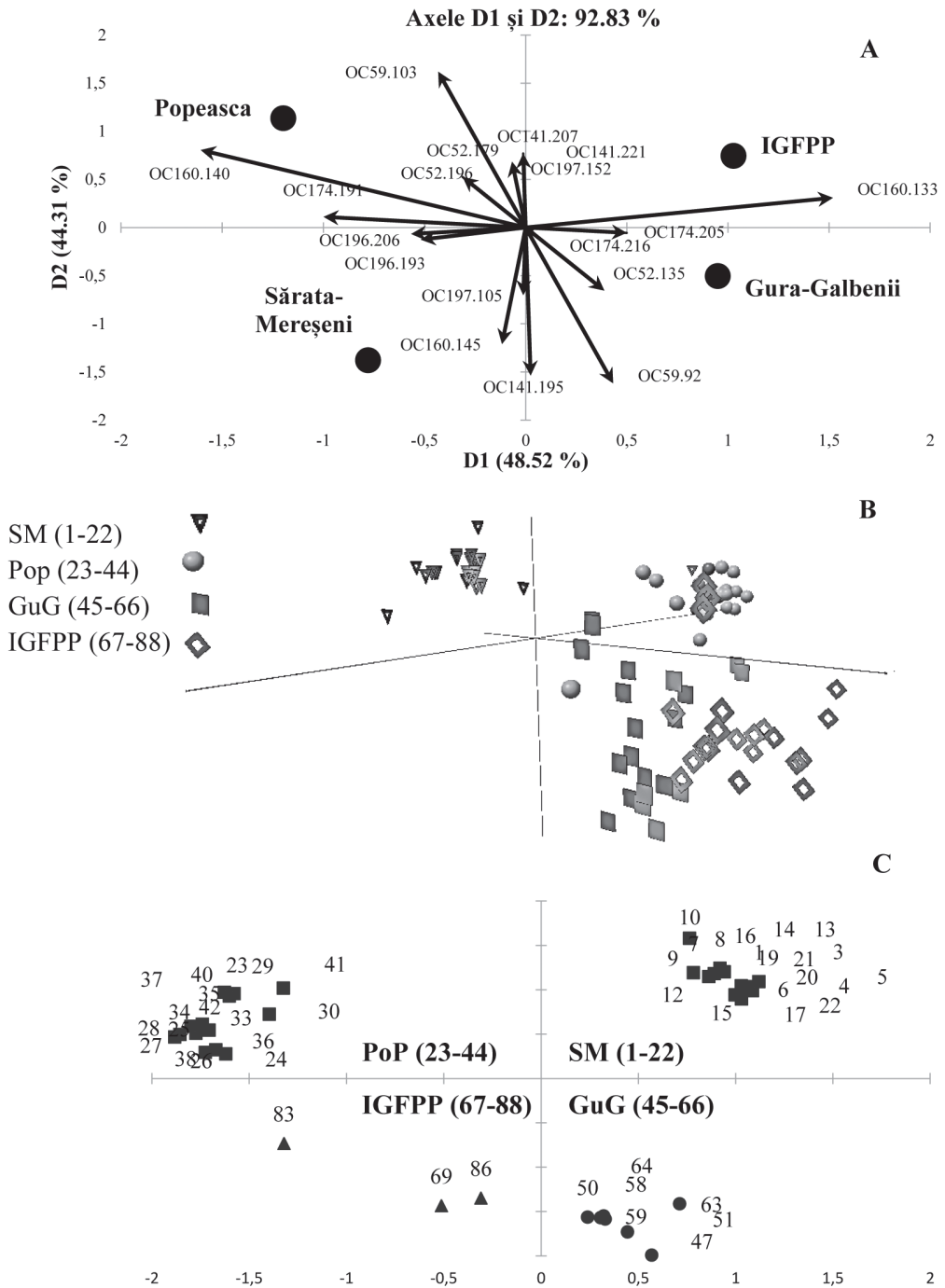
IGFPP și GuG, în modelul de structură genetică a populațiilor, sunt cele mai heterogene. Pentru a pune în evidență această constatare, au fost excluși din reprezentarea grafică (fig. 4) observațiile cu cele mai mici valori ale scorului factorial și al cosinusului. Astfel, din 22 de indivizi/populație se regăsesc în expunerea grafică 19 de la SM și 17 de la PoP, ceea ce denotă caracterul omogen al populației din care au fost extrași. Spre deosebire de aceste 2 populații, în cazul GuG și IGFPP se vizualizează doar 7 și respectiv 3 observații, celelalte fiind excluse, demonstrând lipsa unor diferențe genetice semnificative între aceste două populații, constatare relevantă și de coeficientul de diferențiere genetică ( $F_{ST}$ ).

În concluzie, reieșind din faptul că IGFPP și GuG prezintă intrapopulațional nivele înalte ale diversității genetice și conțin indivizi cu profil molecular și valori ale frecvenței alelice similare ambelor populații se poate afirma existența unui flux de gene între ele prin polenizare încrucișată și transport de semințe.

Deși tradițional *O. cumana* este considerată autogamă [30, 37], sunt dovezi care indică asupra unei rate de polenizare încrucișată în cadrul speciei de până la 30% (în condiții experimentale), fiind identificate unele insecte în calitate de agenți de polinizare [38]. De asemenea, este important de menționat că aceste 2 populații coexistă la distanțe mici una față de alta. Semințele minuscule în dimensiuni (250-380  $\mu\text{m}$  în lungime și 150-240  $\mu\text{m}$  în lățime) și cu greutatea de 1,0-2,5  $\mu\text{g}$  [11] sunt ușor răspândite prin intermediul apei, vântului, solului infectat cu semințe care pot avea viabilitatea de până la 20 de ani [20]. La scară largă, dispersia semințelor de *Orobancha cumana* este puternic influențată și antropogen, prin practici agricole și de cultivare, comerțul cu semințe de cultură contaminată, stocuri de semințe [47], care depășesc distanțele geografice, bariere în calea fluxului genic, fenomen caracteristic ecosistemelor naturale.

Sinteza analitică a informațiilor cu referire la structura genetică a populațiilor de *O. cumana* din diferite țări a relevat unele particularități similare cu datele discutate în lucrare. Astfel, în Spania a fost constatată prezența a două fonduri genetice distante de *O. cumana*, în regiunea de sud, Guadalquivir Valley și de centru, Cuenca, cu diversitatea intra- și interpopulațională generală joasă, atribuită „efectului de fondator” (*founder effect*) precum și existența unui număr mai mic de populații cu o înaltă variabilitate genetică rezultată din hibridări succesive a indivizilor care aparțin la aceste două fonduri genetic distincte [32, 37]. Ulterior, s-a concluzionat că apariția populațiilor polimorfe genetic (Ggv, FGv), care diferă de rasele G și F din țările Europei de est, a avut loc *in situ* prin mutații în cadrul celor existente, iar virulența sporită poate fi rezultatul recombinării genelor de avirulență, prezente în fondul genetic al populațiilor distante din Guadalquivir Valley și Cuenca [30].

Conform unui studiu publicat recent de Bilgen B. și colab. (2019) populațiile de *O. cumana* colectate din câmpuri agricole de floarea-soarelui din regiunea Thrace a Turciei [3] au prezentat o diversitate genetică intrapopulațională mai mare comparativ cu cea interpopulațională – 66% (AMOVA) și 34% respectiv. Similar, nivel înalt al diversității intrapopulaționale (78%) și un număr comparativ mare de heterozigoți a fost relevat în cazul populațiilor de *O. cumana* din Federația Rusă și Kazahstan, spre deosebire de cele prelevate din România, caracterizate prin grad scăzut de variabilitate și corelat cu deficit de heterozigoție [27].



**Figura 4. Prezentarea grafică a proiecției variabilelor (frecvența alelelor) și a indivizilor/populațiilor. Notă: A – reprezentarea grafică a variabilelor (frecvența alelelor) și a populațiilor.; B – vizualizare 3D pe primele trei axe generate de XLSTAT-3DPlot; C – prezentarea observațiilor (indivizilor) pe axele F1 și F2; SM (1-22), Pop (23-44), GuG (45-66), IGFP (67-88).**

Gruparea populațiilor din Federația Rusă și Kazahstan separat față de cele din România, indiferent de rasa patogenului, a determinat autorii să afirme că polimorfismul intrapopulațional are la bază diversitatea genetică și similaritatea soiurilor și hibridilor de floarea-soarelui cultivați în spațiul ex-sovietic.

Prezintă interes rezultatele unui studiu realizat în premieră în Bulgaria [36] pe plante de *O. cumana* care parazitează gazde din flora spontană și din culturile agricole. Autorii au constatat lipsa anumitor particularități în structura genetică a populațiilor determinate de gazdă, contrar așteptărilor, întrucât, la numeroase specii de fitoparazite autogame (*Orobanche minor* Sm., *Striga asiatica*, *S. gesnerioides*) specificul gazdei determină izolarea și ulterior apariția divergențelor genetice în populații [4, 5, 6, 43, 44, 45]. O concluzie importantă a acestor cercetări a fost că structura populațiilor sălbatice de *O. cumana* prezintă întregresiuni de la plantele ce infectează culturile agricole și invers. Astfel, diversitatea genetică înaltă a speciilor din ecosistemul natural poate favoriza evoluția raselor fiziologice cu capacități virulente superioare nivelului de rezistență a florii-soarelui.

Deși problematica originii, evoluției și dinamicii populațiilor de *O. cumana* este un subiect intens și îndelung dezbătut de comunitatea științifică internațională [8] obținerea rezultatelor convergente și conturarea unei imagini clare a procesului evolutiv întâmpină un șir de dificultăți, de exemplu, lipsa unor diferențiatori validați, a unei baze de date moleculare privind descrierea raselor, genotiparea cu diferiți markeri, obținerea generațiilor de descendenți etc.

În concluzie, populațiile de *O. cumana* din câmpurile de floarea-soarelui din R. Moldova, prezintă nivele înalte de diversitate și diferențiere genetică intra- și interpopulațională, constituind astfel un genofond favorabil apariției de noi rase fiziologice.

În prezent, gazdele cu rezistență genetică ameliorată sau indusă de factori abiotici sau biotici [25, 29] continue să rămână elementele de bază în controlul răspândirii holoparazitului. În această ordine de idei, este evidentă necesitatea de a identifica noi surse de rezistență la patogeni și sporirea variabilității germoplasmei autohtone a florii-soarelui, utilizată în calitate de material pentru ameliorare. De asemenea, informațiile cu privire la diversitatea alelică, structura genetică și statutul rasial al populațiilor de *O. cumana* locale prezintă interes științific pentru programele regionale/globale de cercetare consacrate răspândirii, evoluției și coexistenței acestui patogen în biotopul său natural sau agricol.

### Concluzii

1. Polimorfismul alelic pus în evidență cu 14 loci microsatețiți a diferențiat populațiile de *O. cumana* prin profil, număr și frecvența alelelor la același locus. Markerii OC52, OC174, OC59, OC196, OC197 s-au evidențiat în cadrul unei populații prin diverse profile mono, bi-, tri-, tetraalelice etc. Locii OC196, OC197 și OC52 sunt cei mai informativi pentru genotiparea populațiilor de *O. cumana*.

2. S-a constatat că în genomul indivizilor din populații majoritatea alelelor sunt frecvente (71 -76%), un procent relativ mare de alele sunt abundente (16-28%), iar cele rare sun puține (4-8%). În cazul populației SM nu s-au identificat alele cu frecvența <0,05. Alele cu cea mai mare frecvență (>0,5) pentru toate cele 4 populații sunt OC81.97, OC81.91, OC206.130, OC122.237, OC174.191, OC59.98.

3. Modelul generat de ACP a pus în evidență tendințele de covariație în frecvența a 32 din 51 de alele (14 loci SSR) și alelele cu cele mai mari contribuții procentuale în caracteristica populațiilor. Nu au fost identificate variante alelice specifice indivizilor doar unei populații.

4. Toate populațiile de *O. cumana* prezintă exces de heterozigoție, valori substanțiale fiind constatate la cele din localitatea Sărata-Mereșeni, Popeasca și Gura-Galbenii.

5. Populația colectată de la Sărata-Mereșeni prezintă cel mai mic grad de variație genetică la nivel intrapopulațional și cel mai mare la cel interpopulațional.

6. Între populațiile din municipiul Chișinău (IGFPP) și Gura-Galbenii (Hâncești) nu sunt diferențe genetice semnificative, intrapopulațional sunt heterogene, indivizii prezentând profile caracteristice ambelor fonduri de gene.

**Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului instituțional 15.817.05.03F „Rezistența florii-soarelei (*Helianthus annuus* L.) la lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice”.**

**Autorii sunt recunoscători colaboratorilor Centrului Genetică Funcțională a USDC, dnei dr. Bivol I. și dr. Tabără O. pentru implicare în izolarea ADN-ului și genotiparea plantelor de *O. cumana*.**

### Bibliografie

1. Bardakci F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Turk J Biol, 2001, vol. 25, p. 185-196.
2. Benzécri J. P. Correspondence Analysis Handbook. New-York: Dekker, 1992, vol. 125, 688 p.
3. Bilgen B. B., K. Barut A., Demirbaş S. Genetic characterization of *Orobanche cumana* populations from the Thrace region of Turkey using microsatellite markers. Turk J Bot. 2019, vol. 43, p. 38-47.
4. Botanga C. J., Kling G. J. et al. Genetic variability of *Striga asiatica* (L.) Kuntz based on AFLP analysis and host-parasite interaction. Euphytica, 2002, vol. 128, no. 3, p. 375-388.
5. Botanga C. J., Timko M. P. Genetic structure and analysis of host and nonhost interactions of *Striga gesnerioides* (Witch-weed) from Central Florida. Phytopathology, 2005, vol. 95, no. 10, p. 1166-1173.
6. Botanga C. J., Timko M. P. Phenetic relationships among different races of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke from West Africa. Genome, 2006, vol. 49, no. 11, p. 1351-1365.
7. Botstein D., White R. L. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980, vol. 32(3), p. 314-331.
8. Calderón-González A., Pouilly N. et al. An SSR-SNP Linkage map of the parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr. including a gene for plant pigmentation. Frontiers in Plant Science, 2019, vol. 10(797), p. 1-10.
9. Cole, C. T. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*). New Phytologist. 2005, vol. 167(1), p. 155-164.
10. De Vicente M. C., Lopez C., Fulton T. Genetic diversity analysis with molecular marker data: Learning module. Measures of genetic diversity. IPGRI and Cornell University, 2003. Vol. 2, 71 p.
11. Duca M., Boicu A. Morphological diversity of seeds in *O. cumana* accessions from Republic of Moldova. Helia, 2017, vol. 40(67), p. 161-175.
12. Duca M., Glijin A. et al. Identification of RAPD markers associated with sunflower resistance to *Orobanche cumana* Wallr. Conservation of plant diversity. Ediția 3-a, 22-24 mai 2014, Chișinău: Grădina Botanică (Institut), 2014, p. 87-88.

13. Duca M., Glijin A. et al. Screening-ul molecular al rezistenței florii-soarelui la lupoaie (*O. cumana* Wallr.) rasa E. Buletinul AȘM, Științele vieții, 2009, nr. 3, vol. 309, p. 81-88.
14. Duca M., Glijin A., Acciu A. The biological cycle of sunflower broomrape. J. of Plant Development. 2013, vol. 20, p. 71-78.
15. Duca M., Glijin A., Popescu V. Identificarea gradului de rezistența la lupoaie (rasa E) in cadrul unor genotipuri de floarea-soarelui. Studia Universitatis, Natural Sciences, 2008, vol. 2, nr. 12, p. 5-10.
16. Duca M., Port A. et al. Afinitatea și unele particularități fiziologice ale diferitor rase de lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.). Știința Agricolă, 2016, nr. 2, p. 41-46.
17. Duca M., Port A. et al. Molecular characterization of broomrape populations from Republic of Moldova using SSR markers. Helia, 2017, nr. 40(66), p. 47-59.
18. Fernández-Martínez J. M., Pérez-Vich B., Velasco L. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). Sunflower oilseed. Chemistry, Production, Processing and Utilization, eds E. Martínez-Force, N. T. Dunford, and J. J. Salas, Champaign, IL: AOCSS Press), 2015, p. 129-156.
19. Fernández-Martínez J. M., Velasco L., Pérez-Vich B. Progress in research on breeding for resistance to broomrape. Helia, 2012, vol. 35, Nr. 57, p. 47-56.
20. Gevezova M., Dekalska T. et al. Recent advances in broomrapes research. Journal of Biosciences and Biotechnology, 2012, vol. 1, p. 91-105.
21. Gisca I., Acciu A. et al.. Highly virulent races of sunflower broomrape in the Republic of Moldova, Current Opinion in Biotechnology. 2013, vol. 24(1), p. 132.
22. Giscă I. Influența lupoaiei asupra cantității și calității uleiului de floarea-soarelui. Revista Știința Agricolă, 2017, nr. 2, p. 16-22.
23. Giscă I. Studii privind ereditatea rezistenței florii-soarelui la lupoaie. Buletinul AȘM. Științele Vieții, 2017, Nr. 3 (333), p. 121-126.
24. Glijin A. Interacțiunea dintre *O. cumana* Walr. și *Helianthus annuus* L. la nivelul sistemului radicular. Mediul ambiant, 2009, nr. 5, vol. 47, p.31-36.
25. Gonsior G., Buschmann H. et al. Induced resistance – an innovative approach to manage branched broomrape (*Orobanche ramosa*) in hemp and tobacco. Weed Sci., 2004, vol. 52, p. 1050-1053.
26. Gonzalez-Quevedo C. et al. Drift, not selection, shapes toll-like receptor variation among oceanic island populations. Molecular Ecology, 2015, vol. 24, p. 5852-5863.
27. Guchetl S., Antonova T. S., Tchelustnikova T. Interpopulation genetic differentiation *Orobanche cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania using molecular genetic markers. Helia. 2014, vol. 37(61), p. 181-191.  
<http://www.asagir.org.ar/asagir2008/buscar congreso.asp>
28. Jolliffe I. T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. Phil. Trans. R. Soc. 2016, p. 1-16.
29. Kusumoto D., Goldwasser Y. et al. Resistance of red clover (*Trifolium pratense*) to the root parasitic plant *Orobanche minor* is activated by salicylate but not by jasmonate. Ann. Bot., 2007, vol. 100, p. 537-544.
30. Martín-Sanz A., Malek J. et al. Increased virulence in sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity. Frontiers in Plant Science. 2016, vol. 7, p. 1-9.
31. Mason A. S. SSR Genotyping. Batley J. (ed) Plant Genotyping. New York: Springer, NY. 2015, p. 77-89.
32. Molinero-Ruiz L., García-Carneros A. B. et al. Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe. Weed Research. 2013, vol. 54, p. 87-96.

33. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980, vol. 8, nr. 19, p. 4321-4325.
34. Nei M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1973, vol. 70, no. 12, part I, p. 3321-3323.
35. 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.
36. Pineda-Martos R., Pujadas-Salvà A. J. et al. The genetic structure of wild *Orobanchaceae* populations in Eastern Bulgaria reflects introgressions from weedy populations. *The Scientific World Journal.* 2014, p. 1-15.
37. Pineda-Martos R., Velasco L. et al. Genetic diversity of sunflower broomrape (*Orobanchaceae*) populations from Spain assessed using SSR markers. *Weed Research.* 2013, vol. 53, p. 279-289.
38. Pineda-Martos R., Velasco L., Pérez-Vich B. Identification, characterization, and discriminatory power of microsatellite markers in the parasitic weed *Orobanchaceae*. *Weed Res.* 54, 2014, 120-132.
39. Rotarenco V. Aspecte morfo-fiziologice și genetice de interacțiune gazdă-parazit (*Helianthus annuus* L.-*O. cumana* Wallr.). Autoref. tezei de dr. șt. biol. Chișinău, 2010. 26 p.
40. Sambrook, J., Russell, D. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.: New York, vol. I-III, 2001, 1885 p.
41. Škorić D., Păcureanu-Joița M., Sava E. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanchaceae*). *Genetica și ameliorarea plantelor an. I.N.C.D.A. Fundulea LXXVIII(1)*, 2010, p. 63-79.
42. Tabără O., Nechișor V., Port A. Expresia genelor *GSL1-4* în rădăcinile de floarea-soarelui infectată cu lupoaie. *Buletinul AȘM. Științele Vieții.* 2017, vol. 2(332), p. 85-93.
43. Thorogood C. J., Rumsey F. J. et al. Gene flow between alien and native races of the holoparasitic angiosperm *Orobanchaceae*. *Plant Systematics and Evolution*, 2009, vol. 282, no. 1-2, p. 31-42.
44. Thorogood C. J., Rumsey F. J. et al. Host-driven divergence in the parasitic plant *Orobanchaceae*. *Molecular Ecology*, 2008, vol. 17, no. 19, p. 4289-4303.
45. Thorogood C. J., Rumsey F. J., Hiscock S. J. Host-specific races in the holoparasitic angiosperm *Orobanchaceae*: implications for speciation in parasitic plants. *Annals of Botany*, 2009, vol. 103, no. 7, p. 1005-1014.
46. Tiwari K. L., Jadhav S. K., Kumar A. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker based genetic relationship study of medicinal plants collected from tribal region of Chhattisgarh. India. *Research Journal of Biotechnology*, 2011, vol. 6(3), p.63-66.
47. Ungurean L. Recherches sur le tégument séminal dans le cadre des espèces de la section *Trionychon* Wallr. du genre *Orobanchaceae*. *Reviews Roumaine Biology, Biologic Vég.*, 1986, vol. 31, p. 121-125.
48. Velasco L., Pérez-Vich B., Fernandez-Martinez J. M. Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids.* 2016, vol. 23(2), p. 1-8.
49. Vieira M. L. C., Santini L. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology.* 2016, vol. 39(3), p. 312-328.
50. <https://www.khanacademy.org/science/biology/her/heredity-and-genetics/a/allele-frequency-the-gene-pool>.