

CZU: 581.169:582.952.6

GENOTIPAREA POPULAȚIILOR DE *OROBANCHE CUMANA* Wallr. CU MARCHERI MICROSATELIȚI SSR

Maria DUCA, Ana MUTU, Steliana CLAPCO

Universitatea de Stat din Moldova

Lucrarea a vizat evaluarea diversității genetice în cadrul a 33 de populații de lupoai (*Orobanche cumana* Wallr.) cu origine geografică diferită, prin genotiparea cu 14 marcheri microsateliți SSR. Majoritatea marcherilor (Ocum-052, Ocum-059, Ocum-070, Ocum-081, Ocum-087, Ocum-160, Ocum-196 și Ocum-197) au pus în evidență o diversitate accentuată atât la nivel inter-, intrapopulațional, cât și regional. În cadrul populațiilor de lupoai investigate a fost relevată prezența a 153 de profile molecular-genetice și a 98 de alele. Lungimea secvențelor nucleotidice SSR amplificate a variat de la 76 la 343 pb. Populațiile de lupoai din Taraclia, Svetlii, Izbiste, Căzănești, Prepelita, Congaz (Republica Moldova), Radnevo, Rosenova (Bulgaria), Hohott (China), Keșan, Merkez, Tracia (Turcia) și OR-SR43 (Serbia) s-au remarcat printr-un nivel ridicat de variabilitate genetică intrapopulațională. Populațiile provenite din Bulgaria și Serbia, după numărul de profile moleculare (1-3) și media numărului total de alele (3,67 – Bulgaria; 3,63 – Serbia) s-au dovedit a fi relativ mai omogene comparativ cu cele colectate din Republica Moldova (1-10 profile; media – 3,82), Turcia (1-6 profile; media – 4,02) și China (1-9 profile; media – 4,72).

Cuvinte-cheie: *Orobanche cumana* Wallr., populație, marcheri SSR, alelă, diversitate genetică, profil genetic.

GENOTYPING OF *OROBANCHE CUMANA* WALLR. POPULATIONS WITH SSR MICROSATELLITE MARKERS

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of 33 *Orobanche cumana* Wallr. populations with different geographical origin using 14 SSR microsatellite markers. The most of the markers (Ocum-052, Ocum-059, Ocum-070, Ocum-081, Ocum-087, Ocum-160, Ocum-196 and Ocum-197) a hight genetic diversity at the inter- and intra-population level, as well as regionally, have been highlighted. Within the broomrape populations investigated, the presence of 153 molecular-genetic profiles and 98 alleles was revealed. The length of the amplified SSR nucleotide sequences ranged from 76 to 343 bp. A high intrapopulation genetic variability for the populations from Taraclia, Svetlii, Izbiste, Cazanesti, Prepelita, Congaz (Republic of Moldova), Radnevo, Rosenova (Bulgaria), Hohott (China), Kesan, Merkez, Thrace (Turkey) and OR-SR43 (Serbia) was found. The populations of *O. cumana* from Bulgaria and Serbia proved to be relatively more homogeneous, according to the number of molecular profiles (1-3) and the average number of total alleles (3.67 – Bulgaria; 3.63 – Serbia), compared to those collected from the Republic of Moldova (1-10; 3.82, respectively), Turkey (1-6; 4.02, respectively) and China (1-9; 4.72, respectively).

Keywords: *Orobanche cumana* Wallr., population, SSR markers, allele, genetic diversity, genetic fingerprint.

Introducere

Specia fitoparazită *Orobanche cumana* Wallr. este o angiospermă răspândită în culturile de floarea-soarelui, care în ultimii 25-30 de ani reprezintă cauza majoră în reducerea semnificativă a recoltei în Rusia, Ucraina, Republica Moldova, România, Bulgaria, Spania, Turcia etc. [1-3].

Pentru prima dată lupoai a fost atestată în regiunea Saratov din Rusia [4]. Ulterior, această plantă-parazit a fost observată în multe țări din bazinul Mării Negre, inclusiv în Bulgaria [5], România [6], Turcia [7], Republica Moldova [8], Ucraina [9], Serbia [10]. În ultima perioadă, există studii care descriu apariția și distribuția lupoai pe teritoriul Chinei [11], Franței [12], Spaniei [13], Tunisiei [14], Marocului [15] etc.

Expansiunea rapidă și extinderea arealului de atac al lupoai, precum și apariția mai multor rase fiziologice cu virulență sporită în procesul de evoluție reprezintă un impediment în elaborarea strategiilor durabile de ameliorare a florii-soarelui la rezistența față de *O. cumana*.

Cunoașterea nivelului de variabilitate genetică și a mecanismelor de virulență reprezintă aspecte importante care pot aduce un aport în dezvoltarea unor metodologii de control și îmbunătățire a rezistenței plantei-gazdă față de parazit, iar evaluarea variabilității și a relațiilor dintre indivizii diferitor populații poate contribui la caracterizarea structurii genetice a populațiilor, elucidarea particularităților evolutive și funcționale ale patosistemului etc. Toate aceste cunoștințe ar permite eficientizarea procesului complex de creare a hibridilor rezistenți.

O metodă eficientă în genetica moleculară, care este aplicată pe scară largă în studiile de variabilitate genetică, reprezintă tehnica PCR cu markeri specifici (*Simple Sequence Repeats* – SSR). Secvențele SSR sunt mai informative comparativ cu alți markeri, fiind de natură co-dominantă, reproductibile experimental, multialelice (prezența mai multor alele la un anumit locus SSR) și pot fi utilizate în cazul speciilor înrudite sau permit diferențierea speciilor/formelor sălbatice [16].

Studiile moleculare cu privire la diversitatea genetică populațională la lupoae au fost rare, intensificându-se începând cu anii '90 cu utilizarea diferitor markeri moleculari arbitrari, dominanți RAPD [17,18], AFLP [19], ISSR [20]. În ultima perioadă, în cadrul unor asemenea studii, datorită caracteristicilor semnificative și avantajelor specifice, tot mai frecvent se aplică markerii microsateliți SSR [2,13,21,22].

Pentru a determina diversitatea genotipică în cadrul speciei *Orobancha cumana* Wallr., în studiul de față ne-am propus să analizăm, în baza markerilor microsateliți SSR, 33 de populații de lupoae care au o origine geografică diferită.

Material și metode

În calitate de **material biologic** au fost utilizate semințele a 33 de populații de *Orobancha cumana* Wallr. colectate în perioada anilor 2018-2019 de pe diferite câmpuri de floarea-soarelui din Republica Moldova (Izbiște, Svetlii, Taraclia, Soroca, Cahul, Bălți câmp I și II, Prepeștii, Grigorievca, Popeasca, Chișinău, Căzănești, Congaz), Bulgaria (Debovo, Silanovici, Radnevo, Rosenova), Turcia (regiunea Tracia; provincia Adana; provincia Edirne, districtele Keşan și Merkez; provincia Kırklareli, districtul Lüleburgaz), România (Brăila), Serbia (notate convențional: OR-SR04, OR-SR07, OR-SR11, OR-SR14, OR-SR25, OR-SR26, OR-SR43) și China (Hohhot, Bayanuur, HeBei). Acestea au fost utilizate în experimentele fiziologice efectuate în condiții model de seră, de unde și s-au prelevat lăstari aerieni, până la înflorire, pentru analizele moleculare. Probele colectate (de la 8 până la 11 indivizi din fiecare populație) au fost păstrate la -80°C până la extragerea ulterioară a ADN-ului.

Extragerea ADN-ului genomic s-a realizat cu kitul *GeneJET Plant Genomic DNA Purification* (#K0791) în conformitate cu instrucțiunile producătorului (*Thermo Scientific*). Cuantificarea cantitativă a ADN-ului s-a determinat spectrofotometric (T60 UV-VIS), iar cea calitativă – prin electroforeză în gel de agaroză de 1% [23].

Genotiparea SSR. Genotiparea s-a realizat cu 14 primeri SSR elaborați de R.Pineda-Martos et al. [21] (Tab.1). Mediul reacției de amplificare (15 μl) a inclus: 60 ng ADN, 1 U/μl *DreamTaq Green* ADN Polimerază în soluție tampon (1x) (*Thermo Scientific*), 200 μM dNTP, 2,5 mM MgCl₂ (*Thermo Scientific*) și 0,4 μM primeri SSR. Programul de amplificare la PCR Veriti (*Applied Biosystem*) a fost: 95°C – 3 minute; 35 de cicluri: 95°C – 30 de secunde, 57°C – 45 de secunde, 72°C – 1 minut; 72°C – 5 minute. Separarea ampliconilor s-a realizat în gel de poliacrilamidă de 8%, în tampon TBE (1x), la intensitatea de 230 V (cameră de electroforeză verticală, Consort, Belgia) și cu markerul *GeneRuler Low Range DNA Ladder* (SM1191, *Thermo Scientific*). Gelurile, după imersia în bromură de etidiu (0,05 μg/ml), au fost vizualizate la transiluminatorul UVITEC Cambridge (Franța) conectat la sistemul de fotodocumentare DOC-PRINT-VX2 (model SXT-F20.M, Franța) și ulterior analizate prin Photo-Capt (versiunea 15.02) și Microsoft Excel 2019.

Tabelul 1

Lista markerilor microsateliți SSR utilizați în genotiparea *O. cumana*

Nr. crt.	Marker	Succesiunea nucleotidică		Nr. bazelor azotate
		Sens: 5' → 3'	Antisens: 3' → 5'	
1.	Ocum-052	catgtctaagctttggctcg	caagacttgaacaagcaaatc	21/22
2.	Ocum-059	tcttgattgtatatgtctgatgcaat	catgctacaatagaaatacacaacgaa	27/27
3.	Ocum-070	aagctgtaacaatgcctgaa	cctcctccagtaccactaggc	21/21
4.	Ocum-074	cctaaaattgaaaccttaaggaaa	actttccgtgagacggagtc	24/20
5.	Ocum-075	tgtggatagagtataagctaccagttc	ttcccgtagcttggaagt	27/20
6.	Ocum-081	ttacaaggtgaaaccaccca	cagctactgtccgcaagaaa	20/20
7.	Ocum-087	ttctcgacagctttgggtaaa	atgccaaactcgagtgtcc	21/20
8.	Ocum-122	ggaatacatcattaaagtagttgtccg	gaaggagtcattaaactccgtga	27/23
9.	Ocum-141	cagcaactgtttctccatagag	tccaagaagaggaaaagaagtga	23/23
10.	Ocum-160	tgagggtttgtaagtgggc	cgtaccttaccctccgtca	20/20
11.	Ocum-174	caaccaacaacaagtagtgacg	tcttgcggcaaaaccatt	23/18
12.	Ocum-196	gtatgtgcgcccgtcttg	ggggatgactgtgtttcgat	18/20
13.	Ocum-197	agagacggcatcatcaatca	gtgatcgtgcaggcaccta	20/19
14.	Ocum-206	ccgattgctgtttatgtgtatt	tgtaggagatgccagttca	23/20

Rezultate și discuții

Genotiparea celor 33 de populații de *O. cumana* cu 14 marcheri microsateliți a diferențiat populațiile după lungimea fragmentelor **(i)**, diversitatea profilelor moleculare **(ii)** și numărul fragmentelor amplificate **(iii)**, confirmând în mare parte studiile realizate anterior [21,22]. Excepție a prezentat markerul Ocum-122, care în cadrul actualului studiu s-a caracterizat prin prezența unui singur profil monoalelic de 244 pb la toate populațiile investigate, deși la diferite populații de lupoaie din Spania [21] și din Republica Moldova [22] acest primer a scos în evidență profile polimorfe. Din aceste considerente am catalogat acest primer ca fiind unul monomorf și l-am exclus din analizele ulterioare.

(i). Analiza spectrelor electroforetice obținute, prin prisma *valorilor minime/maxime ale maselor moleculare* pentru cele 4214 de profile genetice analizate, demonstrează o diversitate genetică sporită, **lungimea fragmentelor** variind în funcție de markerul utilizat, genotip, populație și regiune (Tab.2).

Tabelul 2

**Intervalul de amplificare și dimensiunea fragmentelor SSR
obținute la genotiparea populațiilor de *O. cumana***

Marker	Interval lungimea alelelor, perechi de baze (pb)						Interval/ marker
	Republica Moldova	Bulgaria	România	Turcia	China	Serbia	
Ocum-052	111-192	130-168	130-168	111-192	111-192	130-178	111-192
Ocum-059	90-124	90-101	90-124	90-136	90-95	85-136	85-136
Ocum-070	100-126	106-126	106-126	106-126	106-145	100-126	100-145
Ocum-074	101-146	101-146	101-146	101-146	119-146	101-114	101-146
Ocum-075	106-147	106-147	106-135	98-135	98-147	98-135	98-147
Ocum-081	76-110	81-121	90-95	76-131	76-131	90-110	76-131
Ocum-087	109-144	109-200	109-184	109-200	109-144	109-151	109-200
Ocum-141	192-226	192-226	192-226	192-226	192-226	192-226	192-226
Ocum-160	134-177	134-177	134-177	134-177	128-177	134-145	128-177
Ocum-174	190-211	190-211	190-211	190-211	190-211	190-211	190-211
Ocum-196	187-343	187-343	196-343	187-343	187-343	196-343	187-343
Ocum-197	96-154	96-147	96-137	96-154	108-190	96-173	96-190
Ocum-206	124-131	124-131	124-131	124-131	118-164	118-131	118-164
Interval/țară	76-343	81-343	76-343	76-343	76-343	85-343	76-343

Sistemul de marcheri microsateliți a evidențiat un interval larg de amplificare (76-343 pb), care variază moderat la nivelul diferitor țări de origine a lupoaiei și considerabil – în dependență de markerul utilizat. Astfel, cel mai mic interval de valori ale lungimii secvențelor nucleotidice a fost constatat la Ocum-174 (190-211 pb), iar cel mai mare la Ocum-196 (187-343 pb). Un nivel înalt de uniformitate în cazul tuturor țărilor în care s-au făcut investigații au prezentat markerii Ocum-141 (192-226 pb) și Ocum-174 (190-211pb). Primerii Ocum-059, Ocum-081 și Ocum-197 sunt cei care au diferențiat cel mai bine populațiile după intervalul de lungime al ampliconilor, identificând diverse valori minime și maxime pentru majoritatea regiunilor studiate.

Cele mai multe profile comune între diferite țări s-au înregistrat la populațiile de lupoaie din bazinul Mării Negre, inclusiv pentru Republica Moldova și Turcia (12 din 13 marcheri), pentru Bulgaria (10 din 13 marcheri) și pentru România (9 din 13 marcheri). Populațiile de lupoaie din China au prezentat ampliconi de aceeași dimensiune cu a celor din alte țări doar în cazul a 6 din 13 primeri analizați. Totodată, au fost stabilite particularități specifice dintre populații din China și Republica Moldova (Ocum-087), China și Turcia (Ocum-081). Populațiile din Serbia au manifestat în mare parte particularități specifice de amplificare cu markerii SSR, fiind relevate intervale comune de lungime a fragmentelor doar în cazul Ocum-070 (cu populațiile din Republica Moldova), Ocum-075 (cu cele din Turcia) și Ocum-196 (cu cele din România).

Generalizând rezultatele analizei ampliconilor după acest indice am constatat că 54 din 66 de variante de studiu au elucidat secvențe moleculare cu interval de amplificare comune (34 de variante – diapazoane comune pentru populațiile din 3-4 țări, 20 de cazuri comune pentru populațiile din 2 țări) și 12 variante – specifice.

Aceste constatări în mare parte se confirmă și la nivel *interpopulațional*. Markerul Ocum-141 a determinat amplificarea fragmentelor cu aceleași limite de masă moleculară la toate cele 33 de populații. Markerul

Ocum-174, cu același interval al dimensiunii fragmentelor obținute pentru majoritatea populațiilor (190-211 pb), a relevat 4 cazuri diferite generând un amplicon de 190 pb pentru populațiile: Keșan din Turcia, OR-SR43 din Serbia, Grigorievca și Popeasca din Republica Moldova. Analiza acestor date a relevat un nivel înalt de omogenitate a intervalului de amplificare și la primerul Ocum-206 (124-131 pb), cu excepția populațiilor din China (118-164 pb) și a populațiilor OR-SR25 (118-124 pb), OR-SR25 (118-131 pb) din Serbia. Astfel, doar primerul Ocum-141 a manifestat 100% uniformitate la nivel de interval minim/maxim al dimensiunii fragmentelor amplificate.

Analizând individual populațiile incluse în studiu, s-au identificat rezultate similare pentru populațiile din China (Ocum-059, Ocum-074, Ocum-087), Turcia (Ocum-070, Ocum-075, Ocum-196) și Bulgaria (Ocum-052, Ocum-070, Ocum-075). Populațiile din Serbia au prezentat același diapazon de dimensiune a ampliconilor SSR pentru 4 marcheri (Ocum-052, Ocum-075, Ocum-081, Ocum-196), iar cele din Republica Moldova – pentru 2 (Ocum-075, Ocum-087). Markerul Ocum-075 relevă aceleași intervale de lungime a fragmentelor SSR între populațiile din Republica Moldova și Bulgaria (106-147 pb), din Turcia și Serbia (98-135 pb), Ocum-052 – la cele din Bulgaria și Serbia (130-178 pb), Ocum-087 – din Republica Moldova și China (109-144 pb) iar Ocum-196 – din Turcia și Serbia (196-343 pb). În baza valorilor minime/maxime ale lungimii fragmentelor SSR obținute, doar Ocum-160 și Ocum-197 au prezentat cea mai mare diversitate la nivel interpopulațional, generând diferiți ampliconi cu diapazoane de amplificare variate.

Astfel, din cele 429 de variante de analiză la nivel *interpopulațional/regional* au fost constatate intervale identice de lungimi ale fragmentelor (populațiile din Bulgaria în cazul a 6 marcheri, din China – 5, din Serbia – 5, din Turcia – 4, din Republica Moldova – 4), precum și variabilitate interpopulațională și particularități specifice de amplificare a secvențelor microsatelite (61 de diapazoane specifice pentru populație/țară sau 14% din totalul de cazuri analizate). Primerii Ocum-081 (13 variante de analiză), Ocum-197 (11) și Ocum-160 (10) au identificat cele mai multe cazuri și au generat ampliconi cu mase moleculare diferite și unice pentru populație sau țară.

Analiza rezultatelor la nivel *intrapopulațional* a pus în evidență diversitatea individuală în cadrul populațiilor de *O. cumana* care au identificat o gamă largă de ampliconi cu diferite mase moleculare în dependență de marcher și originea geografică. Pentru majoritatea populațiilor, indivizii au evidențiat o uniformitate a intervalului minim/maxim de dimensiune a fragmentelor SSR în cazul a 3 primeri (Ocum-075, Ocum-174, Ocum-206). Ocum-075 a determinat amplificarea fragmentelor de aceeași masă moleculară (interval-limite) la indivizii din cadrul a 32 de populații individuale, excepție fiind indivizii din China, regiunea HeBei, care au prezentat o diversitate a diapazonului de lungimi. Marcherii Ocum-206 și Ocum-174 au relevat omogenitate între indivizii din cadrul a 29 și, respectiv, 25 de populații. În același timp, acești primeri au identificat o varietate între indivizii de lupoaie la 3 populații din China, la 3 din Turcia, la 2 din Bulgaria și la câte una din Republica Moldova, România și Serbia. Marcherii Ocum-059 (27 de populații), Ocum-197 (24), Ocum-160, Ocum-196 (23), Ocum-070 (22) și Ocum-087 (19) au evidențiat o diversitate pronunțată intrapopulațională a diapazonului masei moleculare pentru majoritatea populațiilor de lupoaie.

Populațiile de lupoaie colectate din Popeasca (Republica Moldova), Luleburgaz (Turcia), OR-SR11 și OR-SR25 (Serbia) au prezentat cel mai înalt nivel de omogenitate pentru 11 din 13 marcheri utilizați în studiu. Un grad ridicat de uniformitate genetică a indivizilor a fost identificat și la populațiile de lupoaie din Debovo (Bulgaria), Cahul (Republica Moldova) și OR-SR04, OR-SR07, OR-SR26, OR-SR43 (Serbia) în cazul a 8-10 marcheri.

(ii). Analiza amprentelor moleculare generate de 13 marcheri microsateliți pentru cele 33 de populații investigate a permis identificarea a 153 de **profile moleculare** diferite: mono-, bi-, tri-, tetraalelice etc. (Tab.3).

Markerul Ocum-174 s-a caracterizat prin cele mai puține profile moleculare (2) – un profil de bază trialelic și unul monoalelic. Per total, markerul Ocum-075 a înregistrat 4 profile, tetra-, penta- și hexaalelice. Însă la nivel intrapopulațional acest marcher preponderent a pus în evidență prezența unui singur profil genetic. Ocum-206 se remarcă printr-un profil de bază bialelic în cazul tuturor populațiilor, cu excepția celor din China și Serbia, care au evidențiat 5, respectiv 3 profile moleculare SSR. Cele mai multe și mai diverse profile moleculare au generat primerii Ocum-197 (23 de profile), Ocum-059 (21 de profile) și Ocum-196 (20 de profile). Ocum-059 a generat 12 profile moleculare pentru populațiile din Serbia, iar Ocum-196 (9) pentru cele din Bulgaria, diferențiindu-le de restul populațiilor cu diferită origine geografică. După numărul și tipul profilelor generate de un marcher, populațiile provenite din Bulgaria, România și Serbia sunt relativ mai omogene (1-3

profile pentru majoritatea markerilor) comparativ cu cele colectate din localitățile Republicii Moldova (1-10), Turciei (1-6) și Chinei (1-9).

Markerii Ocum-075, Ocum-141, Ocum-174 și Ocum-206 au evidențiat o diversitate inter- și intrapopulațională scăzută/moderată și cele mai puține profile moleculare pentru toate cele 33 de populații incluse în studiu. Ocum-075 a generat doar un singur profil molecular la toate populațiile (intrapopulațional), care însă diferă între populațiile regiunilor studiate (regional). Acest primer a pus în evidență 2 profile genetice diferite doar la populația HeBei (China). Ocum-206 a generat un profil bialelic pentru indivizii din cadrul fiecărei populații, excepție fiind populațiile din Serbia cu 3 profile și din China cu 5 profile. Astfel, populația OR-SR43 din Serbia se remarcă cu 2 profile, iar populațiile de lupoae din Bayanuur și Hohott (China) cu câte 3 profile diferite fiecare. Markerul Ocum-174 relevă prezența a două profile moleculare în cadrul populațiilor de lupoae luate în studiu (Tab.3).

Tabelul 3

Diversitatea profilelor moleculare SSR în cadrul populațiilor de *O. cumana*

Markeri	Numărul de profile/ țări						Total/ marker
	Republica Moldova	Bulgaria	România	Turcia	China	Serbia	
Ocum-052	10	1	1	4	4	1	14
Ocum-059	5	4	3	5	1	12	21
Ocum-070	7	2	2	3	3	4	11
Ocum-074	7	3	2	5	1	2	8
Ocum-075	1	1	1	1	2	1	4
Ocum-081	3	3	1	6	3	1	13
Ocum-087	4	2	4	5	1	2	12
Ocum-141	3	2	2	2	2	3	6
Ocum-160	8	3	3	3	9	2	12
Ocum-174	2	2	1	2	2	2	2
Ocum-196	9	9	3	2	5	1	20
Ocum-197	10	4	4	6	7	4	23
Ocum-206	1	1	1	1	5	3	7
Total	70	37	28	45	45	38	153

Analiza amprentelor moleculare individuale, pentru Ocum-174, a prezentat un singur profil de bază (trialelic) caracteristic pentru majoritatea populațiilor, cu unele particularități specifice în cazul populațiilor din Chișinău, Rosenova, Radnevo, Adana, Luleburgaz, Bayanuur și OR-SR14 din Serbia, cu câte 2 profile moleculare. Markerul Ocum-141 a evidențiat o varietate moderată a profilelor moleculare SSR, identificând câte un singur profil trialelic în cadrul a 20 de populații, în timp ce celelate 13 populații s-au caracterizat printr-o diversitate de 2-3 profile electroforetice.

Populațiile de lupoae din Popeasca (1-2 profile/primer; 15 profile în total), Debovo (1-2 profile/ primer; 16 profile în total), Luleburgaz (1-3 profile/primer; 17 profile în total) au prezentat cele mai puține profile pentru toți cei 13 primeri, fiind caracterizate ca cele mai omogene populații. Populațiile colectate din Taraclia, Svetlii și Congaz din Republica Moldova s-au remarcat prin cel mai mare număr și diversitate pronunțată a profilelor electroforetice SSR cu un total de 30 de spectre moleculare fiecare și interval variabil în funcție de primer – 2-6. De asemenea, s-a evidențiat populația din Hohott (China) cu 29 de profile în total și interval între 2-6 profile per marker, din Keşan și Tracia (Turcia) cu 29, 28 respectiv și 2-5 profile/primer, din Brăila (România) cu 28 și 2-4 profile/primer. Sunt de a menționat și populațiile din Serbia, care au demonstrat o diversitate moderată a profilelor genetice SSR între indivizii de lupoae cu un total care variază între 17 și 26 pentru cele 7 populații și 1-4 profile electroforetice în funcție de marker. Markerul Ocum-059 a fost unicul care a pus în evidență cele mai multe și diverse profile moleculare (2-4 profile pentru fiecare populație) în genomul plantelor-parazit din Serbia.

Genotiparea *O. cumana* cu 13 markeri SSR a evidențiat 209 (49%) din 429 de cazuri studiate, cu o variabilitate a profilelor moleculare, populațiile prezentând de la 2 la 6 amprente diferite în funcție de primer.

Celelalte cazuri, 220 (51%), au relevat un grad de omogenitate înalt între genotipuri, fiind identificate doar câte un singur profil identic în cadrul unei populații (caz).

(iii). Analiza diversității genetice a diferențiat populațiile și după **numărul fragmentelor** identificate, care a variat de la 3 (Ocum-174) până la 13 alele (Ocum-197) per marker. În conformitate cu variantele alelice generate de un marker, cei mai eterogeni s-au dovedit a fi Ocum-197 (13 alele), Ocum-052 (11), Ocum-087 (10), Ocum-059, Ocum-081 și Ocum-196 (cu câte 8 alele fiecare), determinând un nivel crescut al polimorfismului alelic pentru populațiile studiate. Markerii Ocum-174 (3), Ocum-141 (4), Ocum-075 (6) au determinat prezența unui număr mic și comun de alele pentru majoritatea populațiilor. Ocum-206 s-a caracterizat printr-un profil molecular din 2 alele identificat la toate populațiile, cu excepția celor din China (6) și Serbia (3) (Fig.1).

Markerii Ocum-052, Ocum-059, Ocum-081, Ocum-196 și Ocum-197 au evidențiat un număr variabil de alele, discriminând cel mai bine populațiile de lupoaie între țările investigate, iar Ocum-174 a generat un număr constant de alele (3) pentru toate populațiile din diferite regiuni geografice, minimalizând ponderea sa în diversitatea genetică a populațiilor. Acest primer s-a remarcat prin prezența a 3 alele la majoritatea populațiilor, cu excepția celor din Keșan, OR-SR43, Grigorievca și Popeasca, la care a fost identificat un singur fragment SSR.

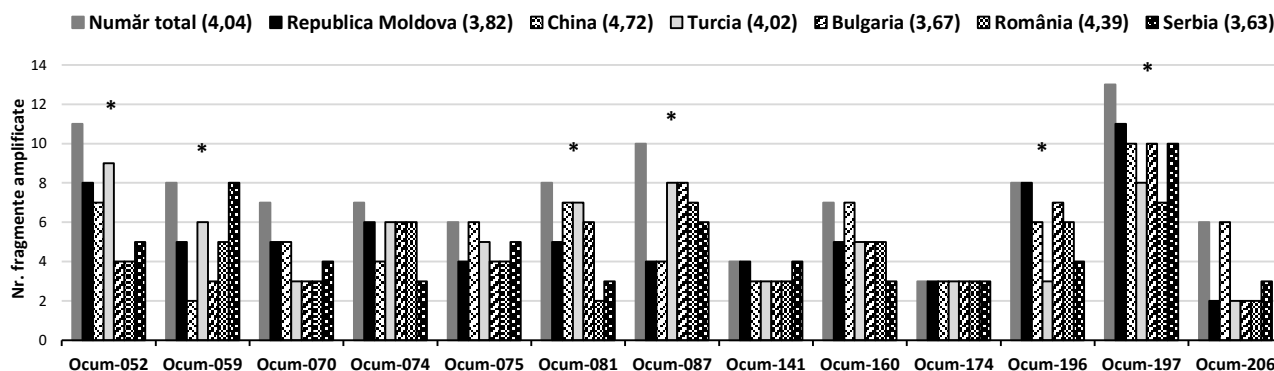


Fig.1. Fragmente microsatelite amplificate la populațiile de *O. cumana* studiate.

Notă: * – markeri eterogeni și cu cel mai mare număr de variante alelice; în paranteze – media numărului de alele.

Un număr identic de alele a fost evidențiat atât la nivel inter-, cât și intrapopulațional, în cazul markerilor Ocum-075 și Ocum-206 pentru populațiile din Republica Moldova și din Turcia, a markerilor Ocum-059, Ocum-074, Ocum-087 – pentru populațiile din China, Ocum-052, Ocum-075, Ocum-206 – pentru populațiile din Bulgaria și markerii Ocum-052, Ocum-075, Ocum-081, Ocum-196 pentru cele din Serbia. Astfel, acești loci nu au relevat diversitate genetică pentru populațiile originare din regiunile menționate. Făcând abstracție de markerii care au determinat omogenitate, în cazul Ocum-070, Ocum-141 și Ocum-174 s-a observat același număr de fragmente (3) pentru toate populațiile din Bulgaria, însă în cadrul populațiilor indivizii au identificat un număr variabil de fragmente. O diversitate genetică la nivel intrapopulațional în baza numărului de variante alelice a fost evidențiată în cazul populațiilor din Radnevo, Silanovici și Rosenova pentru 8 din 13 primeri și câte 6 din 13 pentru ultimele două populații. Populațiile din Republica Moldova au fost caracterizate printr-o diversitate inter- și intrapopulațională pronunțată SSR pentru 46-69% din totalul markerilor utilizați. Cele mai omogene sunt populațiile din Cahul și Popeasca, care au prezentat diversitate alelică în cazul a 4 și respectiv 5 markeri. Populațiile colectate din Turcia au fost evaluate ca eterogene în cazul a 61-69% dintre markeri, cu excepția populației din Luleburgaz, care s-a dovedit a fi mai omogenă după numărul de fragmente SSR (23%, 3 markeri). Un nivel ridicat de variație a numărului de variante alelice între genotipuri se atestă și la populațiile din China (54%) și România (61%). În cele din urmă, populațiile din Serbia s-au caracterizat cu cel mai scăzut nivel de diversitate alelică la nivel inter- și intrapopulațional (15-23% dintre markeri). Dintre populațiile sârbe s-a evidențiat OR-SR43, care a prezentat o variație a numărului de alele între indivizi în cazul a 5 primeri SSR (39%).

Numărul mediu de alele per populație pentru lupoaia din Serbia (3,63) și Bulgaria (3,67) a fost mai mic, comparativ cu alte populații, indicând o diversitate alelică mai mică (Fig.1). Cel mai mare număr de alele și

media per populație a fost stabilită în cazul lupoarei din China (4,72), Turcia (4,02) și Republica Moldova (3,82), rezultate care confirmă cercetările anterioare, realizate cu același set de markeri la aceleași populații [24].

Markerii microsateliți utilizați în acest studiu au generat în total 98 de alele în genomul plantelor de *O. cumana*, fiind constatate 10 fragmente comune pentru toate populațiile investigate (Tab.4). Genotiparea populațiilor de lupoare a scos în evidență și alele specifice pentru anumite populații sau țări. Cele mai multe dintre acestea au fost identificate la populațiile din China (4) – Ocum-052 (119 pb), Ocum-070 (137, 145 pb), Ocum-160 (150 pb). Genotipurile din Turcia și România au prezentat câte 2 alele specifice pentru Ocum-052 (158, 173 pb) și Ocum-087 (168, 184 pb), respectiv. Două benzi specifice sunt observate și la populațiile din Serbia, generate de doi primeri diferiți: Ocum-059 (108 pb) și Ocum-074 (114 pb) (Tab.4).

Tabelul 4

Alele comune și specifice, identificate la populațiile de *O. cumana* Wallr.

Număr total de alele		98	
Alele comune		10 Ocum75 (106, 112, 121 pb); Ocum59 (95 pb); Ocum87 (109, 144 pb); Ocum141 (192, 209 pb); Ocum174 (190 pb); Ocum206 (124 pb)	
Alele specifice pentru țară			
China	Turcia	România	Serbia
Ocum-052 (119 pb) Ocum-070 (137 pb, 145 pb) Ocum-160 (150 pb)	Ocum-052 (158 pb, 173 pb)	Ocum-087 (168 pb, 184 pb)	Ocum-059 (108 pb) Ocum-074 (114 pb)

În baza analizei individuale per populație, cele mai puține fragmente specifice au fost observate la populațiile din Bulgaria. Astfel, doar populația din Radnevo a prezentat 6 alele specifice generate de Ocum-059, Ocum-074 și Ocum-197, iar celelalte populații nu au evidențiat niciun fragment specific. În spectrele electroforetice la populațiile din Turcia au fost identificate de la 0 (Luleburgaz) la 6 (Keşan) variante alelice specifice, iar pentru cele din Serbia – de la 1 (OR-SR11) la 7 (OR-SR43). Un număr impunător de fragmente specifice au fost evidențiate la populațiile din China care a variat între 1 (Bayanuur) și 15 (HeBei) și la cele din Republica Moldova – între 1 (Popeasca) și 11 (Taraclia).

Concluzii

Genotiparea în baza markerilor microsateliți SSR generează informații valoroase privind polimorfismul alelic, diversitatea și structura genetică a populațiilor de *O. cumana* și prezintă interes științific pentru studiile axate pe răspândirea și evoluția acestuia, precum și pentru programele de ameliorare a rezistenței față de acest patogen.

Markerii microsateliți (8) Ocum-052, Ocum-059, Ocum-070, Ocum-081, Ocum-087, Ocum-160, Ocum-196 și Ocum-197 au pus în evidență o diversitate pronunțată atât la nivel inter- și intrapopulațional, cât și regional și pot fi aplicați în studii ulterioare de genotipare a speciei de *O. cumana*. Reieșind din intervalul identic de amplificare, numărul mic de profile electroforetice (2-7) și numărul variantelor alelice (4-6) generat, locii SSR Ocum-141, Ocum-174, Ocum-175 și Ocum-206 au prezentat un nivel relativ scăzut de diversitate genetică.

Analiza variabilității genetice în cadrul celor 33 de populații de lupoare a relevat prezența a 153 de profile molecular-genetice și a 98 de alele. Lungimea secvențelor nucleotidice SSR a variat în intervalul 76-343 perechi de baze, fiind dependentă de tipul markerului utilizat. Au fost identificate 10 fragmente comune pentru toate populațiile.

Populațiile de *O. cumana* provenite din Bulgaria și Serbia s-au dovedit a fi relativ mai omogene după numărul de profile moleculare (1-3) și media numărului de alele (3,67; 3,63, respectiv), comparativ cu cele colectate din Republica Moldova (1-10; 3,82, respectiv), Turcia (1-6; 4,02, respectiv) și China (1-9; 4,72, respectiv). Populațiile din Taraclia, Svetlii, Izbiște, Căzănești, Prepelița, Congaz (Republica Moldova), Radnevo, Rosenova (Bulgaria), Hohott (China), Keşan, Merkez, Tracia (Turcia) și OR-SR43 (Serbia) s-au remarcat printr-un nivel ridicat de variabilitate genetică intrapopulațională.

Referințe:

1. CLAPCO, S. Diversitatea raselor de lupoai (Orobancha cumana Wallr.) în lume. În: *Akados*, 2021, nr.3, p.25-32. ISSN 1857-0461
2. GUCHETL, S., ANTONOVA, T.S., TCHELUSTNIKOVA, T. Interpopulation genetic differentiation *Orobancha cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania using molecular genetic markers. In: *Helia*, 2014, vol.37, no.61, p.181-191. ISSN: 2197-0483
3. BILGEN, B.B., BARUT, K.A., DEMIRBAŞ, S. Genetic characterization of *Orobancha cumana* populations from the Thrace region of Turkey using microsatellite markers. In: *Turkish Journal of Botany*, 2019, vol.43, p.38-47. ISSN: 1300-008X
4. ПЛАЧЕК, Е.М. Проблемы селекции подсолнечника. В: *Труды Всесоюзного Съезда по генетике*, 1932, №.2, с.126. ISSN 2227-8834
5. BATCHVAROVA, R. Current situation of sunflower broomrape in Bulgaria. In: *Proc. 3rd Int. Symp. on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*. Córdoba, Spain, 2014, p.51-54.
6. PACUREANU, M.J. Current situation of sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in Romania. In: *Proc. of the 3rd Int. Symp. on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*. Paris, France, 2014, p.39-43.
7. KAYA, Y. Current situation of sunflower broomrape in Turkey. In: *Proc. 3rd Int. Symp. on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*. Córdoba, Spain, 2014, p.55.
8. DUCA, M., ACCIU, A., CLAPCO, S. Distribuția geografică și caracteristica unor populații de *O. cumana* din Republica Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 2017, vol.332, nr.2, p.65-76. ISSN: 1857-064X
9. POTOTSKYI, G. Current situation of sunflower broomrape in Ukraine. In: *Proc. 3rd Int. Symp. on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*. Córdoba, Spain, 2014, p.56.
10. MILADINOVIĆ, D., JOCIĆ, S., DEDIĆ, B., CVEJIĆ, S., DIMITRIJEVIĆ, A., IMEROVSKI, I. & MALIDŽA, G. Current situation of sunflower broomrape in Serbia. In: *Proc. 3rd Int. Symp. on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*. Córdoba, Spain, 2014, p.33-38.
11. SHI, B.X., CHEN, G.H., ZHANG, Z.J., HAO, J.J., JING, L., ZHOU, H.Y., ZHAO, J. First report of race composition and distribution of sunflower broomrape, *Orobancha cumana*, in China. In: *Plant Disease*, 2015, no.2, p.291. ISSN: 0191-2917
12. JESTIN, C., LECOMTE, V., DUROUEIX, F. Current situation of sunflower broomrape in France. In: *Proc. 3rd Int. Symp. on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*. Córdoba, Spain, 2014, p.28-31.
13. MARTÍN-SANZ, A., MALEK, J., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.M., PÉREZ-VICH, B., VELASCO, L. Increased virulence in sunflower Broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity. In: *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol.7, p.1-9. ISSN: 1664-462X
14. AMRI, M., ABBES, Z., YOUSSEF, S.B., BOUHADIDA, M., SALAH, H.B., KHARRAT, M. Detection of the parasitic plant, *Orobancha cumana* on sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Tunisia. In: *African Journal of Biotechnology*, 2012, vol.11, p.4163-4167. ISSN: 1684-5315
15. NABLOUSSI, A., VELASCO, L., ASSISSEL, N. First report of sunflower broomrape, *Orobancha cumana* Wallr., in Morocco. In: *Plant Disease*, 2018, vol.102, p.457. ISSN: 0191-2917
16. VIEIRA, M.L.C., SANTINI, L., DINIZ, A.L., MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. In: *Genetics and Molecular Biology*, 2016, vol.39, no.3, p.312-328. ISSN 0100-8455
17. GAGNE, G., ROECKEL-DREVET, P., GREZES-BESSET, B., SHINDROVA, P., IVANOV, P., GRAND-RAVEL, C., VEAR, F., TOURVIEILLE DE LABROUHE, D., CHARMET, G., NICOLAS, P. Study of the variability and evolution of *Orobancha cumana* populations infesting sunflower in different European countries. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, vol.96, p.1216-1222. ISSN 0040-5752
18. DUCA, M., GLIJIN, A., ACCIU, A., GORCEAG, M., GÎSCĂ, I. Identification of RAPD markers associated with sunflower resistance to *Orobancha cumana* Wallr. In: *Proc. 3rd Int. Symp. Conservation of plant diversity*. Chisinau, 2014, p.87-88.
19. GAGNE, G., ROECKEL-DREVET, P., GREZES-BESSET, B., SHINDROVA, P., IVANOV, P., GRAND-RAVEL, C., VEAR, F., CHARMET, G., NICOLAS, P. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobancha cumana* genetic diversity. In: *Journal of Phytopathology*, 2000, vol.148, no.7-8, p.457-459. ISSN 0931-1785
20. BENHARRAT, H., VERONESI, C., THEODET, C., THALOUAM, P. *Orobancha* species and population discrimination using inter simple sequence repeat (ISSR). In: *Weed Research*, 2002, vol.42, p.470-474. ISSN:1365-3180
21. PINEDA-MARTOS, R., VELASCO, L., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, J., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.M., PÉREZ-VICH, B. Genetic diversity of sunflower broomrape (*Orobancha cumana*) populations from Spain assessed using SSR markers. In: *Weed Research*, 2013, vol.53, no.4, p.279-289. ISSN:1365-3180

22. DUCA, M., PORT, A., ACCIU, A., ȘESTACOVA, T. Molecular characterization of broomrape populations from Republic of Moldova using SSR markers. In: *Helia*, 2017, vol.40, no.66, p.47-59. ISSN: 2197-0483
23. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol.I-III. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001. 1885 p.
24. DUCA, M., MUTU, A., CLAPCO, S. Efficiency of microsatellite markers in genotyping of *Orobanche cumana* populations. În: *Lucrări Științifice, seria Agronomie*, vol.64, nr.1. Iași: Universitatea de Științele Vieții, 2021, p.25-30. ISSN 1454-7414

Notă: Lucrarea a fost realizată în cadrul Proiectului 20.80009.5107.01 *Studii genetico-moleculare și biotehnologice ale florii-soarelui în contextul asigurării managementului durabil al ecosistemelor agricole* (Program de Stat 2020-2023).

Date despre autori:

Maria DUCA, academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar; cercetător științific principal, Centrul de Cercetări Științifice Genetică Funcțională, CCȘ „Biologie și Pedologie”, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: mduca2000@yahoo.com

ORCID: 0000-0002-5855-5194

Ana MUTU, doctor în științe biologice; cercetător științific, Centrul de Cercetări Științifice Genetică Funcțională, CCȘ „Biologie și Pedologie”, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: anisoara.mutu@gmail.com

ORCID: 0000-0001-8603-142X

Steliana CLAPCO, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător; cercetător științific coordonator, Centrul de Cercetări Științifice Genetică Funcțională, CCȘ „Biologie și Pedologie”, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: clapcostela@gmail.com

ORCID: 0000-0001-7147-2740

Prezentat la 04.11.2022