DIVERSITATEA MOLECULARĂ A DOUĂ ECOTIPURI DE *Datura inoxia* PROVENITE DIN VESTUL ȘI ESTUL ROMÂNIEI

Cristina Chelu¹, Carmen Varlam², Gheorghe Tițescu², Gallia Butnaru^{1*}

¹ Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara, Timișoara, România.

² Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Criogenice și Izotopice – ICSI Rm. Vâlcea, Râmnicu Vâlcea, România.

* Academia Oamenilor de Știință din România.

galliab@yahoo.com;

<https://doi.org/10.53040/9789975347204.03>

Abstract: Molecular Diversity of two Ecotypes of *Datura inoxia* Originating from Western and Eastern Romania. To characterize genomic variation among genotypes, we have performed RAPD analysis using ten random primers. The results yielded 88 bands out of which 39 were polymorphic. The primers US1 and US7 showed 87.71% and 72.72% polymorphism respectively. The least polymorphism was shown by primer US9 (12.50%). The primer US15 did not produce any bands suggesting the absence of matching sequences in the genomic DNA. The dendrogram classified ecotypes into two clusters (A and B); cluster B possess three sub-clusters: B1 - Socodor 2; B2 - Flamura 1 and Flamura 2, and B3 - Flamura 3. Overall, the values of genetic similarity between ecotypes were low pointing out their particular origin and “evolution”.

Keywords: *Datura inoxia* Mill., Romanian ecotypes, RAPD oligomers, genetic similarity.

Introducere

Datura inoxia Mill. face parte din familia *Solanaceae*, originară din America centrală și de sud și din India de vest. Calea pe care a intrat *Datura* spp. în țara noastră este necunoscută. Specia s-a naturalizat în întreaga lume, inclusiv în România. Este o buruiănă endemică-invazivă, termofilă și crește bine pe aproape toate terenurile. Se întâlnește pe marginea drumurilor, în grădini și în cultură. Suprafețe cultivate se întâlnesc în Dobrogea, unde insolația depășește 5100kWh/m²/an. Se duce o campanie acerbă de „control” a plantei, fiind nocivă sănătății, toxică și cu proprietăți de a genera delir, amnezie sau comportament violent. Conține atropină, hioscină (scopolamină) și hiosciamină componente chimice importante folosite în medicină.

Markeri moleculari RAPD sunt ușor de utilizat, sunt ieftini și sunt folosiți în diferite tipuri de studii filogenie (1), de analiză înruderii dintre diverse populații (2) și a diversității genetice. Pentru analiza ADN-ului nuclear provenit de la șase genotipuri de ciunăfaie am utilizat metoda RAPD pentru că este rapidă, dă rezultate bune în analiza genetică a populațiilor, evidențiind polimorfismului intra- și inter- populațional (3).

Prin analizele efectuate s-a urmărit cunoașterea profilului ADN-ului genomic provenit de la 6 genotipurilor de *D. inoxia* originare din două ecosisteme îndepărtate din punct de vedere geografic, câmpia de vest și podișul dobrogean de est al României.

Cuvinte cheie: *Datura inoxia* Mill., ecotipuri din România, primeri RAPD, similaritate genetică.

Materiale și metode

Materialul vegetal a fost colectat din două zone ecologice diferite, din vestul și estul României, din nordul Jud. Arad, localitatea *Socodor* (S1, S2 și S3) și din sudul Jud. Constanța, localitatea *Făclia* (F1, F2 și F3). Caracteristicile generale ale celor două ecosisteme sunt prezentate în Tabelul 1.

Clima diagrama *Walter-Light* (4), calculată pentru anul de colectare 2011, indică asemănarea dintre cele două ecosisteme: temperaturi medii anuale de 17.58°C respectiv 16,27°C

C; suma anuală a precipitațiilor 510 mm și 587,1 mm; seceta atmosferică s-a instalat la sfârșitul lui aprilie și a durat până în septembrie - octombrie. Solul pe care au evoluat plantele a fost diferit; probele au fost culese din flora spontană, din trei puncte diferite genotipurile fiind notate cu S1, S2, S3 cele provenite din ecosistemul Socodor și F1, F2, F3 pentru cele provenite din localitatea Făclia.

Tab. 1. Detalii despre diferitele ecosistemelor Socodor și Făclia din județele Arad respectiv Constanța

Caracteristici	Socodor	Făclia
Datarea istorică a localității	1299 (cu migrație umană către USA)	1840
Solul	Soloneț; categ. bonitare II	Solonceac; categ. bonitare III
Clima	Moderat continentală	Temperat continentală
Incidența speciei	mică; nu se cultivă	mare; se cultivă
Fenotipul plantei (la data recoltării eșantioanelor)	Înălț. 71,2±2,7 cm., erectoidă; înflorită	Înălț. 58,1±1,2 cm., răsfirată; înflorită

ADN-ul a fost izolat folosind metoda de extracție CTAB, după cum a raportat *Doyle și Doyle* (5), la care s-au făcut modificări minore. Cantitatea și calitatea ADN-ului extras au fost estimate spectrofotometric-UV. Purity ADN-ului a fost evaluată prin relația OD 260/280.

În Tabelul 2 sunt prezentați cei 10 oligomeri folosiți în analiza ADN-ului genomic extras din plantele de analiză.

Tab. 2. Secvența primerilor aleatori utilizați pentru analiza RAPD.

Nr. de cod US	Secvența (5' – '3)	Nr. de cod US	Secvența (5' – '3)
US 1	TGC-GGG-AGT-G	US 9	TTG-CTG-GGC-G
US 2	GGT-GGC-CAA-G	US 12	CGG-AGA-GCG-A
US 4	GGC-TTG-GCG-A	US 13	CGA-CCA-GAG-C
US 5	CAC-TGG-CCC-A	US 15	GCT-CCC-CCA-C
US 7	TGG-TCG-GGT-G	US 16	TTG-CTG-GGC-G

Toate investigațiile s-au executat în două repetiții, luându-se în considerare doar benzile care s-au reprodus în ambele repetiții. Pentru fiecare oligomer s-a calculat numărul total de benzi, numărul de benzi monomorfe (prezente la toate genotipurile) și numărul de benzi polimorfe; (care se întâlnesc doar la unele genotipuri; Tab. 3). Datele au fost analizate prin coeficienți de similaritate iar construirea clusterelor UPGMA s-a făcut după Fielding (6).

Rezultate și discuții

Dintre cei 10 oligomeri utilizați, primerul US15 cu secvența 5' GCT-CCC-CCA-C 3' nu a amplificat toate probele, în consecință nu a mai fost luat în calcul.

Ceilalți nouă oligomeri utilizați au dat produși PCR cu masa moleculară cuprinsă între 4000 și 100 bp (Fig. 1). Oligomerii care au generat numărul cel mai mare de benzi au fost primerul US2 și US1 cu câte 15 respectiv 14 benzi; 11 benzi au fost generate de primerii US7 și US12; opt benzi au generat primerii US9 și US16, iar primerii US4, US5 și US13 au relevat cel mai mic număr de benzi (7). Randamentul mediu stabilit a fost de 9,77 per primer.

Oligomerul US1 a generat cel mai mare polimorfism, de 85,71 %, urmat în de aproape de primerul US16 cu un polimorfism de 75,00 %; cel mai slab polimorfismului a fost generat de oligomerul US9 (12,50 %). Per ansamblu polimorfismul a fost de 44,31 %.

Benzi unice au apărut în profilul molecular la populațiile Făclia 1 și respectiv, Socodor 1 și Socodor 2 (Tab. 3). Din datele Tab. 3 și Fig. 1 se constată că două genotipuri din partea de vest și unul din partea de est a României s-au diferențiat prin arii cu masa moleculară variabilă și prin prezența unui locus nou. La cele două ecotipuri Socodor dispersia benzilor este pe o arie mult mai extinsă față de cea sugerată de Marker (M). Locusul mutant a apărut în zona cu secvențe moleculare grele 2100bp și 1500bp la genotipurile S1 și S3, poziționate în clusterul A, cea mai recentă linie ontogenetică. În genotipul F1 locusul mutant a apărut în zona nucleotidelor cu masa moleculară mică, sub 100bp

Tab. 3. Polimorfismul relevat de diferiți Primerii RAPD

Primerii Nr. cod.	Nr. total de benzi (A)	Nr. de benzi constante	Nr. de benzi variabile (B)	Benzi unice			Poli morfism (%)
				Nr.	Genotipul	masa mol. (bp)	
US1	14	2	12	1	Făclia 1	100bp	85,71
US2	15	11	4	0	-	-	26,66
US4	7	6	1	0	-	-	14,28
US5	7	5	2	1	Socodor 1	2100 bp	28,57
US7	11	3	8	0	-	-	72,72
US9	8	4	1	0	-	-	12,50
US12	11	7	3	1	Socodor 3	1500 bp	27,27
US13	7	5	2	0	-	-	28,57
US15	0	0	0	0	0	0	0
US16	8	2	6	0	-	-	75,00
Total	88	45	39	3	-	-	44,31
Nr. de alele/Primer = 9,77				Polimorfism (%) = $A/B \times 100$			

Pe baza celor 88 de benzi s-a construit matricea distanțelor genetice și arborele filogenetic al genotipurilor supuse investigației. Dendrograma evidențiază două cluster principale, notate A și B. Clusterul A cuprinde S1 și S3, genotipuri cu evoluție recentă, în timp ce clusterul B, complex alcătuit, cuprinde trei subcluster: B1-cu genotipul S2; B2 care cuprinde F1 și F2 și subclusterul B3 care cuprinde genotipul F3, a cărui evoluție este cea mai veche. Cele mai recente și apropiate populații din punct de vedere genetic sunt genotipurile S1 și S3, între ele fiind cea mai mică distanță genetică (0,026); grupul A distanțându-se cu 0,105 față de S2 (B1) și la 0,174 față de F3 (B3).

Discuții

Pezumția teoretică de la care s-a pornit a fost aceea că nu pot exista diferențe majore în structura ADN-ului celor două ecotipuri distanțate și oarecum izolate geografic. Datele morfometrice au confirmat parțial supoziția noastră. Analiza moleculară și mai ales dendrograma arată cluster care sunt clar conturate cum este clusterul A, recent format în care sunt localizate genotipurile S1 și S3.

Clusterul B, cel mai vechi din punct de vedere genetic, este un amestec de genotipuri cu evoluție aparte: linia B3, își începe evoluția independentă devreme (0,026), este urmată de B1 și B2 la o distanță de disjuncție de 0,89. În clusterul B1 se situează genotipul S2 iar în clusterul B2 este localizat genotipul F3. Genotipurile F1 și F2 sunt localizate în clusterul B2 la o distanță de 0,060 unități. Per ansamblu valorile de similaritate genetică între populații sunt mici. Rădăcina arborelui se poziționează între cele 2 grupuri, grupul B3 fiind cel mai vechi din punct de vedere genetic.

În literatura consultată nu au fost găsite date referitoare la acest gen de analize. Părerea noastră este că cele două ecotipuri provin din linii diferite de descendență, cea mai veche fiind cea orientală cantonată în Dobrogea și una mai recentă, occidentală, peste care s-au instalat alte structuri genetice generând o heterogenitate accentuată. Comparativ cu profilul molecular al genotipurilor dobrogene, profilul molecular al genotipurilor Socodor este mai bogat și mai complex alcătuit.

Fig. 2. Dendrograma arată distanța genetică dintre genotipurile de ciumăfaie colectate din diferite ecosisteme din România

Concluzii:

În acest domeniu de investigare nu sunt date edificatoare. Rezultatele obținute conduc către originea orientală a provenienței speciei pe teritoriul dobrogean și occidentală pentru zona vestică a României. Genotipul F3 este forma „ancestrală” a grupului analizat. Populațiile din zona

geografică Făclia/Dobrogea chiar dacă sunt distanțate genetic formează un grup evolutiv compact.

Genotipurile Socodor sunt clar separate din punct de vedere al distanței genetice de cele provenite din estul României. Abundența benzilor generate de markerii RAPD a fost mare.

Între cele șase genotipuri cu evoluție în zone geografice „izolate geografic” există diferențieri majore, la care polimorfism a fost de 44,31%, fiind și sursa formării unor noi complexe de gene respectiv de evoluție.

Bibliografie

1. Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*. 17(16):6463-6471.
2. Balasubramanian S., Sharma R., Kaur J., Bhardwaj N., 2014. Characterization of modified pearl millet (*Pennisetum typhoides*) starch. *Journal of Food Science and Technology*. 51,2.
3. Popescu S., Ciulca S., Sumalan R., Botau D., Boldura O-M., 2019. [Evaluation of the Genetic Diversity of *Allium ascalonicum* Landraces Based on Molecular Markers](#), *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*. vol. 48, 2:119-226
4. Clima diagrama Walter-Lieth, <http://www.zivatar.hu/script.php?id=walter-lieth>.
5. Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Forum*, CTAB pdf., p. 1-15.
6. Fielding A.H., 2007. Cluster and classification techniques for the biosciences. *Cambridge University Press*.
7. Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.