

Защита и иммунитет

МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ *Orobanche cumana* Wallr. ИЗ РОССИИ, КАЗАХСТАНА И РУМЫНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

С.З. Гучетль,
кандидат биологических наук
Т.С. Антонова,
доктор биологических наук
Т.А. Челюстникова,
старший научный сотрудник

ГНУ ВНИИМК Россельхозакадемии
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. Филатова, д. 17
Тел.: (861)275-86-53
E-mail: antonova-ts@mail.ru

Изучено молекулярно-генетическое разнообразие популяций заразики *O. cumana*, паразитирующей на подсолнечнике в России, Румынии и Казахстане, с использованием кодоминантных микросателлитных маркеров. При кластерном анализе популяции заразики разделились на два кластера, независимо от их расового состава. Один группировал 19 образцов из России и Казахстана, представляющих собой один генетический пул, а другой – 5 популяций из Румынии, объединенные во второй пул. Генетическая дистанция между кластерами по Неи составила 0,137. Анализ молекулярной вариации AMOVA выявил, что 22 % от общей дисперсии обусловлено различиями между генетическими пулами, а большая часть дисперсии – 78 % – различиями между индивидами внутри каждого пула. Парные сравнения, выполненные при помощи F статистики Райта показали, что различия между этими двумя генетическими пулами достаточны ($F_{st} = 21,9\%$), чтобы говорить о существовании небольшой генетической дифференцированности между ними. Основные показатели генетической изменчивости для каждого из двух пулов выявили, что популяции заразики из стран бывшего СССР характеризуются более высоким уровнем внутривнутрипульного разнообразия, нежели популяции из Румынии. Молекулярно-генетические различия между популяциями заразики, паразитирующей на подсолнечнике на постсоветском пространстве и в Румынии, были незначительны. Обсуждаются возможные причины полученных результатов.

The interpopulation genetic differentiation of *Orobanche cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania by using molecular genetic markers. Guchetl S.Z., Antonova T.S., Chelyustnikova T.A.

The molecular genetic diversity of broomrape populations of *O. cumana*, parasitizing on sunflower in Russia, Romania, and Kazakhstan, by using codominant microsatellite markers was studied. During cluster analysis the broomrape populations were divided into two clusters, regardless of their racial composition. One cluster grouped 19 samples from Russia and Kazakhstan, representing one gene pool, and the other – 5 populations from Romania, combined into second gene pool. The genetic distance between clusters according to Nei was 0.137. The analysis of molecular variance AMOVA revealed that 22 % of the overall dispersion was due to the differences among the genetic pools and the most part of dispersion – 78 % – was due to the differences between individuals within each genetic pool. The pairwise comparisons made using Wright's F statistics showed that the differences between these two genetic pools are sufficient ($F_{st} = 21.9\%$) to state the existence of a small genetic differentiation between them. Descriptive population genetic statistics for each of the two pools showed that the broomrape populations from the former Soviet Union countries are characterized by a higher level of intrapopulation diversity than the populations from Romania. Mo-

lecular genetic differences between broomrape populations parasitizing on sunflower on the post-Soviet territory and in Romania were insignificant. Possible reasons for these results are being discussed.

Ключевые слова: зарази́ха, подсолнечник, SSR-локусы, генетическое сходство

УДК 582.952.6:633.854.78

Зарази́ха подсолнечная (*Orobanchе ситана* Wallr.) – облигатный паразит из высших растений, паразитирующий на корнях подсолнечника. При сильном поражении зарази́хой потери урожая подсолнечника могут достигать 100 %. Так же, как и в других странах, в России повсеместная интенсификация возделывания подсолнечника как высокодоходной культуры в последнее десятилетие привела к формированию высоковирулентных биотипов зарази́хи, преодолевших устойчивость возделываемого сортамента [1].

Актуальны исследования эволюции паразита и генетической структуры популяций для понимания закономерностей его развития в разных странах и выработки долгосрочной стратегии контроля над ним [2; 3].

Молекулярно-генетические различия между популяциями *O. ситана* из разных стран уже изучались [4; 5; 6]. С использованием техники RAPD ПЦР было показано, что популяции *O. ситана* из Болгарии, Испании, Румынии и Турции обладают малой внутривидовой изменчивостью и между индивидами из различных географических областей происходит очень небольшой генный обмен [7]. Показан слабый полиморфизм популяций *O. ситана* из Испании, Югославии и Румынии [4]. Выявлено существование двух отдаленных генофондов в двух провинциях Испании: одного в Куэнка и другого – в Долине Гвадалквивира. Внутри каждого генофонда как меж-, так и внутривидовая изменчивость были чрезвычайно низки [8]. Популяции из Центральной Испании, Венгрии, Южной Испании и Турции были сгруппированы согласно районам происхождения в четыре кластера в результате

проведения молекулярного анализа среди высоковирулентных популяций *O. ситана*. Показана их внутривидовая однородность [9].

Молекулярно-генетические различия популяций *O. ситана*, поражающей подсолнечник в разных регионах России и Казахстана, ещё не были изучены. Целью нашего исследования является анализ молекулярно-генетического разнообразия между популяциями зарази́хи, распространенной на территории России, и сравнение их с популяциями из Румынии и Казахстана с применением кодоминантных микросателлитных маркеров.

Материал и методы. Семена *O. ситана* 24 популяций были собраны в 2012 и 2013 гг. на полях подсолнечника Краснодарского, Ставропольского краёв, Ростовской, Волгоградской и Саратовской областей России, а также Румынии и Казахстана и хранились при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (табл. 1).

Для искусственного заражения зарази́хой растения подсолнечника сорта ВНИИМК 8883 выращивали в камере искусственного климата в пластиковых ящиках ёмкостью 10 кг смеси почвы с речным песком в соотношении 3 : 1. Этот сорт никогда не был селекционирован на устойчивость к зарази́хе. Семена зарази́хи вносили в почвенную смесь из расчёта 100 мг на 1 кг. Семена подсолнечника высевали по 20 шт. в каждый ящик. Полив осуществляли при подсыхании верхнего слоя почвы. Режим работы камеры: 16-часовой фотопериод при температуре $25\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$ днём и $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ночью. Через 50 дней после появления всходов растения выкапывали из ящиков, отмывали корневую систему водой и отбирали клубеньки, стебли и соцветия зарази́хи для анализа. Свежесобранная ткань хранилась при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ДНК выделяли из замороженных тканей по методике Doyle [10] с нашими модификациями. Для экстракции ДНК зарази́хи из каждой популяции была взята смесь из 5–10 индивидуальных растений равной массы.

Таблица 1

**Характеристика образцов семян
O. ситана, использованных для анализа**

№	Место сбора семян заразики	Страна	Год сбора	Расы, преобладающие в образце семян
V1	Краснодарский край: Крыловской район	Россия	2012	G
V2	Ейский район	Россия	2013	F,G
V3	Ставропольский край, Труновский район	Россия	2012	F,G
V4	Ростовская область: Азовский р-н, ДОС ВНИИМК	Россия	2012	E,F,G
V5	Милютинский район	Россия	2012	G
V6	Азовский р-н, с. Круглое	Россия	2012	G
V7	Боковский район	Россия	2012	F,G
V8	Зерноградский район	Россия	2012	F,G
V9	Матвеево-Курганский р-н	Россия	2012	F,G
V10	Матвеево-Курганский р-н	Россия	2012	G
V11	Боковский район	Россия	2012	F,G
V12	Боковский район	Россия	2012	F,G
V13	Зерноградский район	Россия	2012	F
V14	Зерноградский район, конезавод	Россия	2012	F,G
V15	Кагальницкий район	Россия	2012	G
V16	Саратовская область, Советский район	Россия	2013	E,F,G
V17	Волгоградская область: Алексеевский район	Россия	2013	F,G
V18	Новоаннинский район	Россия	2013	F,G
V19	Шемонаихинский район, Усть-Каменогорск	Казахстан	2012	D
V20	Меджидия	Румыния	2013	G
V21	Калараси	Румыния	2013	G
V22	Тулчеа	Румыния	2013	G
V23	Урзицени	Румыния	2013	D
V24	Лунка	Румыния	2013	G

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Москва, Сибэнзим). Для амплификации применяли термоциклер S1000™ (BioRad, США). Условия амплификации: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин, затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 60 °С в течение 40 с, элонгация – 1 мин при 70 °С, денатурация при 94 °С – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Использовали 15 SSR (simple sequence repeat) праймеров, которые ранее были отобраны в работе [8].

Электрофорез продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле

(8 %, 1 × ТБЕ) с использованием камеры VE-20 для вертикального электрофореза (Хеликон, РФ) при 230 В. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация результатов электрофореза в УФ и их документирование обеспечивались при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция). В качестве маркера молекулярного веса использовался 100-bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc, Lithuania). Подсчет размеров фрагментов после электрофореза был выполнен при помощи программного обеспечения Bio-Capture (Vilber Lourmat, Франция).

Для определения различий между образцами заразики данные ПЦР анализа были обработаны методом Варда. Для этого состояния амплифицированных фрагментов ДНК были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в электрофоретических спектрах одинаковых по размеру фрагментов ДНК соответствовало значениям 1 и 0. Кластерный анализ выполнили с помощью пакета программ (Statistica 6.0). Геометрические дистанции вычислены с помощью Евклидова расстояния. Основные показатели генетической изменчивости популяций (число аллелей на локус *Na*, эффективное число аллелей *Ne*, полиморфность *P*, наблюдаемая *Ho* и ожидаемая *He* гетерозиготности, информационный индекс Шеннона *I*), а также анализ молекулярной вариации AMOVA (Analysis of Molecular Variance), показатели *F* статистики Райта, генетические дистанции и генетическое сходство по Нею определяли с помощью программы GenAlEx 6.5 [11].

Результаты и обсуждение. Из 15 микросателлитных праймеров, использованных в работе, были отобраны 9, показавшие полиморфизм амплифицированных фрагментов. В результате амплификации девяти микросателлитных локусов у заразики из 24 популяций был выявлен 21 аллель, от 2 до 4 аллелей на локус (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика микросателлитных локусов, использованных для оценки генетических различий 24 популяций *O. citana*

Локус	Размер фрагмента ДНК (пн)	Количество аллелей
Ocum-52	114, 131	2
Ocum-59	90, 100	2
Ocum-70	127, 120, 130	3
Ocum-81	72, 90	2
Ocum-87	132, 136, 134, 138	4
Ocum-108	144, 152	2
Ocum-141	186, 191	2
Ocum-196	192, 197	2
Ocum-197	104, 113	2

По результатам кластерного анализа образцы *O. citana* были разделены на две группы (рис. 1). Кластер I объединял 19 образцов, собранных на территории России и Казахстана. Кластер II объединил популяции заразики, собранные в разных районах Румынии.

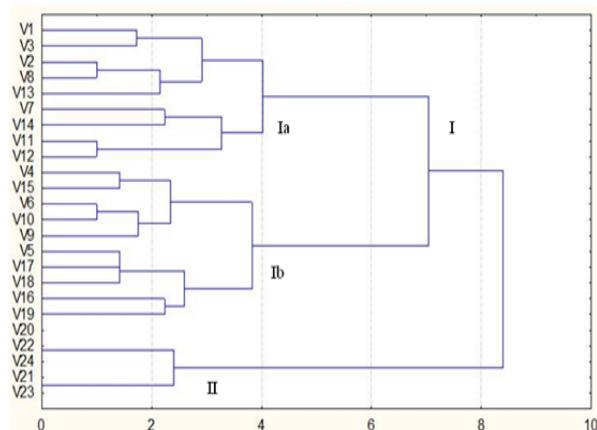


Рисунок 1 – Дендрограмма кластерного анализа 24 популяций *O. citana*, собранных в разных районах России, Казахстана и Румынии, проведенного на основании анализа полиморфизма по девяти SSR локусам

Кластер I подразделялся на 2 субкластера, с расстоянием объединения 5 единиц. Субкластер Ia объединил популяции, происходящие из Краснодарского и Ставропольского краев и Боковского и Зерноградского районов Ростовской области. В

субкластере Ib попали популяции из Казахстана, Саратовской и Волгоградской областей и Матвеево-Курганского, Азовского, Кагальницкого и Милютинского районов Ростовской области. Объединение в субкластеры не зависело ни от уровня вирулентности популяции, так как популяции с различной вирулентностью были сгруппированы вместе, ни от географического происхождения (табл. 1, рис. 1). Так, например, популяции заразики из Боковского и Зерноградского районов Ростовской области, объединенные в субкластере Ia, довольно далеко расположены друг от друга (около 200 км). Заразиха из Казахстана, географически наиболее отдаленная от российской группы популяций (расстояние свыше 2000 км и разные почвенно-климатические условия), находится в одном субкластере с популяциями из Ростовской, Волгоградской и Саратовской областей. Группирование популяций заразики в кластеры также не зависело от их расового состава. Большая зависимость прослеживалась от происхождения из стран постсоветского пространства и Румынии. Уровень генетической дифференциации между кластерами количественно оценили с помощью вычисления генетических дистанций Неи [12]. Генетическая дистанция и генетическое сходство составили соответственно 0,137 и 0,872.

Все пять образцов заразики из Румынии были практически идентичны. Процент полиморфных локусов *P* составил 11,11. Популяции, происходящие из России и Казахстана, были более полиморфны, с процентом полиморфных локусов 100,00. Например, на рисунке 2 представлены аллельные варианты по SSR локусу Ocum-87 пяти популяций заразики из Румынии в сравнении с пятью популяциями из России.

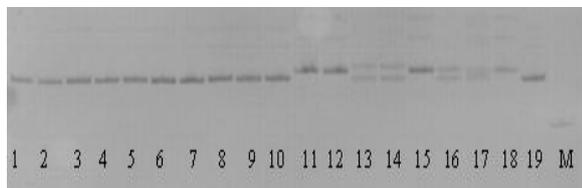


Рисунок 2 – Аллельные варианты по SSR локусу *Osim-87* десяти популяций *O. citrana*. **Румыния:** 1, 2 – Меджидия; 3, 4 – Калараси; 5, 6 – Тулчеа; 7, 8 – Урзицени; 9, 10 – Лунка; **Россия:** 11, 12 – Саратовская область Советский район; 13, 14 – Краснодарский край Ейский район; 15, 16 – Волгоградская область Алексеевский район; 17, 18 – Волгоградская область Новоанинский район; 19 – Ростовская область Азовский район, с. Круглое; М – фракция, длиной 100 бр.

Для определения основных показателей генетического разнообразия, анализа молекулярной вариации AMOVA и показателей *F* статистики Райта, популяции *O. citrana* были объединены в генетические пулы по географическому происхождению. Далее, генетические пулы паразита, происходящие из России и Казахстана, обозначены как Pop1, а из Румынии – Pop2. Основные показатели генетической изменчивости двух пулов показали, что среднее число аллелей на locus колебалось от 1,11 у Pop2 до 2,33 у Pop1. Эффективное число аллелей составило от 1,05 у Pop2 и до 1,77 у Pop1. Pop1 показала самое высокое значение наблюдаемой гетерозиготности (0,44), в то время как у Pop2 наблюдаемая гетерозиготность составила 0,05. Значения средней ожидаемой гетерозиготности колебались от 0,03 у Pop2 до 0,41 у Pop1. Анализ генетического разнообразия внутри генетических пулов с использованием информационного индекса Шеннона выявил наибольшую величину разнообразия в Pop1 (0,63) и наименьшую в Pop2 (0,05) (табл. 3).

Таким образом, генетический пул, включающий популяции заразики, паразитирующей на подсолнечнике в России и Казахстане, показал большее генетическое разнообразие, чем популяции зара-

зики из Румынии. Это выглядит закономерным, поскольку в России и Казахстане многие популяции находятся на большом расстоянии друг от друга (от 200 до 2000 км), тогда как в Румынии они географически мало отдалены. И ассортимент выращиваемого подсолнечника, на котором паразитирует заразики в России и Казахстане, генетически более разнородный.

Таблица 3

Основные показатели генетического разнообразия двух генетических пулов, выявленные с помощью девяти микросателлитных локусов

Генетические пулы	Na	Na (Freq > 5%)	Ne	I	Ho	He
Pop1	2,33±0,23	2,11±0,26	1,77±0,11	0,63±0,07	0,44±0,06	0,41±0,04
Pop2	1,11±0,11	1,11±0,11	1,05±0,05	0,05±0,05	0,04±0,04	0,03±0,03

Примечание: Na – число аллелей на locus; Na (Freq >= 5 %) – число аллелей на locus с частотой > 5 %; Ne – эффективное число аллелей; I – информационный индекс Шеннона; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность

Анализ молекулярной вариации AMOVA (характеризующий генетическую дифференциацию изучаемых популяций) выявил, что 22 % от общей дисперсии обусловлено различиями между генетическими пулами, а большая часть дисперсии – 78 % – различиями между индивидами внутри каждого пула (табл. 4).

Таблица 4

Результаты AMOVA анализа общего генетического разнообразия в двух генетических пулах *O. citrana*

Источник разнообразия	Число степеней свободы, df	Сумма квадратов	Доля в общей дисперсии, абс. значения	Доля в общей дисперсии, в %	P
Между пулами	1	8,552	0,443	22 %	<0,001
Внутри пулов	24	38,500	1,604	78 %	
Всего	25	47,042	2,047	100 %	

При расчете значений показателей структуры подразделенной популяции (*F*

статистика Райта) также было показано, что различия между Pop1 и Pop2 достаточны ($F_{st} = 21,9\%$; табл. 5), чтобы говорить о существовании небольшой генетической дифференцированности этих двух пулов. Этот показатель хорошо согласуется с данными анализа молекулярной вариации. Малое значение F_{is} (-0,019) указывает на дефицит средних гетерозигот в каждой популяции, а F_{it} , характеризующее дефицит или избыток средних гетерозигот в группе популяций, имеет среднее значение (0,205). В нашем случае популяции из Румынии практически не имеют гетерозигот, снижая этим показатель F_{is} .

Таблица 5

Значения показателей F статистики Райта: F_{is} , F_{it} , F_{st}

F-статистика	Значение	Вероятность (P)
F_{st}	0,219	0,001
F_{is}	-0,019	0,577
F_{it}	0,205	0,012

Генетические пулы заразики, паразитирующей на подсолнечнике, в странах бывшего СССР и Румынии обладают большим сходством. Наблюдается практически полное отсутствие уникальных аллелей у исследованных популяций (за исключением аллелей длиной 120 и 130 пн в локусе *Oscm-70* у образцов заразики из Труновского района Ставропольского края, Россия), большое генетическое сходство (0,872) пулов и небольшая степень дифференциации генов между популяциями в отношении частот аллелей ($F_{st} = 21,9\%$).

Наши результаты показали, что популяции заразики из указанных трех стран группируются в кластеры согласно странам происхождения независимо от их расового состава. При этом один из кластеров объединяет популяции паразита из стран бывшего советского пространства. Объяснение этому факту может быть следующее. По нашим данным, заразики из Казахстана отличается слабой вирулентностью и не преодолевает действие гена устойчивости *Or4* у подсолнечника. Это свидетельствует о том,

что данная популяция заразики представлена семенами, сохранившимися в почве ещё со времён СССР. Мы полагаем, что сходство Казахской и Российских популяций заразики и их внутривидовой полиморфизм базируются на генетическом разнообразии и сходстве сортов подсолнечника, которые возделывались в республиках бывшего СССР. Закрытость территорий СССР от сортифта иностранных государств на протяжении многих лет сформировала здесь своеобразие генофонда как подсолнечника, так и его паразита. И это некоторое своеобразие ещё не успело нивелироваться современным свободным обменом семенным материалом между странами. Многолетним паразитированием на сортах, более полиморфных, нежели гибриды подсолнечника, можно объяснить то, что генетический пул заразики стран бывшего советского пространства характеризуется более высоким уровнем внутривидового разнообразия, нежели популяции из Румынии.

Несмотря на это, генетические пулы заразики, паразитирующей на подсолнечнике, в странах бывшего СССР и Румынии обладают большим сходством. Большое генетическое сходство между популяциями заразики из стран постсоветского пространства и Румынии свидетельствует о малой вариативности генома заразики. Мы полагаем, что малая вариативность генома *O. cumana*, описанная также рядом авторов (Ciucu et al., 2004; Gagne et al., 1998), может быть следствием того, что средой обитания этого растения-паразита являются метаболиты растения подсолнечника. Тогда как наружные факторы (климатические, почвенные и др.) могут воздействовать на паразита лишь опосредованно – через его хозяина. Специализация генотипа паразита, зависящая от хозяина, была показана и для популяций *O. foetida*, инфицирующих дикорастущие и культивируемые виды вики в Марокко [13] и в Тунисе [14]. Кроме того, учитывая, что на подсолнечнике заразики паразитирует немногим более 100 лет, ещё рано ожидать от неё сильной изменчивости.

Данное исследование выявило существование двух слабо дифференцированных генетических пулов *O. cumana*: российско-казахского и румынского. Популяции заразики постсоветского пространства более полиморфны и обладают большим внутривидовым генетическим разнообразием, чем популяции заразики из Румынии.

Авторы благодарны испанским коллегам в лице Leonardo Velasco за любезно предоставленную нуклеотидную последовательность SSR-праймеров, фирме «Syngenta» за предоставленные семена заразики из Казахстана, а также компании «Limagrain» в лице Laszlo Hargitay и Mariana Gheorghe, предоставившим нам возможность собрать семена заразики из пяти популяций в Румынии.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края, грант № 13-04-96521.

Список литературы

1. Антонова Т.С., Стрельников Е.А., Арасланова Н.М., Рамазанова С.А. Адаптивные особенности в онтогенезе заразики *Orobanche cumana* Wallr. на подсолнечнике // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2012. – Вып. 1 (150). – С. 110–116.
2. Fernandez-Martinez J.M., Martinez L. Velasco and B. Perez-Vich. Progress in research on breeding for resistance to broomrape // In: Proc. 18th Int. Sunfl. Conf., Mar Del Plata & Balcarce, Argentina Int. Sunfl. Assoc., Paris, France. – 2012. – P. 57–62.
3. Škorić, D., Păcureanu-Joița M. and Sava E. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // Genetica și ameliorarea plantelor an. I.N.C.D.A. Fundulea LXXVIII (1). – 2010. – P. 63–79.
4. Ciuca M., Pacureanu M. and Iuora M. RAPD markers for polymorphism identification in parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr. // Romanian Agriculture research. – 2004. – V. 21. – P. 29–32.
5. Atanasova R., Batcharova R., Todorovska E. and Atanassov A. Molecular study of broomrape (*Orobanche* Spp.) by RAPD analyses // Biotechnol. and Bionechnol. Eq. – 2005. – V. 19 (3). – P. 51–60.

6. Benharrat H., Veronesi C., Theodet C. and Thalouarn P. *Orobanche* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR) // WEED Research. – 2002. – V. 42 (I. 6). – P. 470–475.

7. Gagne G., Roeckel-Drevet P., Grezes-Besset B., Shindrova P., Ivanov P., Grand-Ravel C., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Charmet G. and Nicolas P. Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries // Theor. and Appl. Genet. – 1998. – V. 96. – P. 1216–1222.

8. Pineda-Martos R., Velasco L., Fernandez-Escobar J., Fernandez-Martinez J.M., and Perez-Vich B. Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers // Weed Research. – 2013. – V. 53. – P. 279–289.

9. Molinero-Ruiz L., Garcia-Carneros A. B., Collado-Romero M., Raranciuc S., Dominguez J. and Melero-Vara J.M. Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe // Weed Research. – 2013. – DOI: 10.1111.

10. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11–15.

11. Peakall R., Smouse P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics. – 2012. – P. 1–3.

12. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. – 1972. – V. 106. – P. 283–392.

13. Vaz Patto M.C., Diaz-Ruiz R., Satovic Z., Roman B., Pujadas-Salva A.J., Rubiales D. Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: evolving from parasitizing wild hosts to crop plants // Weed Research. – 2008. – V. 48. – P. 179–186.

14. Roman B., Perez-de-Luque A., Alfaro C. [et al.]. Host differentiation in *Orobanche foetida* Poir // FLORA: Morphology, Distribution and Functional Ecology of Plants. – 2007. – V. 202. – P. 201–208.