

CZU: 577.29:575.174.015.3:582.952.6

<https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.35>

EFICIENȚA UNOR MARCHERI MOLECULARI ÎN DISCRIMINAREA POPULAȚIILOR DE LUPOAIE ORIGINARE DIN CHINA

Duca Maria, Mutu Ana, Bivol Ina., Clapco Steliana
 Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova
 e-mail: ana.mutu@usm.md

Abstract

In this study, the effectiveness of different types of molecular markers in assessing genetic diversity of populations of *O. cumana* from China was determined. ISSR and SSR markers detected different levels of genetic variability among and within broomrape populations. SSR markers analysis showed high level of genetic variation within the populations as revealed by high average values of *Nei's gene diversity* ($H=0,75$) and *Shannon's information index* ($I=1,44$), while genotyping with ISSR markers showed greater ability to discriminate genotypes according to *Resolving power* ($R_p=7,24$). Thus, the combined use of ISSR and SSR markers allowed the detection of higher polymorphism than either set of marker alone.

Key words: Broomrape, population, genetic polymorphism, ISSR and SSR markers.

Introducere

Marcherii moleculari sunt segmente de ADN care au o localizare cunoscută în genomul unui organism, se pot identifica ușor prin metode de biologie moleculară și, deseori, sunt asociate anumitor caractere [5]. În prezent există o gamă largă de marcheri moleculari (RAPD, SSR, AFLP, ISSR etc.) care au demonstrat o eficiență și importanță majoră în evaluarea diversității genetice la diferite specii de plante [7, 8, 12], inclusiv și în cazul speciilor din genul *Orobancha* [1, 4, 6].

Printre secvențele moleculare cele mai informative și des utilizate în studiile de variabilitate inter- și intraspecifică sunt marcherii SSR (*Simple Sequence Repeats*) și ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Marcherii SSR sunt secvențe microsatelite (1-9 pb) specifice de ADN nuclear preponderent non-informațional, înalt repetitive în tandem și cu o distribuție largă pe întregul genom. Aceștia sunt marcheri codominanți și multialelici fapt ce permite evidențierea formelor heterozigote și identificarea diferitor alele la nivelul unui locus SSR (monolocus), caracteristici care îi face mai informativi comparativ cu alți marcheri moleculari și determină capacitatea lor de a detecta un nivel înalt de polimorfism [11].

ISSR sunt segmente de ADN (16-25 pb) distribuite aleator pe genom, între secvențele SSR, sunt nespecifice și se moștenesc dominant conform legilor mendeliene [5], permițând evidențierea formelor homozigote și a polimorfismului polilocus (la diferite gene și cromozomi). Marcherii ISSR sunt bialelici și, prin urmare, sunt mai puțin informativi comparativ cu cei de tip codominant și multialelici. Aceste particularități, cât și abundența secvențelor ISSR pe genom îi poate face destul de informativi și efectivi în studiul anumitei germoplasme [12].

În acest context, scopul cercetărilor a constat în evaluarea eficienței diferitor tipuri de marcheri moleculari (ISSR și SSR) privind estimarea diversității genetice populaționale a speciei de *O. cumana* originare din China, unde genotiparea populațiilor de lupoaie este la început de cale [10].

Materiale și metode

În scopul evaluării eficienței sistemelor de marcheri moleculari au fost utilizați 14 primeri ISSR [1] și 15 marcheri SSR [6], fiind aplicate metode de biologie moleculară (extragere și cuantificare de ADN, reacție de polimerizare în lanț, electroforeză în gel de agaroză și poliacrilamidă) implementate și aprobate în literatura de specialitate [9]. În calitate de material biologic s-au utilizat lăstari de lupoaie colectați și păstrați la -80°C (trei populații).

Prelucrarea statistică a fost efectuată cu ajutorul programelor specializate: Photo-Capt (versiunea 15.02), Microsoft Excel Office 2010, POPGENE (1.32) iar *puterea de discriminare* (R_p) a fost calculată după Prevost A. [7], *conținutul informației polimorfe* (PIC) pentru ISSR după Roldán-Ruiz I. [8] și pentru SSR după Botstein D. [2].

Rezultate și discuții

Analiza produșilor de amplificare, obținuți în cadrul prezentului studiu, denotă faptul că aceștia diferă ca număr și mărime în funcție de populațiile de *O. cumana* și tipul markerilor utilizați. Astfel, în rezultatul genotipării plantelor cu 14 markeri ISSR s-a constatat că 13 dintre ei posedă o reproductibilitate și specificitate înaltă, iar PCR-SSR a pus în evidență eficacitatea și gradul variabil de polimorfism a 14 din 15 markeri microsateliți, fapt care a determinat analiza lor ulterioară.

Polimorfismul markerilor ISSR (tab. 1). Markerii ISSR au generat în total 127 de benzi cu lungimea cuprinsă între 340-4680 pb, cu un număr variabil de ampliconi cuprins între 3 și 14 în dependență de amorsa utilizată. Cel mai mare număr de ampliconi a fost identificat în cazul secvențelor trinucleotidice ((CAG)₅, (CAA)₅), care au evidențiat 11-13 ampliconi cu media 11,33, fiind urmat de cele dinucleotidice (BC841, BC857, (AG)₈YA) – 3-14 (media 9,30) și tetranucleotidice – 9, datele obținute relevând faptul că gradul de variabilitate al markerilor ISSR este influențat de tipul și numărul unităților repetitive. Nivelul polimorfismului a variat între 60-100% cu o valoare medie de cca 87% pentru întreg sistemul de markeri ISSR investigat.

Tabelul 1. Caracteristici ale markerilor ISSR la diferite populații de lupoaie din China

Marker	Interval lungime ampliconi (pb)	N	Nivel polimorfism (%)	PIC	I	Rp
BC807	340-2000	10	80,00	0,32	0,49	9,67
BC810	430-2500	9	88,89	0,33	0,50	10,44
BC835	490-4600	12	66,67	0,26	0,42	6,78
BC841	360-1895	14	92,86	0,35	0,53	11,11
BC857	400-2160	10	100,00	0,43	0,61	10,11
(CA) ₆ AC	820-1140	4	100,00	0,31	0,49	3,78
(CA) ₆ RG	490-1240	3	100,00	0,35	0,52	1,56
(CAA) ₅	660-2900	11	100,00	0,37	0,55	7,22
(CAG) ₅	640-3600	13	84,62	0,37	0,54	8,00
(CT) ₈ TC	840-2520	12	91,67	0,31	0,48	6,44
(CTC) ₄ RC	500-4680	10	60,00	0,27	0,43	5,56
(GACA) ₄	950-2290	9	88,89	0,31	0,47	4,00
(AG) ₈ YA	380-1920	10	100,00	0,39	0,58	9,44
Total/Media	340-4680	127	87,40±7,93	0,34±0,03	0,51±0,03	7,24±1,77

Notă: N – numărul total ampliconi/primer; PIC – conținutul informației polimorfe; I – indicele Shannon; Rp – puterea de discriminare a primerului; media±eroarea valorii medii.

Polimorfismul markerilor SSR (tab. 2). Pentru întregul set de markeri SSR a fost determinat un număr total de 77 alele cu dimensiuni ale secvențelor incluse în intervalul de 76-343 pb, care a variat de la 2 (Ocum-59) până la 12 alele (Ocum-197) în funcție de amorsa utilizată. Este important de menționat faptul că toți cei 14 markeri investigați fiecare separat s-au caracterizat ca primeri polimorfi (100%). Estimarea comparativă a datelor obținute pentru parametrii statistici calculați a pus în evidență o dependență între valorile indicilor analizați cu numărul de alele identificat de fiecare marker doar în cazul secvențelor SSR, rezultate care reflectă natura lor codominantă și polimorfismul monocus, ceea ce nu este specific pentru secvențele ISSR care evidențiază polimorfismul polilocus [5].

Eficacitatea markerilor moleculari utilizați în analiza diversității genetice a populațiilor de lupoaie s-a analizat și prin prisma unor coeficienți statistici calculați – PIC, H, I și Rp (tab. 1 și 2).

Indicele conținutului informației polimorfe (PIC) pentru fiecare marker ISSR a variat între 0,26 (BC835) și 0,43 (BC857) cu valoarea medie de 0,34, încadrându-se în limitele de până la 0,50, prevăzute teoretic pentru markerii dominanți [8]. În cazul markerilor SSR s-a identificat un nivel înalt al conținutului informației polimorfe pentru toate amorsele utilizate (PIC>0,5 [2]), cu excepția markerului Ocum-59 iar indicele PIC a variat între 0,38 (Ocum-59) și 0,86 (Ocum-197), cu o valoare medie de 0,70.

Tabelul 2. Caracteristici ale markerilor SSR la diferite populații de lupoaie din China

Marker	Interval lungimea alelelor (pb)	N	PIC	H	I	Rp
Ocum-52	111-192	7	0,81	0,83	1,69	5,56
Ocum-59	90-95	2	0,38	0,50	0,69	0,00
Ocum-70	106-145	5	0,71	0,76	1,44	5,78
Ocum-74	119-146	4	0,70	0,75	1,39	0,00
Ocum-75	98-147	7	0,78	0,81	1,72	0,33
Ocum-81	76-131	7	0,74	0,78	1,57	6,00
Ocum-87	109-144	4	0,70	0,75	1,39	0,00
Ocum-108	143-168	4	0,65	0,70	1,06	2,78
Ocum-141	192-226	3	0,59	0,67	1,10	3,78
Ocum-160	128-177	7	0,79	0,81	1,60	6,51
Ocum-174	190-211	3	0,59	0,67	1,09	5,22
Ocum-196	187-343	6	0,77	0,80	1,61	5,33
Ocum-197	108-190	12	0,86	0,87	2,16	9,56
Ocum-206	118-164	6	0,77	0,80	1,69	6,67
Total/Media	76-343	77	0,70±0,07	0,75±0,05	1,44±0,21	4,11±1,76

Notă: N – numărul total alele/primer; PIC – conținutul informației polimorfe; H – indicele de diversitate genetică Nei; I – indicele Shannon; Rp – puterea de discriminare a primerului; media±eroarea valorii medii.

Luând în considerare faptul că pentru markerii dominanți intervalul de variație al indicelui PIC este cuprins între 0,00-0,50, iar pentru cei codominanți este – 0,00-1,00, putem conchide că pentru ambele tipuri de markeri s-au observat valori medii similare destul de mari (ISSR: 0,34; SSR: 0,70), rezultate care sunt în concordanță și cu alte studii efectuate pe *O. cumana* [4].

Nivelul înalt al polimorfismului detectat de primerii incluși în cercetare este confirmat și de *indicele de diversitate genetică Nei* (H sau *heterozigoția așteptată*), care a cuprins valori între 0,50 (Ocum-59) și 0,87 (Ocum-197) cu o medie de 0,75 pentru PCR-SSR, întrucât doar aceste secvențe au capacitatea de a pune în evidență ponderea heterozigoților într-o populație.

Indicele informațional Shannon (I), care arată nivelul de organizare a unei populații și cuantifică distribuția alelelor în interiorul acesteia, a prezentat valoarea minimă de 0,42 (BC835) și maximă de 0,61 (BC857) cu media 0,51 (tab. 1) pentru markerii ISSR. În cazul locilor SSR indicele I a înregistrat valori mai mari, variind între 0,69 (Ocum-59) și 2,16 (Ocum-197) cu o medie de 1,44 (tab. 2), relevând o variabilitate intrapopulațională mai înaltă a secvențelor SSR comparativ cu cele ISSR.

În general, variabilitatea genetică a markerilor SSR, exprimată prin indicele I, s-a dovedit a fi cu mult mai mare (1,44) în comparație cu markerii ISSR (0,51) (tab. 1 și 2) indicând asupra capacității acestora de a caracteriza diversitatea intrapopulațională a lupoaiei. Aceste rezultate confirmă încă o dată capacitatea markerilor codominanți și multialelici SSR de a detecta un număr mare de alele per locus [12], și respectiv - un polimorfism ridicat, ceea ce nu este caracteristic pentru markerii ISSR, care sunt de natură bialelică [5].

Puterea de discriminare (Rp) este un indice ce caracterizează particularitatea markerilor de a diferenția genotipurile într-o populație [3]. Pentru ISSR aceasta a constituit în mediu 7,24, cea mai mică valoare (1,56) fiind constatată la (CA)₆RG, iar cea mai mare (11,11) la BC841. Capacitatea de discriminare a markerilor SSR a fost în general mai mică comparativ cu cea identificată la ISSR, atât la nivel mediu pe experiență (4,11), cât și individual în cazul markerilor cu cele mai înalte valori (Ocum-70: 5,78; Ocum-81: 6,00; Ocum-160: 6,51; Ocum-206: 6,67) (tab. 2). Spre deosebire de rezultatele obținute la ISSR, pentru acest indice au fost puși în evidență 3 perechi de markeri, (Ocum-59, Ocum-74, Ocum-87) cu o pondere nulă (valoarea 0) în diferențierea populațiilor. Totuși, datele obținute au permis identificarea unui marker SSR (Ocum-197: 9,56), cu o capacitate de discriminare la nivelul celor mai efectivi markeri ISSR.

Astfel, generalizând rezultatele obținute pentru cele două seturi de markeri moleculari putem conchide că markerii ISSR au prezentat superioritate față de SSR după numărul total de ampliconi (127 și 77, respectiv), media ampliconi per marker (9,77 și 5,50, respectiv), puterea de discriminare a genotipurilor Rp (7,24 și 4,11, respectiv) și nivelul înalt de polimorfism (87,40%) care reflectă variabilitatea între genotipurile diferitor populații datorită ampliconilor polimorfi identificați. Markerii SSR au prezentat valori mai sporite comparativ cu ISSR după indicii specifici de diversitate genetică I (1,44 și 0,51, respectiv) și H (0,75), rezultate ce ca-

racterizează un număr mare de variații genetice în cadrul genotipurilor investigate. Prin urmare, considerăm că utilizarea combinată a diferitor markeri moleculari poate oferi *mai multe informații* privind distribuția regiunilor genomice detectate de fiecare marker individual și în complex asupra unui genom.

Concluzii

1. Evaluarea markerilor ISSR a demonstrat că secvențele di- (BC841, BC857, (AG)₈YA) și trinucleotidice ((CAG)₅, (CAA)₅) sunt mai informative comparativ cu cele tetranucleotidice, iar BC841, BC857, (CAA)₅, (CAG)₅ și (AG)₈YA, au prezentat cele mai mari valori după toți indicii analizați (N cuprins între 10-14 ampliconi, rata de polimorfism > 80%, PIC ≥ 0,35, I > 0,50 și Rp > 7,20) caracterizând markerii ca cei mai efectivi în studiul diversității genetice a populațiilor de lupoaie.

2. În baza analizei polimorfismului markerilor SSR cei mai informativi s-au arătat a fi 7 din 15 markeri: Ocum-52, Ocum-70, Ocum-81, Ocum-160, Ocum-196, Ocum-197, Ocum-206, care au indicat printre cele mai înalte valori conform coeficienților statistici calculați (N: 5-12 alele, PIC > 0,70, H > 0,75, I > 1,40 și Rp > 5,30) și pot fi utilizați în studii ulterioare de genotipare a plantelor de *O. cumana*.

3. Studiul populațiilor de lupoaie în baza tehnicilor moleculare combinate (ISSR și SSR) a permis identificarea gradului diferit de variabilitate genetică, fiind constatată o diversitate intrapopulațională înaltă în cazul markerilor SSR (H= 0,75 și I= 1,44) și interpopulațională a secvențelor ISSR (Rp= 7,24).

Rezultatele expuse în lucrare au fost obținute în cadrul proiectului din Programul de Stat 20.80009.5107.01-*Studii genetico-moleculare și biotehnologice ale florii-soarelui în contextul asigurării managementului durabil al ecosistemelor agricole*. finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Bibliografie

1. BENHARRAT, H. [et al.]. *Orobanche* species and population discrimination using inter simple sequence repeat (ISSR) // Weed Research. – 2002. – Vol. 42. – P. 470-474.
2. BOTSTEIN, D. [et al.]. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // American journal of human genetics. – 1980. – Vol. 32 (3). – P. 314-331.
3. De VALK, H. A. [et al.]. Use of a Novel Panel of Nine Short Tandem Repeats for Exact and High-Resolution Fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* Isolates // Journal of Clinical Microbiology – 2005. – Vol. 43 (8). – P. 4112-4120.
4. DUCA, M. [et al.]. Asocieri corelative dintre markerii morfologici și moleculari în studiul variabilității genetice a lupoaiei din Republica Moldova // Buletinul AȘM. Științele vieții. – 2020. – Nr. 1 (340). – P. 7-23.
5. IDREES, M., IRSHAD, M. Molecular Markers in Plants for Analysis of Genetic Diversity: A Review // European Academic Research. – Vol. II (1). – 2014. – P. 1513-1540.
6. PINEDA-MARTOS, R. [et al.]. Genetic diversity of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) populations from Spain assessed using SSR markers // Weed Research. – 2013. – Vol. 53 (4). – P. 279-289.
7. PREVOST, A., WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – Vol. 98 (1). – P. 107-112.
8. ROLDÁN-RUIZ, I. [et al.]. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.) // Molecular Breeding. – 2000. – Vol. 6. – P. 125-134.
9. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. Molecular cloning. A laboratory manual. – Vol. I-III. – Cold Spring Harbor Laboratory Press.: New York, 2001.
10. SHI, B., ZHAO, J. Recent progress on sunflower broomrape research in China // Oilseeds and fats, Crops and Lipids. – 2020. – Vol. 27 (30). – 9 P.
11. 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.
12. VIJAYAN, K. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis // International Journal of Industrial Entomology. – 2005. – Vol. 10 (2). – P. 79-86.