CZU:633.854.78(478) **https://doi.org/10.59295/sum1(171)2023_15**

UNELE ASPECTE ALE STUDIULUI POTENŢIALULUI GENETIC LA HIBRIZI DE FLOAREA SOARELUI ÎN CONDIȚIILE REPUBLICII MOLDOVA

Ina BIVOL, Ion BURCOVSCHII, Maria DUCA
Universitatea de Stat din Moldova

Mihail MACHIDON
Comisia de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante

În condițiile zonei de nord și sud a Republicii Moldova pe parcursul anilor 2020-2021 s-a efectuat evaluarea unor hibrizi comerciali de floarea-soarelui cu diferită proveniență în scopul selectării hibrizilor cu caractere valoroase ca surse suplimentare pentru intensificarea producției de floarea-soarelui în țară. S-a stabilit că hibrizii testați au prezentat după trăsăturile morfologice o variabilitate bogată, care în mare măsură este dependentă de genotip, proveniența acestuia și totodată condițiile climatice zonale și anuale. Lucrarea de față include date privind evaluarea potenţialului genetic la 6 hibrizi de floarea-soarelui după unele caractere cantitative (indicele suprafeței foliare, suprafața foliară, cantitatea de clorofila a și b, cantitatea de carotenoizi, înălțimea plantei, numărul de frunze, recolta medie, conținutul de ulei) şi markeri moleculari (RAPD).

Cuvinte-cheie: *Helianthus annuus, floarea-soarelui, hibrizi, potențialul genetic, caractere cantitative, analiza RAPD, marker.*

SOME ASPECTS OF THE GENETIC POTENTIAL STUDY OF SUNFLOWER HYBRIDS UNDER REPUBLIC OF MOLDOVA CONDITIONS

The evaluation of some commercial sunflower hybrids with different origins in the conditions of the northern and southern areas of the Republic of Moldova was conducted during the years 2020-2021 in order to select the hybrids having valuable traits as additional sources for intensification of sunflower production in the country. It was established that the tested hybrids have a rich variability based on the morphological traits, which is largely dependent on the genotype, its origin and also the zonal and annual climatic conditions. The present article includes the data on the genetic potential evaluation of 6 sunflower hybrids obtained by means of some quantitative traits (leaf area index, leaf surface, amount of chlorophyll a and b, amount of carotenoids, plant height, number of leaves, average yield, oil content) and molecular markers (RAPD).

Keywords*: Helianthus annuus, sunflower*, *hybrids, genetic potential, quantitative traits, RAPD analysis, marker.*

Introducere

Floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) este una din principalele culturi profitabile din Republica Moldova. Din aceste considerente pe piața internă se impun cerinţe sporite faţă de hibrizii noi creați, care au un anumit potențial de producție și toleranță la factorii biotici și abiotici și care furnizează recolte stabile în diferite condiții de mediu.

Este cunoscut, că un punct important al oricărui program de ameliorare este disponibilitatea resurselor genetice cu un grad ridicat de diversitate genetică. Pentru aceste scopuri, cel mai frecvent se utilizează metodele tradiționale, care se bazează pe o analiză comparativă a parametrilor morfologici. Cu toate acestea, caracterele morfologice sunt supuse influenței mediului ambiant, ceea ce provoacă dificultăți semnificative în utilizarea doar a metodelor clasice de evaluare. Astfel, pe lângă metodele clasice de testare a resurselor genetice este necesară și aplicarea unor tehnologii moleculare, care permit nivelarea influenței factorilor de mediu asupra rezultatelor, identificarea exactă a genotipurilor în orice stadiu al ontogenezei și obținerea unei soluții a problemei mai precisă și mai rapidă.

Una dintre cele mai populare metode moleculare în detectarea diferențelor genetice la plante este analiza polimorfismului fragmentelor amplificate aleatoriu (RAPD), care nu necesită costuri mari, este rapidă și sim-

plă în efectuarea procedurilor tehnice a procesului. Tehnica RAPD se caracterizează prin faptul că dezvăluie moștenire dominantă, poate detecta mai mulţi loci simultan, nu necesită secvențierea preliminară a obiectului de studiu, dar reproductibilitatea și informativitatea utilizării sale sunt destul de scăzute [1]. Din aceste considerente, reesă că utilizarea markerilor moleculari în combinație cu cei morfologici extinde semnificativ posibilitățile de gestionare eficientă a resurselor genetice și de optimizare a procesului de ameliorare.

În acest context, scopul cercetărilor expuse în lucrarea de față a constituit în caracterizarea hibrizilor de floarea-soarelui cu proveniență diferită, elucidarea potențialului de producție a acestora și evaluărea diversității genetice cu ajutorul markerilor morfologici și moleculari.

Materiale şi metode

În cercetările privind evaluarea diversității fenotipice și genetice au fost incluși 6 hibrizi comerciali de floarea-soarelui creaţi în cadrul diferitor companii agricole europene și locale (Tab. 1) și un set de 3 martori care s-au caracterizat prin 3 grupe de maturitate (timpurie, semitimpurie, semitardivă).

Experienţele de câmp s-au desfăşurat la 4 Staţiuni Experimentale de Testare a Soiurilor de Plante din Republica Moldova (Visoca, Pelinia, Grigorievca și Svetlîi) în 5 repetiţii pe parcursul anilor 2020-2021. În pepiniera culturilor comparative hibrizii au fost testați față de martori sub aspectul multiplelor caractere morfobiologice și agronomice. Materialul biologic, inclus în studiu a fost caracterizat după unii indicatori fenologici, fiziologici (indicele suprafeței foliare, suprafața foliară, cantitatea de clorofila a și b, cantitatea de carotenoizi), fiind efectuate măsurări biometrice, numărări şi aprecieri vizuale privind determinarea diversității fenotipice (înălţimea plantei, numărul de frunze) și de productivitate (recolta medie, conținutul de ulei).

Tabelul 1. Hibrizii de floarea-soarelui utilizați în analiză.

Nr.	Codul hibridului	Proveniența	Sursa elaborării	Țara
1.	7	Resurse locale	AMG Agroselect	Moldova
2.	11	Resurse europene	Saaten Union Romania	Germany
3.	30	Resurse europene	Syngenta	France
4.	34	Resurse europene	Limagrain	France
5.	60	Resurse europene	MAS SEEDS	France
6.	64	Resurse europene	Euralis Semences	France

ADN-ul genomic total pentru analiza RAPD a fost extras din frunze în azot lichid folosind Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791 conform protocolului producătorului (Thermo Fisher Scientific, SUA). Probele de ADN au fost totodată purificate suplimentar de ARN ribozomal și polizaharide, ce blochează modul normal al reacției de amplificare, prin intermediul soluţiei de clorură de litiu 12 M, aducând concentrația sa finală în soluție la 4 M. Calitatea și cantitatea ADN-lui a fost determinată prin metoda spectrofotometrică (model T60 UV-VIS, PG Instruments Limited, England) și electroforetică în gel de agaroză de 1%. În vederea evaluării genetice a materialului biologic luat în studiu, au fost utilizaţi 11 primeri arbitrari (Tab. 2). Temperatura de aliniere (Tm) a primerilor a fost aproximată rapid cu ajutorul formulei Tm=4x(G+C)+2x(A+T) conform recomandărilor producătorului şi determinată empiric (Thermo Fisher Scientific, SUA).

Tabelul 2. RAPD primeri incluşi în cercetare.

Nr.	Codul primerului	Secvenţa nucleotidică (5′→ 3′)	NBA	GC, %	Tm, °C
1.	OPB12	cc tt ga cg ca	10	60	36
2	OPC05	ga tg ac cg cc	10	70	38
3.	OPC07	gt cc cg ac ga	10	70	38
4.	OPF08	gg ga ta tc gg	10	60	36

5.	OPD07	tt gg ca cg gg	10	70	38
6.	OPA11	ca at cg cc gt	10	60	36
7.	OPG6	gt gc ct aa cc	10	60	36
8.	OPG10	ag gg cc gt ct	10	70	38
9.	OPE17	ct ac tg cc gt	10	60	36
10.	OPI16	tc tc cg cc ct	10	70	38
11.	OPH15	aa tg gc gc ag	10	60	36

NBA-numărul de baze azotate; GC, %-componența G și C în secvența fiecărui primer în procente; Tm-temperatura de aliniere.

Amplificarea s-a efectuat cu ajutorul amplificatorului Genset 9700 (Applied Biosystems, USA) după următorul program: 1) denaturarea initială 5 min la 95°C – 1 ciclu; 2) denaturarea 1 min la 95°C, alinierea 1 min la 36/38°C, elongarea 1 min la 72°C – 45 cicluri; 3) elongarea finală 5 min la 72°C –1 ciclu [2, p. 8.4-8.13]. Produsele amplificării au fost analizate prin electroforeză în gel de agaroză 1.6% în soluţie tampon de migrare 1xTAE (40 mM Tris-acetat, pH 8.0; 0.2 mM EDTA) la intensitatea câmpului electric de 2.5 V/oră/cm [2, p.5.4-5.13]. Pentru determinarea dimensiunilor fragmentelor amplificate din gel au fost utilizate fragmente-marker ai lungimii GeneRuler 1kb DNA Ladder SM0311 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vizualizarea probelor în gel de agaroză s-a realizat la transiluminator în raze ultraviolete cu lungimea de undă 305 nm, după ce acesta a fost colorat cu bromură de etidiu. Documentarea rezultatelor s-a efectuat prin utilizarea sistemului de fotodocumentare DOC-PRINT-VX2, model SXT-F20.M (Vilber Lourmat, France).

Prelucrarea statistică a datelor experimentale s-a realizat după Доспехов [3, p. 160-164], utilizând programul computerizat Microsoft Excel 2010. Pentru rezultatele obţinute în urma investigaţiilor au fost determinate valoarea maxima (Vmax) și minima (Vmin), valoarea mediei aritmetice ($\bar{x}$), devierea standartă ($S_{\bar{x}}$), coeficientul de variaţie (V, %) după următorele formule:

$$\bar{x} = \frac{\sum X}{n};\ S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}};\ V = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

unde Σ este simbolul de însumare; X - valorile individuale ale caracterului; n este numărul de măsurări.

Imaginile rezultate în urma reacțiilor PCR au fost analizate prin intermediul programului specializat PhotoCapt (versiunea 15.02), care a permis stabilirea mărimii fiecărui fragment amplificat. Datele generate de program au fost preluate de componența Excel a pachetului Microsoft Office 2010 transformându-le într-o matrice binară.

Nivelul de polimorfism genetic al fragmentelor amplificate (RAPD) a fost calculat după Сиволап [4]:

$$P(\%) = \frac{numarul\ de\ ampliconi\ polimorfi}{numarul\ total\ de\ ampliconi} \times 100\%$$

Conținutul informației polimorfe (PIC) sau gradul de polimorfism generat de fiecare marker RAPD în funcție de numărul de alele detectate și de distribuția frecvențelor acestora s-a calculat conform următoarei formule [5]:

$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$, unde f_i – este frecvența alelei amplificate (banda prezentă), iar $(1 - f_i)$ este frecvența alelei nule.

Puterea de descriere a primerului/lor sau abilitatea celui mai informativ primer/i de a diferenția genotipurile într-un grup s-a calculat în baza informativității relative a benzii (Ibi) și proporției genotipurilor (pi) care conțin banda (i) [6]:

$Rp = \Sigma\ Ibi$, unde $Ibi = 1 - [2\times|0{,}5 - pi|]$

Coeficientul Simpson sau potențialul de discriminare al fiecărui primer a fost calculat conform următoarei formule [7]:

$$h_j = \sum\left(\frac{1 - \sum p_i^2}{n}\right)$$

unde p_i – este frecvența alelei *i* și *n*- numărului de loci detectați de fiecare primer.

Indicele markerului (MI) este utilizat pentru a evalua eficiența unui sistem de markeri calculat conform următoarei formule [8]:

MI = PIC × EMR, unde raportul multiplex efectiv (EMR) este apreciat prin numărul total de loci (n) și numărul locilor polimorfi (n_p) per primer calculat în baza raportului:

$$EMR = n_p\left(\frac{n_p}{n}\right)$$

Determinarea distanţei genetice a fost efectuată cu ajutorul programului XLSTAT 2014 version 2014.5.03. La final, pe baza coeficientului Euclidian și metodei de clusterizare Ward, s-au construit dendograme filogenetice cu scopul depistării posibilelor asocieri genetice și morfologice a hibrizilor cercetați.

Variabilitatea genetică și relațiile genotipurilor au fost determinate prin trimiterea matricei binare la o analiză a componentelor principale (ACP) cu ajutorul programului XLSTAT versiunea 2014.5.03.

Numărul alelelor observate (Na), numărul efectiv de alele (Ne), indicele de diversitate genică Nei (H), indicele informațional Shannon (I), diversitatea genică totală (Ht), procentul de loci polimorfi (PPL) s-au determinat utilizând programul de analiză statistică POPGENE versiunea 1.32.

Rezultate și discuții

Baza genetică a germoplasmei de floarea-soarelui are o rezervă ascunsă de gene noi sau combinații ale acestora, inclusiv caractere importante pentru selecție. Studiul potențialului fondului genetic a florii-soarelui în funcție de caracterele biologice, genetice și economice principale face posibilă extinderea bazei genetice pentru implementarea cu succes a programelor de ameliorare în diferite zone.

Crearea hibrizilor cu un anumit grad de omogenitate după un șir de caractere agronomice valoroase, îmbinată cu utilizarea unor practici agronomice adecvate reduce impactul factorilor limitativi şi contribuie la creșterea randamentului de floarea-soarelui. Hibrizii autohtoni sunt mai bine aclimatizați față de condiţiile agroecologice din Moldova, comparativ cu formele străine, astfel, fiind mai atractivi pentru amelioratori și fermieri.

În studiul dat s-a constatat că hibrizii cu origine genetică diferită se repartizează în 3 grupe de maturitate și se manifestă prin diferită rezistență la parazitare cu *O. cumana* în condițiile Republicii Moldova (Tab. 3). Hibrizii din Republica Moldova (7) și Germania (11) se disting prin grupa de maturitate timpurie și rezistență slabă la lupoaie în comparație cu hibrizii francezi (30, 34, 60, 64), care s-au caracterizat prin rezistență înaltă la lupoaie și grupa de maturitate semitempurie/semitardivă.

Tabelul 3. Caracteristica hibrizilor de floarea-soarelui cu origine genetică diferită.

Nr.	Codul hibridului	Grupa de maturitate	Rezistenta la lupoaie
1.	7	timpurie	sensibil
2.	11	timpurie	sensibil
3.	30	semitimpurie	rezistent
4.	34	semitimpurie	rezistent
5.	60	semitardivă	rezistent
6.	64	semitardivă	rezistent

Hibrizii testaţi au prezentat o variabilitate bogată după trăsăturile morfologice, care în mare măsură sunt dependente de genotip, proveniența acestora și condițiile climatice zonale și anuale. Astfel, pe parcursul anilor 2020-2021, înălţimea plantelor a demonstrat că hibrizii studiați au avut diferite valori în dependență de potențialul genetic și condițiile climatice ale anului. Înălţimea plantelor este o trăsătură importantă în procesul de recoltare mecanizată a florii-soarelui, din aceste considerente amelioratorii preferând formele cu talie joasă de 1.20-1.50 m, caracterizate prin recoltă înaltă și rezistență sporită la cădere [9]. S-a constatat că înălţimea plantei în dependență de hibrid și an variază în limitele 0.97-2.70 m, media cărora pe 2 ani este cuprinsă între 1.54-2.11 m (Tab. 4).

Tabelul 4. Variabilitatea unor caractere morfologice la hibrizi de floarea-soarelui.

Caractere	Anul	Indicii statistici	Hibrizii					
			7	**11**	**30**	**34**	**60**	**64**
Înălţimea plantei, m	2020	V.max	1.73	1.58	1.79	1.91	1.92	2.10
		V.min	1.18	0.97	1.62	1.62	1.80	1.79
		X±S_x	1.47±0.29	1.34±0.27	1.73±0.08	1.76±0.15	1.86±0.05	1.91±0.15
		V, %	19.80	19.98	4.41	8.22	2.62	7.74
	2021	V.max	2.03	1.91	2.20	2.09	2.25	2.70
		V.min	1.66	1.40	1.60	1.78	1.98	2.01
		X±S_x	1.84±0.16	1.74±0.24	1.84±0.28	1.99±0.14	2.11±0.12	2.31±0.29
		V, %	8.42	13.54	14.96	7.19	5.76	12.44
	X±S_x 2020-2021		**1.66±0.29**	**1.54±0.31**	**1.79±0.20**	**1.87±0.18**	**1.99±0.16**	**2.11±0.30**
Numărul de frunze	2020	V.max	25.00	22.40	27.00	25.00	27.60	31
		V.min	18.00	18.60	24.00	19.00	23.00	25
		X±S_x	22.25±2.99	20.75±1.78	25.30±1.54	23.15±2.80	25.55±1.91	29.05±2.74
		V, %	13.44	8.56	6.07	12.08	7.46	9.45
	2021	V.max	25.20	23.00	27.00	26.00	25.60	30.8
		V.min	23.00	20.60	23.20	23.00	24.00	27
		X±S_x	23.85±1.00	22.20±1.08	25.65±1.75	24.80±1.28	24.65±0.79	29.00±1.56
		V, %	4.19	4.88	6.81	5.14	3.20	5.37
	X±S_x 2020-2021		**23.05±2.23**	**21.48±1.57**	**25.48±1.53**	**23.98±2.20**	**25.10±1.43**	**29.03±2.07**

Vmax – valoarea maxima; Vmin – valoarea minima; X±S_x – valoarea mediei aritmetice şi devierea standartă; V, % – coeficientul de variaţie.

Dintre hibrizii evaluați, în limitele menţionate se înscrie preponderent hibridul german cu media de 1.54 m. Totodată, coeficientul de variație a atins valori medii de la 2.62 până la 19.98%, fapt ce indică variabilitatea medie a caracterului în cadrul hibrizilor studiați timp de doi ani. S-a constatat că hibrizii francezi 60 și 34 sunt cei mai stabili după caracterul studiat (V=4.19% și V=7.71%%, respectiv), iar hibridul german (11) și local (7) au o variabilitate mult mai mare (V=16.76% și V=14.11%, respectiv).

Numărul de frunze variază în limitele de 18 și 31 bucăţi. Hibrizii francezi (30, 34, 60, 64) au fost evidențiați cu cel mai mare număr de frunze (în mediu 24 – 29) în comparație cu restul hibrizilor, fapt care influențează pozitiv randamentul şi conţinutul de ulei în seminţe de floarea-soarelui, ceea ce a fost observat în studiul present și în lucrările similare efectuate de Hladni et al. [10] şi Khan et al. [11]. Hibrizi 30 și 60 au fost cei mai stabili, cu coeficientul de variaţie mediu de 6.44 și 5.33 pentru 2 ani respectiv.

Caracterele asociate cu potențialul fotosintetic la hibrizii testați, inclusiv indicele suprafeței foliare variază în limitele – 1.36 și 5.54 m^2/m^2, suprafața foliară – 0.24 și 0.85 m^2, cantitatea de clorofila a – 2.56 și 3.89 mg/g, cantitatea de clorofila b – 0.78 și 1.58 mg/g, cantitatea de carotenoizi – 0.56 și 1.91 mg/g, raportul pigmenților clorofilieni Ca/Cb – 2.20 și 3.40, suma pigmenților clorofilieni Ca+Cb – 3.36 și 5.35 mg/g (Tab. 5).

Analiza valorilor privind potențialul fotosintetic la hibrizi pune în evidenţă 4 hibrizi (64, 60, 34 și 11) de origine franceză și germană care prezintă valori maximale. S-a observat că hibridul local 7 prezintă o variabilitate mai mare, în special, după caracterele indicele suprafeței foliare şi suprafața foliara, coeficientul de variație mediu pentru 2 ani constituind cca 31.41 și 28.19%, respectiv. Cantitatea de clorofilă a și b, raportul pigmenților clorofilieni Ca/Cb, suma pigmenților clorofilieni Ca+Cb s-a manifestat cu o variabilitate mărită pentru 2 ani la hibridul german 11 (V=12.56%, V=21.52%, V=13.04%, V=14.21%, respectiv). Cel mai instabil după cantitatea de carotenoizi a fost hibridul 64 (V=26.83%).

Doi hibrizi (hibridul german 11 - V=16.49% ; francez 30 - V=17.49%) au pus în evidență cel mai înalt

nivel de stabilitate după suprafața foliara și indicele suprafeței foliare, hibridul francez 64 (V=4.50%) - după cantitatea de clorofila a, hibrizii francez 60 (V=2.97%) și local 7 (V=3.36%) –după cantitatea de clorofila b, hibridul local 7 (V=3.36%) - după cantitatea de carotenoizi, hibridul francez 30 (V=4.28%) - după raportul pigmenților clorofilieni Ca/Cb, hibrizii francezi 64 și 60 (V=6.02%, V=6.30%, respectiv) - după suma pigmenților clorofilieni Ca+Cb (Tab. 5).

Tabelul 5. Potențialul fotosintetic la hibrizi de floarea-soarelui.

Caractere	Anul	Indicii statistici	Hibrizii					
			7	**11**	**30**	**34**	**60**	**64**
Indicele suprafeței foliare, m^2/m^2	2020	V. max - min	2.95 - 1.36	2.86 - 1.84	4.10- 3.10	3.22 -1.49	3.85 -3.29	4.42 - 2.29
		$X\pm S_x$	2.05±0.73	2.28±0.44	3.39±0.48	2.48±0.79	3.63±0.26	3.41±0.87
		V, %	35.45	19.39	14.11	31.95	7.26	25.61
	2021	V. max - min	3.73 - 2.02	2.81 - 2.08	4.03 - 2.55	3.11 - 2.18	5.54 - 2.52	3.95 -2.58
		$X\pm S_x$	2.89±0.79	2.61±0.35	3.12±0.65	2.78±0.44	3.87±1.40	3.44±0.60
		V, %	27.36	13.59	20.87	15.76	36.12	17.37
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**2.47±0.83**	**2.44±0.41**	**3.25±0.55**	**2.63±0.61**	**3.75±0.94**	**3.43±0.70**
Suprafața foliară, m^2	2020	V. max - min	0.41 - 0.24	0.41 - 0.32	0.57 - 0.44	0.53 - 0.26	0.77 - 0.58	0.62 - 0.40
		$X\pm S_x$	0.32±0.10	0.37±0.04	0.53±0.06	0.39±0.11	0.66±0.09	0.56±0.11
		V, %	29.93	10.88	11.83	27.85	12.81	18.94
	2021	V. max - min	0.67 - 0.40	0.49 - 0.41	0.62 - 0.39	0.54 - 0.38	0.85 - 0.52	0.72 - 0.56
		$X\pm S_x$	0.54±0.14	0.47±0.04	0.52±0.12	0.50±0.08	0.68±0.16	0.64±0.08
		V, %	26.44	7.81	22.84	16.09	23.61	11.63
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**0.43±0.16**	**0.42±0.06**	**0.52±0.09**	**0.45±0.11**	**0.67±0.12**	**0.60±0.10**
Cantitatea de clorofilă a, mg/g	2020	V. max - min	3.27 - 2.76	3.54 - 2.58	3.36 - 2.56	3.89 - 3.14	3.82 - 3.08	3.77 - 3.40
		$X\pm S_x$	3.01±0.23	2.92±0.422	3.02±0.34	3.42±0.33	3.53±0.32	3.60±0.19
		V, %	7.49	14.46	11.29	9.62	9.01	5.28
	2021	V. max - min	3.38 - 3.02	3.32 - 2.61	3.41 - 3.00	3.78 - 3.20	3.85 - 3.28	3.74 - 3.45
		$X\pm S_x$	3.17±0.15	2.92±0.31	3.15±0.19	3.55±0.27	3.58±0.24	3.55±0.13
		V, %	4.82	10.66	6.02	7.63	6.77	3.71
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**3.09±0.20**	**2.92±0.34**	**3.09±0.27**	**3.48±0.29**	**3.56±0.26**	**3.57±0.15**
Cantitatea de clorofila b, mg/g	2020	V. max - min	1.13 - 0.89	1.24 - 0.78	1.19 - 0.99	1.40 - 1.04	1.23 - 1.14	1.58 - 1.09
		$X\pm S_x$	1.02±0.13	0.98±0.21	1.09±0.08	1.24±0.17	1.19±0.05	1.29±0.22
		V, %	12.83	21.55	7.58	13.77	4.07	16.69
	2021	V. max - min	1.42 - 0.98	1.26 - 0.81	1.26 - 1.08	1.34 - 1.02	1.21 - 1.16	1.28 - 1.15
		$X\pm S_x$	1.22±0.21	1.02±0.22	1.13±0.09	1.21±0.15	1.19±0.02	1.22±0.07
		V, %	17.58	21.49	7.61	12.03	1.87	5.31
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**1.12±0.19**	**1.00±0.20**	**1.11±0.08**	**1.23±0.15**	**1.19±0.04**	**1.25±0.15**

Cantitatea de carotenoizi, mg/g	2020	V. max - min	0.79 - 0.74	0.78 - 0.56	0.77 - 0.59	0.94 - 0.79	0.92 - 0.67	0.91 - 0.85
		$X\pm S_x$	0.77±0.025	0.68±0.098	0.71±0.08	0.85±0.06	0.84±0.12	0.88±0.03
		V, %	3.20	14.34	11.13	7.58	14.28	3.51
	2021	V. max - min	0.88 - 0.81	0.88 - 0.68	0.90 - 0.76	0.94 - 0.76	0.94 - 0.75	1.91 - 0.74
		$X\pm S_x$	0.84±0.029	0.78±0.088	0.83±0.06	0.88±0.08	0.87±0.08	1.09±0.55
		V, %	3.51	11.27	6.96	9.36	9.62	50.15
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**0.81±0.05**	**0.73±0.10**	**0.77±0.09**	**0.87±0.07**	**0.86±0.10**	**0.99±0.38**
Ca/Cb	2020	V. max - min	3.26 - 2.73	3.32 - 2.61	2.88 - 2.59	3.03 - 2.50	3.20 - 2.67	3.11 - 2.39
		$X\pm S_x$	2.96±0.23	3.02±0.35	2.77±0.13	2.78±0.22	2.98±0.23	2.82±0.31
		V, %	7.61	11.57	4.50	7.74	7.79	11.09
	2021	V. max - min	3.08 - 2.20	3.40 - 2.37	2.94 - 2.70	3.17 - 2.58	3.18 - 2.78	3.03 - 2.79
		$X\pm S_x$	2.66±0.40	2.92±0.42	2.79±0.11	2.94±0.27	3.02±0.20	2.92±0.10
		V, %	15.02	14.51	4.06	9.25	6.48	3.31
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**2.81±0.34**	**2.97±0.36**	**2.78±0.11**	**2.86±0.24**	**3.00±0.20**	**2.87±0.22**
Ca+Cb	2020	V. max - min	4.40 - 3.68	4.77 - 3.36	4.54 - 3.55	5.29 - 4.18	5.06 - 4.23	5.35 - 4.49
		$X\pm S_x$	4.03±0.35	3.90±0.62	4.11±0.42	4.65±0.48	4.72±0.35	4.89±0.40
		V, %	8.56	15.79	10.27	10.35	7.35	8.12
	2021	V. max - min	4.75 -4.00	4.47 - 3.47	4.67 - 4.10	5.09 - 4.22	5.06 - 4.46	5.02 - 4.62
		$X\pm S_x$	4.38±0.33	3.94±0.50	4.29±0.27	4.76±0.38	4.77±0.25	4.76±0.19
		V, %	7.57	12.63	6.23	7.94	5.24	3.92
	$X\pm S_x$ 2020-2021		**4.20±0.37**	**3.92±0.52**	**4.20±0.34**	**4.71±0.41**	**4.74±0.28**	**4.83±0.30**

Vmax – valoarea maxima; Vmin – valoarea minima; $X\pm S_x$ – valoarea mediei aritmetice şi deviere standardă; V, % – coeficientul de variaţie; Ca/Cb- raportul pigmenţilor clorofilieni; Ca+Cb- suma pigmenţilor clorofilieni.

Analiza însuşirilor de productivitate a relevat că limitele de variaţie ale recoltei medii au fost cuprinse între 0.84 şi 4.62 t/ha, iar ale conţinutului de ulei – 41.80 şi 46.30 % (Tab. 6). Cele mai mici valori după recolta medie au prezentat hibridul german 11 (cu 2.23 t/ha) și local 7 (2.65 t/ha), iar cele mai mici valori de ulei au fost puse în evidență la hibridul francez 30 (44.15%). Deci, hibrizii francezi 64, 60, 34 și 30 s-au remarcat ca hibrizi perspectivi cu recolta medie de 3.08, 3.54, 3.68 și 3.92 t/ha, respectiv. Prin valorile înalte a conținutului de ulei au fost evidențiate hibrizii 11, 64, 7, 60 și 34 (45.05, 44.78, 44.68, 44.65 și 44.60%, respectiv).

De menționat că hibrizii francezi, privind caracterul de recolta medie, sunt mai stabili în condițiile Republicii Moldova, având coeficientul de variaţie de la 8.52 până la 24.99%, în comparație cu hibridul german și local (V=47.12 și V=40.14%, respectiv). După conținutul de ulei toți hibrizii reflectă o variabilitate similară și destul de mică cuprinzând valori de la 1.93 până la 2.55%.

Totodată, evaluarea productivității hibrizilor testați în comparație cu martorul a pus în evidență 3 hibrizi francezi (34, 60, 30) ce prezintă valori maximale ale recoltei medii, depășind martorul cu 3-9.70%. Hibrizii obţinuţi din sursele locale (7) și europene (34, 11) depăşesc martorul după conținutul de ulei cu cca 0.20-1.00% (Tab. 6).

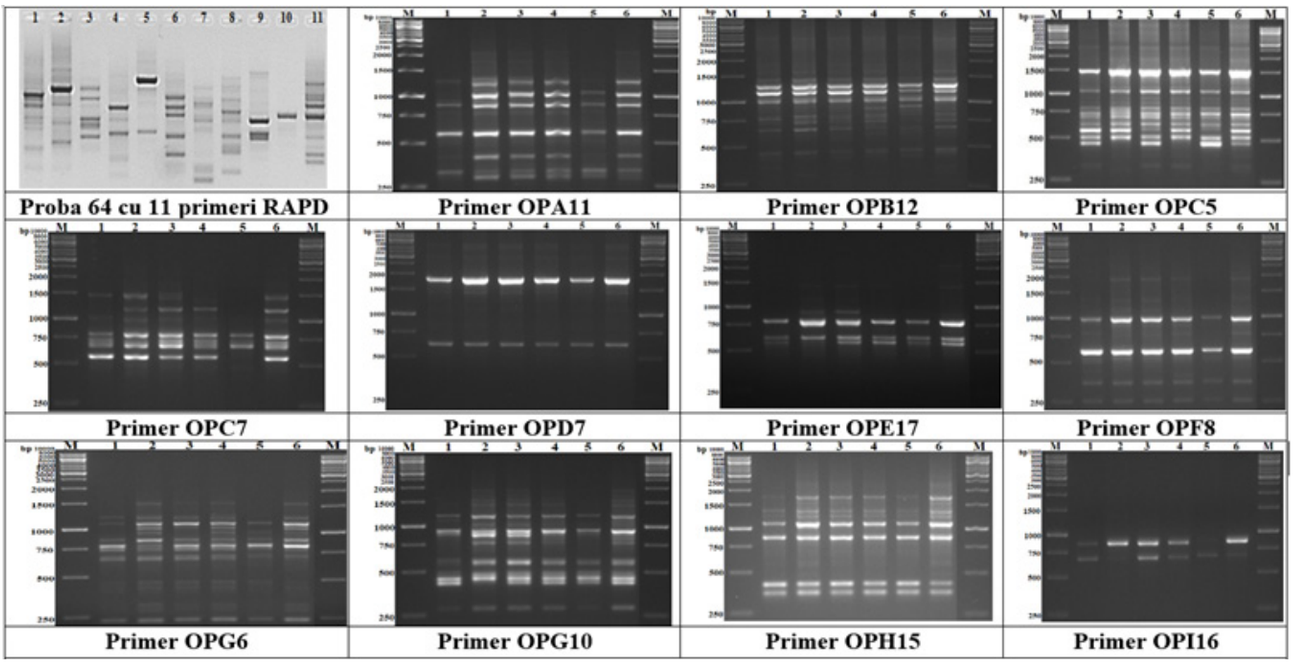
Tabelul 6. Variabilitatea productivității la hibrizii de floarea-soarelui comparativ cu martorul.

Anul	Indicii statistici	Hibrid, martor								
		Martor 1	**7**	**11**	**Martor 2**	**30**	**34**	**Martor 3**	**60**	**64**
Recolta medie, t/ha										
2020	V.max	3.87	3.35	3.17	3.70	4.13	4.19	4.02	4.32	3.59
	V.min	2.3	1.14	0.84	2.57	3.13	2.37	2.42	2.52	2.16
	$X \pm S_x$	3.20±0.66	2.34±1.14	2.02±0.99	3.34±0.52	3.50±0.44	3.53±0.81	3.26±0.66	3.58±0.76	3.07±0.64
	V, %	20.59	48.55	49.01	15.55	12.51	22.85	20.36	21.33	20.86
2021	V.max	4.42	3.87	3.81	4.10	4.62	4.02	3.86	4.13	4.15
	V.min	3.12	1.74	1.45	3.62	4.22	3.61	2.97	3.19	1.95
	$X \pm S_x$	3.63±0.58	2.96±0.94	2.45±1.11	3.81±0.22	4.33±0.20	3.83±0.17	3.38±0.39	3.50±0.43	3.09±0.90
	V, %	16.06	31.73	45.22	5.71	4.52	4.40	11.64	12.17	29.12
$X \pm S_x$, 2020-2021		**3.42±0.62**	**2.65±1.02**	**2.23±1.00**	**3.58±0.45**	**3.92±0.54**	**3.68±0.56**	**3.32±0.51**	**3.54±0.57**	**3.08±0.72**
% faţă de martor		**100**	**75.75**	**63.40**	**100**	**109.70**	**103.00**	**100**	**106.65**	**92.50**
Conținutul de ulei, %										
2020	V.max	45.9	46.00	46.30	45.80	45.50	45.70	46.30	46.00	46.10
	V.min	45.8	45.30	45.70	45.60	45.10	45.20	46.10	45.70	45.70
	$X \pm S_x$	45.85±0.07	45.65±0.49	46.00±0.42	45.70±0.14	45.30±0.28	45.45±0.35	46.20±0.14	45.85±0.21	45.90±0.28
	V, %	0.15	1.08	0.92	0.31	0.62	0.78	0.31	0.46	0.62
2021	V.max	44.7	44.90	45.40	44.60	44.20	44.70	45.30	44.70	45.00
	V.min	42.2	42.50	42.80	42.20	41.80	42.80	42.50	42.20	42.30
	$X \pm S_x$	43.45±1.77	43.70±1.70	44.10±1.84	43.40±1.70	43.00±1.70	43.75±1.34	43.90±1.98	43.45±1.77	43.65±1.91
	V, %	4.07	3.88	4.17	3.91	3.95	3.07	4.51	4.07	4.37
$X \pm S_x$, 2020-2021		**44.65±1.72**	**44.68±1.52**	**45.05±1.55**	**44.55±1.65**	**44.15±1.66**	**44.60±1.27**	**45.05±1.75**	**44.65±1.73**	**44.78±1.71**
% faţă de martor		**100**	**100.2**	**101**	**100**	**99.1**	**100.2**	**100**	**99.1**	**99.4**

V.max – valoarea maximă; V.min – valoarea minimă; $X \pm S_x$ – valoarea mediei aritmetice și devierea standardă; V, % –coeficientul de variaţie.

Determinarea polimorfismului genetic prin metoda RAPD cu 11 primeri, pentru a spori reproductibilitatea separării produşilor de amplificare, s-a efectuat în cel puţin 2 repetiţii ale reacţiilor PCR şi s-au comparat rezultatele obţinute pentru fiecare hibrid în parte, fiind marcate şi luate în studiu doar benzile clare de ADN amplificate (Fig. 1).

Fig. 1. Electroforegrama produşilor de amplificare a hibrizilor de floarea-soarelui cu 11 primeri în gel de agaroza 2%. M – marker GeneRuler 1kb DNA Ladder SM0311(Thermo Fisher Scientific, USA), 1 – hybrid 7, 2 –hybrid 11, 3 – hybrid 30, 4 –hybrid 34, 5 – hybrid 60, 6 – hybrid 64.



Genotiparea moleculară cu ajutorul primerilor arbitrari a permis identificarea unor fragmente de ADN comune, polimorfe şi specifice, în total generând 100 loci amplificate de mărimi diferite (Fig. 1, Tab. 7). Fragmentele rezultate prin amplificare au avut lungimea cuprinsă între 237 şi 2540 pb. În urma testării s-au depistat de la 2 (primer OPI16) până la 15 (primer OPC05) loci amplificate, variind în funcție de hibrid și primer.

Prezenţa a 43 fragmente comune de ADN pentru 10 primeri, excepție constituind doar primerul OPI16, identifică regiunile conservătoare a genomului, care demonstrează similaritatea de origine a hibrizilor cercetaţi (Fig. 1, Tab. 7). E necesar de remarcat faptul că prezenţa 53.70% de cazuri a fragmentelor de ADN polimorfe (valoarea medie p/u 11 primeri) în profilul hibrizilor studiate a demonstrat un polimorfism relativ înalt, care se datorează prezenţei în genomul speciei *H. annuus* spectrelor înalt repetetive (Fig. 1, Tab. 7). Gradul maximal de 100% polimorfism a fost determinat în cazul utilizării primerului OPI16.

Analiza profilelor RAPD la un șir de hibrizi de floarea-soarelui a pus în evidenţă fragmentele specifice detectate cu primerii OPB12 (1588pb, pentru hibridul francez 64), OPC07 (1470pb, pentru hibridul francez 30), OPC05 (756pb, pentru hibridul german 11), OPA11 (1121pb, p/u 11) și OPG6 (434pb, pentru 11).

Tabelul 7. Caracteristicile markerilor RAPD analizate la diferiți hibrizi de *Helianthus annuus* L.

Primer	Intervalul de lungime ampliconi (pb)	Numărul ampliconilor				NP,%	PIC	hj	Rp	MI	EMR
		total	comune	poli-morfe	specifice						
OPB12	459-1600	12	4	7	1	58.33	0.25	0.47	16.33	1.04	4.08

OPC05	307-2540	15	9	5	1	33.33	0.13	0.73	26	0.22	1.67
OPC07	533-1470	8	2	5	1	62.50	0.29	0.44	11.33	0.91	3.13
OPF08	247-1859	7	4	3	0	42.86	0.20	0.54	11	0.26	1.29
OPD07	603-1756	3	2	1	0	33.33	0.17	0.42	5	0.06	0.33
OPA11	305-2147	12	3	8	1	66.67	0.30	0.45	16.33	1.60	5.33
OPG6	237-1512	14	5	8	1	57.14	0.27	0.52	20.33	1.22	4.57
OPG10	292-1875	14	5	9	0	64.29	0.27	0.55	21	1.54	5.79
OPE17	531-902	4	2	2	0	50.0	0.18	0.45	6.33	0.18	1
OPI16	695-903	2	0	2	0	100	0.28	0.19	3.33	0.56	2
OPH15	365-2315	9	7	2	0	22.22	0.10	0.71	15.67	0.05	0.44
Total		**100**	**43**	**52**	**5**	-	-	-	-	-	-
Media± SD	**237-2540**	**9.09**	**3.91**	**4.73**	**0.45**	**53.70**	**0.22±0.02**	**0.50±0.04**	**13.88±2.17**	**0.69±0.18**	**2.69±0.60**

*NP- nivel de polimorfism; PIC – conținutul informației polimorfe; ±SD – devierea standard*ă; Rp – *puterea de rezolvare a primerului; h_j– coeficientul Simpson.*

Analiza diversității genetice pentru cei 6 hibrizi de floarea-soarelui a constatat valori înalte de alele observate (Na=1.57), alele effective (Ne=1.39), indicele de diversitate genică Nei (H=0.23), indicele informațional Shannon (I=0.33), diversitatea genică totală (Ht=0.23), procentul de loci polimorfi (PPL=57%), relevând o variabilitate înaltă a secvențelor RAPD la hibrizii studiați (Tab. 8).

Tabelul 8. Valorile parametrilor diversităţii genetice obținuți în baza markerilor RAPD la hibrizii de floarea-soarelui.

Hibrid	Na	Ne	H	I	Ht	PPL, %
Gr1 (7+11)	1.40±0.49	1.40±0.49	0.20±0.25	0.28±0.34	0.20 ±0.06	40.00
Gr2 (30+34)	1.22±0.42	1.22±0.42	0.11±0.21	0.15±0.29	0.11±0.04	22.00
Gr3 (60+64)	1.36±0.48	1.36±0.48	0.18±0.24	0.25±0.33	0.18±0.06	36.00
6 hibrizi în total	1.57±0.50	1.39±0.38	0.23±0.21	0.33±0.30	0.23±0.04	57.00

*Na – numărul de alele observate; Ne – numărul efectiv de alele; H – indicele de diversitate genică Nei I – indicele informațional Shannon; Ht – diversitatea genică totală; PPL – procentul de loci polimorfi; ± devierea standard***ă.**

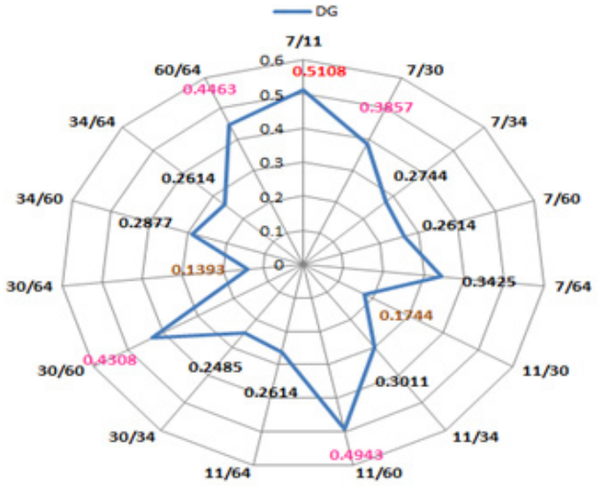
În cazul analizei comparative a hibrizilor de interes comasate în 3 grupe după maturitate a pus în evidență că cel mai mic număr de alele observate (Na=1.22), allele effective (Ne=1.22), indicele de diversitate genică Nei (H=0.11), indicele informațional Shannon (I=0.15), diversitatea genică totală (Ht=0.11), procentul de loci polimorfi (PPL=22.00%) s-a identificat la grupa 2 formată din hibrizii francezi 30 și 34, care sunt semitimpurii și rezistenți la lupoaie.

În cazul grupei 1 compusă din hibridul 7 local și 11 german (timpurii, sensibili la lupoaie) s-au depistat valori de alele observate (Na=1.40), allele effective (Ne=1.40), indicele de diversitate genică Nei (H=0.20), indicele informațional Shannon (I=0.28), diversitatea genică totală (Ht=0.20), procentul de loci polimorfi (PPL=40%) mai mărite în comparație cu grupa 2 și 3. În plus, trebue remarcat faptul că grupa 3, constituită din hibrizii francezi 60 și 64 (semitardivi, rezistenți la lupoaie), s-a caracterizat prin valori medii de diversitate genică.

Adițional, s-a determinat distanţa genetică și s-a relevat că cele mai mici valori a distanţei genetice sunt 0.1393 şi 0.1744, care se observă între hibrizii francezi 30/64 și hibridul german cu francez 11/30, respectiv (Fig. 2). Această apropiere este confirmată şi prin dendograma pentru markerii RAPD din figura 3, în cadrul căruia se evidențiază clusterul 2 format din hibrizii sus numiți. Cea mai mare distanţă genetică se află

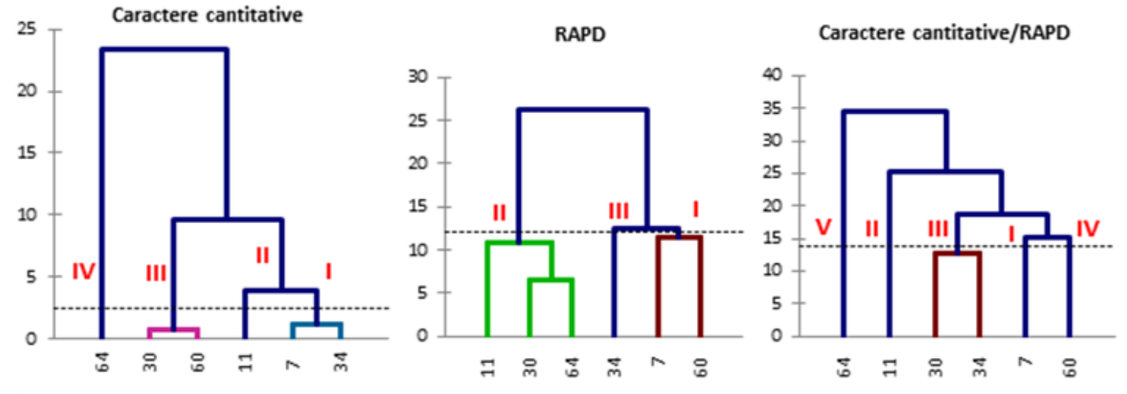
între hibrizii 7 local şi 11 german (0.5108). Diferențe semnificative au fost constatate și între hibrizii 11/60 (0.4943), 60/64 (0.4463), 60/30 (0.4308) și 7/30 (0.3857), iar cele medii au fost observate între hibrizii 7/64 (0.3425), 11/34 (0.3011), 34/60 (0.2877), 7/34 (0.2744), 7/60 (0.2614), 34/64 (0.2614), 11/64 (0.2614), 30/34 (0.2485) (Fig. 2).

Fig. 2. Perechi comparative între hibrizi de floarea-soarelui pe baza valorilor matricei de distanță genetică (metoda Nei's unbiased measures) obținuți cu primerii RAPD.



Ulterior, pentru a evalua mai complet diversitatea genetică și depistarea asocierilor caracterelor de interes cu markerii moleculari pentru materialul hibrid luat în studiu s-au construit dendrograme în baza markerilor morfologici, moleculari și totodată a markerilor morfologici/moleculari în complex (Fig. 3). Rezultatele obținute relevă un grad înalt de asociere a hibrizilor după caracterele cantitative, ceea ce nu se reflectă în cazul dendrogramelor realizate în baza fragmentelor RAPD și, totodată, caracterelor cantitative/RAPD. *În* cadrul prezentului studiu de clusterizare un anumit grad de înrudire a hibrizilor în funcție de proveniența geografică nu a fost semnalat.

Fig. 3. Dendrogramele generate prin intermediul markerilor morfologici și moleculari pe baza matricei de distanța genetică Euclidian dintre hibrizii de H. annuus folosind metoda Ward: 7, 11, 30, 34, 60, 64 – hibrizi; I, II, III, IV, V – grupe de clusterizare.



Concluzii

Totalizând rezultatele analizei caracterelor cantitative la 6 hibrizi de floarea soarelui cu origine diferită în perioada de 2 ani, putem menţiona, că în condiţiile agroclimaterice ale Republicii Moldova doi hibrizi cu origine franceză (60 și 34) după majoritatea caracterilor și alți 3 hibrizi (64, 30 francezi și 11 german) după unele caractere s-au dovedit a fi cei mai promițători în contextul asigurării managementului durabil al ecosistemelor agricole.

Variația polimorfismului genetic în limitele de la 22.22 până la 100% pentru diferiţi primeri şi hibrizi dă dovadă că hibrizii cercetați sunt destul de eterogeni. Fragmentele specifice detectate cu primerii RAPD la

hibrizii speciei *H. annuus* prezintă un interes deosebit în calitate de markeri specifici a hibridului/speciei, ce indică prezența de variabilitate mai largă la populațiile hibride și pot fi folosite ca un instrument molecular în genotipare sau paşaportizarea hibrizilor.

În urma analizei statistice legate de eficiența și informativitatea markerilor RAPD, utilizați în evaluarea diversității genetice a hibrizilor de interes prin prizma coeficienților de diferențiere (PIC, hj , Rp, MI și EMR), s-au evidențiat 4 primeri cei mai efectivi: OPG10, OPG6, OPA11, OPB12.

Generalizând datele obținute prin analiza parametrilor diversității genetice, putem constata că hibrizii 7 local și 11 german sunt cei mai heterogeni și nestabili față de factori biotici din tot setul de studiu.

Prin urmare, în toate cazurile analizate pentru distanța genetică s-a relevat că hibrizii studiați reprezintă un material genetic relativ heterogen. Rezultatele obținute relevă un anumit grad de înrudire și îndepărtare genetică a hibrizilor fără legătură cu proviniența geografică.

Clusterizarea, efectuată în baza caracterilor cantitative și profilelor moleculare RAPD, a format în toate 3 cazuri grupe diferite după număr și de lincaj, ce confirmă rezultatele similare obținute prin alte cercetări legate de aplicarea slab efectivă a markerilor RAPD în ameliorarea asistată de markeri moleculari.

Referințe:

1. КАНУКОВА, К. Р., ГАЗАЕВ, И. Х., САБАНЧИЕВА, Л. К., БОГОТОВА, З. И., АППАЕВ, С. П. ДНК-маркеры в растениеводстве. В: *Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН*, 2019, вып. 92, № 6, с. 220-232. ISSN: 1991-6639.
2. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. *Molecular cloning*. *A laboratory manual.* Vol. I-III. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 1885 p.
3. ДОСПЕХОВ, Б. А. *Методика полевого опыта.* Москва: Агропромиздат, 1985, 351 с.
4. СИВОЛАП, Ю. М., СОЛОДЕНКО, А. Е., БУРЛОВ, В. В. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus*). В: *Генетика.* 1998, том 34, № 2, с. 266-271. ISSN: 0016-6758.
5. ROLDÁN-RUIZ, I., DENDAUW, J., VAN BOCKSTAELE, E., DEPICKER, A., DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). In: *Molecular Breeding*, 2000, vol.6, no.2, p.125-134. ISSN:1380-3743.
6. PREVOST, A., WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, vol. 98, no.1, p. 107-112. ISSN: 0040-5752.
7. LÜDTKE, R., AGOSTINI, G., MIOTTO, S.T.S., SOUZA-CHIES, T.T. Characterizing *Polygala L.* (Polygalaceae) *s*pecies in Southern Brazil using ISSR. In: *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, vol. 28, no. 2, p. 317-323. ISSN: 0735-9640.
8. POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY, S., RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. In: *Molecular Breeding*, 1996, vol. 2, no. 3, p. 225-238. ISSN: 1380-3743.
9. ĆIRIĆ, M., JOCIĆ, S., CVEJIĆ, S., JOCKOVIĆ, M., ČANAK, P., MARINKOVIĆ, R., IVANOVIĆ, M. Combining abilities of new inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: *Genetika*, 2013, vol. 45, no. 2, p. 289-296. ISSN: 0534-0012.
10. HLADNI, N., JOCIC, S., MIKLIC, V., MIJIC, A., SAFTIĆ-PANKOVIĆ, D., ŠKORIĆ, D. Effect of morphological and physiological traits on seed yield and oil content in sunflower. In: *Helia*, 2010, vol. 33, no. 53, p.101-116. ISSN: 1018-1806.
11. KHAN, H., ALI, S., AHMAD, I., KHAN, I., HUSSAIN, S., KHAN, B.A., SUHAIB, M. Agronomic and qualitative evaluation of different local sunflower hybrids. In: *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 2018, vol. 31, no. 1, p. 69-78. ISSN: 0251-0480.

Date despre autori:

Ina BIVOL, doctor în științe biologice, cercetător științific superior, Centrul de Cercetări Științifice Genetică Funcțională, CCȘ „Biologie și Pedologie”, Universitatea de Stat din Moldova.
E-mail: bivolinga@yahoo.com
ORCID: 0000-0002-6052-1540

***Ion BURCOVSCHI**,* doctorand, Școala doctorală Științe Biologice, Geonomice, Chimice și Tehnologice, cercetător științific stagiar, Centrul de Cercetări Științifice Genetică Funcțională, CCȘ „Biologie și Pedologie”, Universitatea de Stat din Moldova.
E-mail: burcowski@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4417-3846

***Maria DUCA**,* academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, cercetător științific principal, șeful Centrului de Cercetări Științifice Genetică Funcțională, CCȘ „Biologie și Pedologie”, Universitatea de Stat din Moldova.
E-mail: mduca2000@yahoo.com
ORCID: 0000-0002-5855-5194

Mihail MACHIDON, doctor în științe agricole, directorul Comisiei de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante.
E-mail: mihail.machidon@cstsp.md

***Notă:** Rezultatele expuse în lucrare au fost obținute în cadrul proiectului din Programul de Stat 20.80009.5107.01 - Studii genetico-moleculare şi biotehnologice ale florii-soarelui în contextul asigurării managementului durabil al ecosistemelor agricole.*

Prezentat la 31.03.2023