

## VARIABILITATEA GENETICĂ ÎN CADRUL DIFERITELOR POPULAȚII DE *O. VULGARE*

Ana MUTU

Centrul universitar de Biologie Moleculară, UnAȘM

Lucrarea este dedicată analizei diversității genetice în cadrul diferitelor populații de *Origanum vulgare* – o plantă aromatică cu vaste implicații în industria alimentară și farmaceutică, cu utilizarea tehnicii RAPD-PCR. Genotipurile studiate se caracterizează printr-o variabilitate genetică semnificativă, 68% din totalul de 153 fragmente generate fiind polimorfe. S-a constatat eficiența aplicării tehnicii RAPD pentru diferențierea rapidă a genotipurilor.

**Cuvinte-cheie:** polimorfism genetic, *Origanum vulgare*, tehnica RAPD-PCR.

### GENETIC VARIABILITY WITHIN DIFFERENT POPULATIONS OF *O. VULGARE*

In this study, the genetic diversity within different populations of *Origanum vulgare* – an important aromatic plant, widely used in food and pharmaceutical industry, has been carried out using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. The studied genotypes are characterized by a high genetic variability, tested primers generating a total of 153 RAPD fragments of which 68% were polymorphic. To conclude, RAPD analysis can be used to gain rapid information about genetic similarities or dissimilarities within different genotypes.

**Keywords:** genetic polymorphism, *Origanum vulgare*, RAPD-PCR technique.

### Introducere

*Origanum* este unul dintre cele mai răspândite și variabile genuri din familia *Lamiaceae*. O specie frecvent întâlnită este *Origanum vulgare*, care, grație conținutului de uleiuri volatile, substanțe bioactive cu acțiune anti-oxidantă și antimicrobiană, este solicitată în industria farmaceutică, cosmetologie, aromoterapie, culinarie etc. Populațiile de *O. vulgare* sunt caracterizate printr-un polimorfism morfologic și fitochimic pronunțat, care creează dificultăți considerabile în programele de ameliorare și explorare a potențialului biosintetic [2,4,5].

Studiile taxonomice pe baza caracterelor morfologice la specia *O. vulgare* indică un gard înalt de variabilitate și prezența mai multor subspecii, deosebirile referindu-se la culoarea frunzelor, florilor, raportul frunze/tulpini, productivitate etc. Indivizii de *O. vulgare* se disting, inclusiv, prin compoziția chimică a uleiului esențial [9]. Z. W'glarz și colaboratorii au studiat 6 populații de *Origanum vulgare* diferite morfologic, în special după culoarea florii (roz – 1, roz întunecat – 3, alb – 1), constatându-se unele corelații dintre caracterele morfologice și biochimice [20]. Pentru a caracteriza variabilitatea diferitelor specii cu importanță economică pe scară largă sunt utilizați markerii moleculari și biochimici [18].

Deoarece diferențele fenotipice nu întotdeauna se bazează pe schimbări genetice ereditare, fiind adesea determinate de condițiile pedoclimaterice, cele mai eficiente metode de apreciere a polimorfismului sunt metodele de analiză moleculară (RFLP, RAPD, AFLP etc.).

O tehnică relativ ieftină și rapidă de identificare a polimorfismului genomic prin utilizarea unei oligonucleotide – primer pentru secvențe de ADN arbitrar – este reprezentată de RAPD-PCR. Grație posibilității de a analiza un număr considerabil de loci în diferite regiuni ale genomului fără a se cunoaște secvențele de ADN țintă și având la dispoziție cantități foarte mici de matriță, RAPD se utilizează pe larg în analizele genetice [12]. Astfel, cu aplicarea tehnicii date au fost stabilite relațiile de rudenie dintre 12 fenotipuri de busuioc (*Ocimum basilicum* L.) [14], au fost relevați markeri ce corelează semnificativ cu componența uleiurilor volatile și spectrul de flavonoide la *Ocimum gratissimum* L., constatându-se 3 chemotipuri în cadrul speciei [19].

Studiul comparativ al componenței uleiurilor eterice și al profilului RAPD la *Thymus vulgaris* a permis separarea soiurilor în două grupuri, atât în baza analizei moleculare, cât și biochimice, coeficientul de corelație fiind de 0,779 [6]. Analiza clusterelor bazate pe compoziția uleiurilor și markerii RAPD scoate în evidență o corelație evidentă între profilul chimic și variabilitatea genetică la genotipurile de *S. officinalis* și *S. fruticosa* din diferite zone geografice [13].

În acest context, prezintă interes evaluarea polimorfismului genetic la unele genotipuri de *Origanum vulgare* prin analize RAPD-PCR. Cunoașterea nivelului de variație la nivel intra- și interpopulațional oferă o serie de utilizări practice în programele de monitorizare și ameliorare a plantelor cu caractere utile, conservarea genetică etc.

### Material și metode

Materialul biologic a fost reprezentat de 5 genotipuri de *Origanum vulgare*, inclusiv două colectate de pe terenurile experimentale ale Grădinii Botanice (notate convențional I, II) și trei – din flora spontană (III-V).

ADN-ul genomic a fost extras din frunzele de *Origanum* cu utilizarea soluției-tampon de 2% CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*) și cuantificat spectrofotometric [16]. Mediul de reacție PCR (15μl) a inclus: 50-60 ng ADN, dNTP 200 μM de fiecare tip, primer 0,4-0,6 μM, 1,0 unități/per reacție GoTaq ADN-polimeraza (Promega), MgCl<sub>2</sub> – 2,5 mM. Programul de amplificare: 95°C – 3 min. urmat de 35 cicluri: 95°C – 1 min., 34°C – 1 min., 72°C – 1 min. și elongarea finală 72°C – 3 min.

Ampliconii au fost analizați prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5% în prezența bromurii de etidiu 0,5 μg/ml și au fost notați conform primerului asociat cu dimensiunea ampliconului, de ex.: OPB<sub>13</sub><sup>700</sup> – amplicon cu dimensiunea de 700 pb obținut în rezultatul PCR cu primerul OPB<sub>13</sub>. Analiza RAPD a fost realizată cu 27 primeri decameri (Tab.1).

După colorarea prealabilă cu bromura de etidiu, produșii de amplificare au fost vizualizați cu ajutorul transluminatorului UV și sistemului de documentare a gelului DOC – PRINT-VX2.

Detectarea și stabilirea mărimii fragmentelor de ADN amplificate a fost realizată cu ajutorul programului TotalLab. De asemenea, a fost calculată distanța genetică dintre genotipuri, utilizând indicele similaritate Jaccard prin programul FreeTree, metoda UPGMA (Unweighted Pair Group Method based on Arithmetic mean).

**Tabelul 1**

**Primerii utilizați pentru analiza RAPD**

Primerul	Secvența	Primerul	Secvența
OPA <sub>1</sub>	5'-CAGGCCTTC-3'	OPH <sub>15</sub>	5'-AATGGCGCAG-3'
OPA <sub>2</sub>	5'-TGCCGAGCTG-3'	OPI <sub>16</sub>	5'-TCTCCGCCCT-3'
OPA <sub>06</sub>	5'-GGTCCCTGAC-3'	OPJ <sub>01</sub>	5'-CCCGGCATAA-3'
OPA <sub>9</sub>	5'-GGGTAACGCC-3'	OPU <sub>11</sub>	5'-AGACCCAGAG-3'
OPA <sub>11</sub>	5'-CAATCGCCGT-3'	OPK <sub>17</sub>	5'-CCCAGCTGTG-3'
OPA <sub>19</sub>	5'-CAAACGTCGG-3'	OPV <sub>09</sub>	5'-TGTACCCGTC-3'
OPB <sub>01</sub>	5'-GTTTCGCTCC-3'	OLIGO <sub>A1</sub>	5'-GGTGCGGGAA-3'
OPB <sub>03</sub>	5'-CATCCCCCTG-3'	OLIGO <sub>A2</sub>	5'-AAGAGCCCGT-3'
OPB <sub>10</sub>	5'-CTGCTGGGAC-3'	OLIGO <sub>A3</sub>	5'-CCCGTCAGCA-3'
OPB <sub>13</sub>	5'-TTCCCCCGCT-3'	UBC <sub>215</sub>	5'-TCACACGTGC-3'
OPG <sub>05</sub>	5'-CTGAGACGGA-3'	UBK <sub>250</sub>	5'-CGACAGTCCC-3'
OPG <sub>6</sub>	5'-GTGCCTAACC-3'	OLIGO <sub>28</sub>	5'-AGGTCCTGA-3'
OPG <sub>10</sub>	5'-AGGGCCGTCT-3'	OLIGO <sub>397</sub>	5'-GCGAACCTCG-3'
OPE <sub>17</sub>	5'-CTACTGCCGT-3'		

### Rezultate și discuții

Analiza RAPD realizată cu 27 primeri a prezentat profiluri variate în funcție de genotip și de secvența nucleotică a amorșelor utilizate în screeningul polimorfismului genetic. Astfel, cinci dintre primerii testați (OPA<sub>1</sub>, OPA<sub>6</sub>, OPB<sub>03</sub>, OLIGO<sub>A3</sub> și OLIGO<sub>28</sub>) nu au participat la amplificare, alți cinci (OPI<sub>16</sub>, OPU<sub>11</sub>, OPE<sub>17</sub>, OPU<sub>09</sub> și OPB<sub>13</sub>) au generat ampliconi doar la 1-2 genotipuri. Amorsa OLIGO<sub>391</sub> a determinat amplificare la trei din genotipurile studiate, formând șase benzi cu dimensiuni de 350-1050 pb, cu un grad de polimorfism redus – 16,7%. Restul primerilor au prezentat profiluri cu un număr variabil de ampliconi (7-16), cu lungimea cuprinsă în limitele de 160-4500 pb. Primerii RAPD au relevat un grad înalt de polimorfism între cele cinci genotipuri de *O. vulgare* incluse în studiu, 68,0% din totalul de 153 produse de amplificare fiind polimorfe. Procentul maxim al polimorfismului (cca 90%) a fost evidențiat de primerii UBC<sub>215</sub> și OPJ<sub>01</sub> care au generat zece și, respectiv, opt benzi polimorfe cu o lungime de 250-1550 pb. (Tab.2).

Numărul maxim de ampliconi (15-16) a fost generat de primerii OPB<sub>10</sub> și OPG<sub>10</sub>, în ambele cazuri fiind înregistrate câte șase benzi comune, șapte – polimorfe și trei, respectiv, două benzi specifice. De remarcat că cele trei produse de amplificare obținute cu primerul OPB<sub>10</sub> (OPB<sub>10</sub><sup>2000</sup>, OPB<sub>10</sub><sup>2500</sup> și OPB<sub>10</sub><sup>4500</sup>) sunt specifice pentru genotipul I.

Tabelul 2

## Numărul de benzi generate de primerii RAPD

Primeri	Numărul de benzi				%, polimorfism
	În total	Comune	Specifice	Polimorfe	
OLIGO <sub>A1</sub>	11	4	1	6	63,6
OLIGO <sub>A2</sub>	10	3	6	1	70,0
OPA <sub>2</sub>	11	3	2	6	72,7
OPA <sub>9</sub>	10	6	1	3	40,0
OPA <sub>11</sub>	12	4	3	5	66,7
OPB <sub>10</sub>	16	6	3	7	62,5
OPG <sub>5</sub>	7	2	-	5	71,4
OPG <sub>6</sub>	11	2	2	7	81,8
OPG <sub>10</sub>	15	6	2	7	60,0
OPH <sub>15</sub>	11	3	4	4	72,7
OPJ <sub>01</sub>	9	1	-	8	88,9
OPK <sub>17</sub>	9	2	1	6	77,8
UBC <sub>215</sub>	11	1	-	10	90,9
UBC <sub>250</sub>	10	6	-	4	40,0
<b>În total</b>	<b>153</b>	<b>49</b>	<b>25</b>	<b>79</b>	<b>68,0</b>

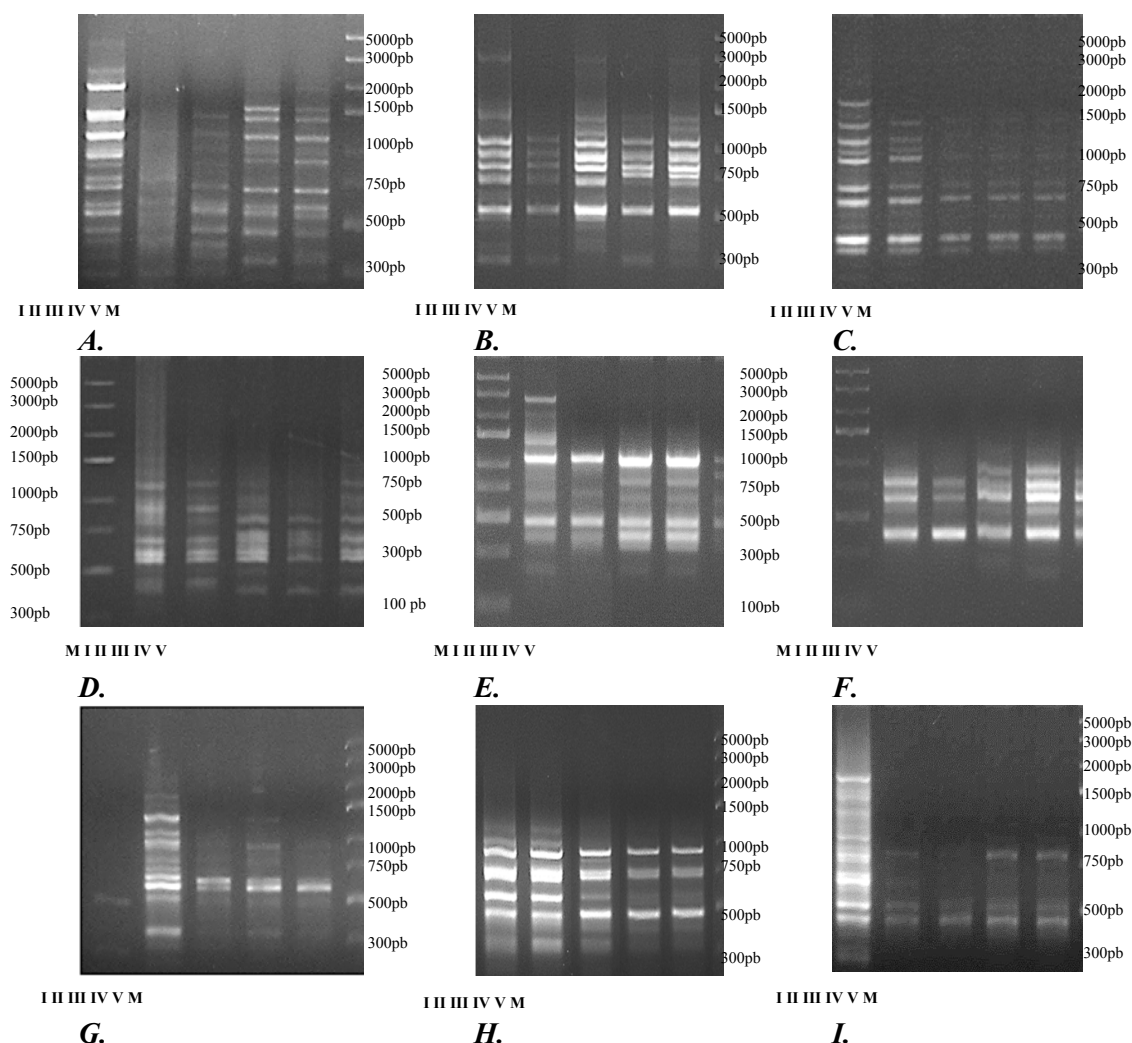
Analiza produselor de amplificare ADN denotă prezența a 49 ampliconi comuni pentru toate formele studiate, obținute, în special, la aplicarea amorselor OPA<sub>9</sub>, OPB<sub>10</sub>, OPG<sub>10</sub>, UBC<sub>250</sub> și OLIGO<sub>391</sub> care au generat câte 5-6 ampliconi, cu lungimea cuprinsă între 270 și 3600 pb.

Cele mai variate profiluri polipeptidice au fost constatate la genotipul I de *O. vulgare*, ceea ce a prezentat apariția a 16 benzi specifice, cu lungime diferită, în funcție de primer. Numărul maximal de ampliconi specifici (6) a fost relevat cu primerul OLIGO<sub>A2</sub> (OLIGO<sub>A2</sub><sup>350</sup>, OLIGO<sub>A2</sub><sup>380</sup>, OLIGO<sub>A2</sub><sup>925</sup>, OLIGO<sub>A2</sub><sup>1100</sup>, OLIGO<sub>A2</sub><sup>1380</sup> și OLIGO<sub>A2</sub><sup>1700</sup>), urmat de OPB<sub>10</sub> și OPH<sub>15</sub>, în cazul cărora au fost marcați câte patru produși specifici cu lungimea de 1300-4500 pb. (Fig.1).

Genotipul III de *O. vulgare* se distinge prin patru benzi specifice (OPA<sub>11</sub><sup>1050</sup>, OPA<sub>11</sub><sup>1750</sup>, OPB<sub>10</sub><sup>400</sup> și OPG<sub>10</sub><sup>1100</sup>), iar genotipurile V și IV prin trei (OPG<sub>10</sub><sup>1300</sup>, OPH<sub>15</sub><sup>950</sup>, OPA<sub>2</sub><sup>1050</sup>) și două (OPK<sub>17</sub><sup>550</sup>, OPA<sub>2</sub><sup>750</sup>), corespunzător.

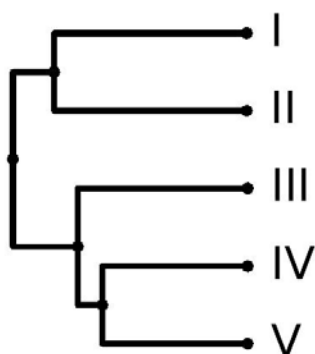
Analiza comparativă a profilurilor electroforetice obținute la genotipurile din colecția Grădinii Botanice, *O. vulgare* I și II, a evidențiat prezența a 140 benzi, dintre care 89 – monomorfe și 51 – polimorfe, constatăndu-se un polimorfism moderat de 36,4%. Diferențele dintre indivizi au fost relevate, în special, de către primerii UBC<sub>215</sub>, OPB<sub>10</sub>, OPH<sub>15</sub>, OPJ<sub>01</sub>, OLIGO<sub>A2</sub>, care au identificat câte 6-9 fragmente polimorfe. Mai puțin informativi au fost primerii OPK<sub>17</sub>, OPG<sub>5</sub>, OPA<sub>2</sub>, OPA<sub>9</sub>, OPA<sub>11</sub> și UBC<sub>250</sub>, care au format în principiu secvențe polinucleotidice comune, numărul acestora variind între 6 și 9, în funcție de primer. Genotipul I se caracterizează prin prezența unui număr mai mare de ampliconi (124), comparativ cu *O. vulgare* II (96), majoritatea fiind produse cu dimensiuni mari, cuprinse între 1000 și 4500 pb, specifice doar pentru forma dată.

În cazul indivizilor de *O. vulgare* colectați din flora spontană s-a constatat un polimorfism mai pronunțat (cca 45%). Primerii decameri au generat la cele trei forme analizate un total de 119 fragmente, inclusiv 67 – monomorfe și 52 – polimorfe. Analog genotipurilor din cultură, numărul maximal de produse de amplificare polimorfe a fost obținut cu implicarea primerului UBC<sub>215</sub>, care a relevat 9 benzi, dintre care UBC<sub>215</sub><sup>750</sup> – specifică doar pentru genotipul III, UBC<sub>215</sub><sup>800</sup>, UBC<sub>215</sub><sup>1200</sup>, UBC<sub>215</sub><sup>1400</sup> și UBC<sub>215</sub><sup>1550</sup> – caracteristice genotipului IV, iar celelalte benzi remarcate prin prezență/absență. De menționat, inclusiv, primerii OPG<sub>10</sub>, OPA<sub>2</sub> și OPA<sub>11</sub>, care au generat câte 6-7 ampliconi polimorfi. Primerii OLIGO<sub>A2</sub>, OPA<sub>9</sub> au format doar fragmente comune, iar OPG<sub>5</sub> și UBC<sub>250</sub> au evidențiat câte un produs polimorf.



**Fig.1.** Profilul ampliconilor RAPD obținuți cu primerii OPB<sub>10</sub> (A), OPG<sub>10</sub> (B), OPA<sub>9</sub> (C), OPA<sub>2</sub> (D), OPH<sub>15</sub> (E), OPG<sub>5</sub> (F), UBC<sub>215</sub> (G), UBC<sub>250</sub> (H) și OLIGOA<sub>2</sub> (I).  
I-V – genotipuri de *O. vulgare*; M – marker.

În dendrograma generată prin metoda UPGMA poate fi observată delimitarea clară a două clusterelor principale, corespunzătoare celor două populații analizate (Fig.2). Se observă că genotipurile I și II de *O. vulgare* sunt grupate împreună, iar în cazul formelor din flora spontană o similaritate mai mare se înregistrează la genotipurile IV și V.



**Fig.2.** Dendrograma obținută în urma analizei UPGMA la populațiile de *O. vulgare*.

Generalizând datele obținute, putem conchide că analizele genetice cu ajutorul markerilor RAPD au reliefat eterogenitatea genetică a populațiilor de *O. vulgare*, evidențiind un grad înalt de polimorfism inter- și intrapopulațional la cele 5 genotipuri de *O. vulgare*. Rezultatele studiului corelează cu datele din literatura de specialitate. Astfel, cu ajutorul primerilor AFLP, SAMPL și RAPD a fost evidențiat un polimorfism semnificativ la 19 genotipuri de *O. vulgare* subsp. *vulgare* [2], 14 populații de *Origanum syriacum* L. din flora spontană și șase forme de *Origanum syriacum* și *Origanum majorana* L. din cultură [1,7,10]. Brzosko (2002), Sinha (2013) și Manners (2013) au constatat variabilitatea genetică semnificativă în cadrul populațiilor de *Cypripedium calceolus*, *Pinus roxburghii* Sarg. și, respectiv, *Vanda coerulea* [3,15,17].

Se cunoaște că structura genetică a populației este determinată de influența unui șir de factori, așa ca selecția naturală și artificială, recombinări și schimburi de gene, interacțiunile dintre gene, mutațiile și migrația. Unul dintre factorii



majori ce influențează variabilitatea genetică este sistemul/tipul de reproducere [8]. În acest context, diversitatea semnificativă a populației de *O. vulgare* poate fi explicată prin faptul că aceasta este o plantă alogamă, caracterizată prin polenizarea încrucișată [11].

### Concluzii

Analiza spectrelor electroforetice obținute cu primeri arbitrari la cinci genotipuri de *Origanum vulgare* din diferite populații a pus în evidență o variabilitate genetică semnificativă și a permis să constatăm eficiența aplicării tehnicii RAPD pentru diferențierea genotipurilor. Cel mai înalt polimorfism molecular a fost relevat la analiza RAPD-PCR cu primerii OPB<sub>10</sub>, OPG<sub>10</sub> și UBC<sub>215</sub>.

### Bibliografie:

1. AKEEL, R.N., RAWASHDEH, I. et al. Genetic variation between and among *Origanum syriacum* L. and *Origanum majorana* L. populations collected from different locations in Jordan using RAPD markers. In: *Journal Crop Res.*, 2009, vol.38(1,2,3), p.245-257.
2. AZIZI, A., WAGNER, C., HONERMEIER, B., FRIEDT, W. Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. In: *Plant Syst. Evol.*, 2009, no.281, p.151-160.
3. BRZOSKO, E., WRÓBLEWSKA, A. Genetic variation and clonal diversity in island *Cephalanthera rubra* populations from the Biebrza National Park, Poland. In: *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2003, vol.143, no.1, p.99-108.
4. CHALCHAT, J.C., PASQUIER, B. Morphological and chemical studies of *Origanum* clones: *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*. In: *J. Essent. Oil. Res.*, 1998, no.10, p.119-125.
5. D'ANTUONO, L.F., GALLETI, G.C., BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). In: *Ann. Bot.* 2000, vol.86, p.471-478.
6. ECHEVERRIGARAY, S., AGOSTINI, G., ATTI-SERFINI, L., PAROUL, N., PAULETTI, G.F., SANTOS, A.C., DOS A. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol.49, no.9, p.4220-4223.
7. FATMA AYKUT TONK. Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. In: *Plant Syst. Evol.*, 2010, vol.288, p.157-165.
8. HAMRICK, J. L., AND M. J. W. GODT. Allozyme diversity in plant species. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir [eds.]. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, 1989, p.43-63.
9. IETSWAART, J.H. A taxonomy revision of the Genus *Origanum* (Labiatae). Leiden University Press. In: *Leiden Botanical Series*, 1980, vol.4. 153 p.
10. KATSIOTIS, A., NIKOLOUDAKIS, N., LINOS, A., DROSSOU, A., CONSTANTINIDIS, T. Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intragenetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. In: *Sci. Hortic.*, 2009, vol.121, p.103-108.
11. KHEYR-POUR, A. Wide nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare* L. In: *Journal of Heredity*, 1981, vol.72, Issue 1, p.45-51.
12. KLOCKE, E., LANGBEHN, J., GREWE, C., PANK, F. DNA Fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana* L. In: *Journal of herbs spices and medicinal plants*, 2002, no.9, p.171-176.
13. KUMAR, T., VASANTHA, K., HIMA BINDU, M.A., SURYANARAYANA, A.N. LOKESHA, SUKANYA, D.H. Genetic diversity in herbal spices, SYMSAC VI: Exploiting Spices Production Potential of the Deccan Region, p.64-70.
14. MASI, L., SIVIERO, P., ESPOSITO, C., CASTALDO, D., SIANO, F. Assessment of agronomic chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). In: *Bruna Laratta European Food Research and Technology*, 2006, vol.223, no.2, p.273-281.
15. MANNERS, V., KUMARIA, S., TANDON, P. SPAR methods revealed high genetic diversity within populations and high gene flow of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl (Blue Vanda), an endangered orchid species. In: *Gene*, 2013, vol.519, no.1, p.91-98.
16. MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol.8. no.19, p.4321-4326.
17. SINHA, D., SINGH, J., TANDON, P.K., KAKKAR, P., Genetic diversity of *Pinus roxburghii* sarg. collected from different Himalayan regions of India assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. In: *Toxicol Int.*, 2013, vol.20, no.3, p.208-221.

18. VIEIRA, R., GOLDSBROUGH, P., SIMON, J.E. Genetic diversity of basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. In: *J. Am. Soc. Hortic. Sciences*, 2003, vol.128, p.94-99.
19. VIEIRA, R.F., GRAYER, R.J., PATON, A., SIMON, J.E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. In: *Biochem Syst Ecol.*, 2001, vol.29, no.3, p.287-304.
20. W'GLARZ Z., E., OSIDSKA, A., GESZPRYCH, J. Intraspecific variability of wild marjoram (*Origanum vulgare* L.) naturally occurring in Poland. In: *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 2006, vol.8, p.23-26.

**Notă:** Lucrarea a fost elaborată în cadrul Proiectului bilateral moldo-român 13.820.18.06/RoA „GECOMAP – Analiza polimorfismului genetic intraspecific pentru elaborarea markerilor moleculari ai unor chemotipuri de plante medicinale și aromate.”

Prezentat la 29.05.2014