



РЕГИОНАЛНО МОЛЕКУЛЯРНО-ТАКСОНОМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА *OROBANCHE* SUBSECT. *GLANDULOSAE* ЧРЕЗ ISSR МАРКЕРИ

КИРИЛ СТОЯНОВ, ИЛИЯ ДЕНЕВ

REGIONAL MOLECULAR-TAXONOMIC EVALUATION OF *OROBANCHE* SUBSECT. *GLANDULOSAE* USING ISSR MARKERS

KIRIL STOYANOV, ILIYA DENEV

Abstract

Genus *Orobanche* is represented by 18 species in Bulgaria. Samples were collected from different places in Bulgaria inhabited by four representatives of *Orobanche* subsect. *Glandulosae* (*O. alba*, *O. reticulata* subsp. *pallidiflora*, *O. serbica* and *O. pancicii*). The flower buds were used to isolate genomic DNA and run PCR reactions with five ISSR primers. The amplified polymorphic bands were scored, processed by cluster analysis and used to build consequent cladogram. This confirmed the grouping of the known species. However the group of *O. alba* showed quite high diversity. Because the method is free of environment influence this approach could be used for better understanding of taxonomic relationships in *Orobanche*.

Key words: *Orobanche*, *Glandulosae*, ISSR, PCR, microsatellites, molecular, taxonomy

ВЪВЕДЕНИЕ

Род *Orobanche* L. s.s. (*Orobanche* sect. *Osproleon* Wallr.) е представен от 19 вида в България. Подсекцията *Glandulosae* (Beck) Teryokhin съдържа четири вида – *O. alba* Steph. ex Willd., *O. reticulata* Wallr., *O. serbica* G.Beck et Panč., и *O. pancicii* G.Beck & Petr. В България се срещат 2 подвида, 2 разновидности и 10 форми на *O. alba* и 2 подвида на *O. reticulata* (Stoyanov, 2009). Полиморфизмът в *O. alba* е довел до съобщаване на голям брой вътревидови таксони (Beck, 1890, 1930; Rätzel & Uhlich, 2004). *Orobanche reticulata* се среща с двата си парapatрични подвида, често разглеждани като видове (Kreutz, 1995). Съвременните изследвания оспорват балканския ендемизъм на *O. serbica* и положението му в подсекцията (Carlón & al., 2008).

През последните две десетилетия са провеждани редица филогенетични анализи на пластидни секвенции, ядрената 18S р ДНК, ITS секвенции и RAPD маркери (de Pamphilis & al. 1997; Olmstead & al. 2001; Nickrent et al. 1998; Wolfe et al. 2005, Róman & al. 2003). ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) е метод на намножаване на областите между съседни, идентични, но огледално ориентирани микросателитни секвенции, като за целта се ползва само един SSR-праймер. Закотвящите се праймери осигуряват по-голяма специфичност на продуктите. Всеки ISSR продукт кореспондира с фрагмент геномна ДНК, обграден от две микросателитни огледално обърнати секвенции (Zietkiewicz & al. 1994; Tsumura & al. 1996; Nagaoka & Ogihara 1997). Електрофоретичната картина от продуктите носи информация за честотата на разпространение на този микросателитен повтор в генома (Blair et al., 1999; Paulo M.; Ruas & al. 2003). Посредством ISSR маркери е направено успешно таксономично разделяне на *O. hederæ*, *O. amethystea*, *O. cernua* и *O. cumaná* по пет различни праймера (Benharrat & al. 2002). Молекулното разнообразие в и между популациите на *O. crenata* показва, че ISSR маркерите могат да послужат за прецизна идентификация (Román & al. 2002).

Комбинирането на класическите с модерни молекулярно-таксономични методи ще позволи да изясним видовата и вътревидовата принадлежност на спорни таксони и да конкретизираме таксономичното им положение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследваните образци са събрани от различни части на България. Ваучерите, депозирани в Хербариума към АУ – Пловдив (SOA) са представени по-долу по видове с флористичен район, UTM-квадрант, топоним, надморска височина, гостоприемник, дата, автори, номер в хербариума SOA и работни номера (означени с «#»):

Orobanche alba Steph. ex Willd.: Родопи (C): LG25. Асеновград, 361 m, pl. n. *Thymus* sp., 7.05.2006 (K.S.) SOA s.n. #2006.031; pl. n. ign., 22.04.2007 (K.S.) SOA s.n. #2007.007; Тракийска низина: KG86. Триводици, 390 m, pl. n. *Thymus* sp., 22.05.2006 (K.S.) SOA s.n. #2006.049; LG15. Белащица, 413 m, pl. n. ign., 13.05.2006 (K.S.) SOA s.n. #2006.033; #2006.034; #2006.035

Orobanche reticulata Wallr.: Черноморско крайбрежие (C): PJ21. Тюленово, 41 m, pl. n. *Cirsium* sp., 15.06.2006 (K.S., A.Pujadas & B. Perez) SOA 059467 #2006.087; Знеполски район: FN53. Парамун, 838 m, pl. n. ?*Cirsium*, 5.07.2006 (K.S.) SOA s.n. #2006.104; Тракийска низина: KG86. Ново село, 277 m, pl. n. ign., 22.05.2006 (K.S.) SOA s.n. #2006.042.

Orobanche pancicii Beck & Petrovic: Родопи (C): LG25. Анатема, 294 m, 7.06.2006 (K.S.) SOA s.n. #2006.024; 22.04.2007 (K.S.) SOA s.n. #2007.009;

Orobanche serbica Beck: Знеполски район: FN55. Чепън, 909 m, pl. n. *Artemisia lobelii*, 26.06.2008 (K.S.) SOA s.n. #2008.032

ДНК е изолирана от съцветия чрез DNAesy Plant Mini kit (Qiagen). След предварително изследване са подбрани за амплификации 10 подходящи олигонуклеотидни ISSR праймера от колекция № 9 на University of British Columbia, Nucleic Acid-Protein Service Unit (<http://naps.msl.ubc.ca/>) с обща

формула (MY)₆RR (с по два арбитарни пуринови нуклеотида в 3'-края). За оптимизация са тествани няколко PCR параметъра, включително концентрациите на ДНК (50-250 ng / реакция) и праймера (10-500 pmol / реакция) и брой цикли (25-40). Реакции без ДНК са използвани като негативни контроли. При така определените условия са проведени амплификации в 250 µl PCR епруветки съдържащи 2 µl (150 ng) ДНК матрица; 1 µl праймер (100 pmol.l⁻¹ концентрация); 25 µl PCR мастър микс (Fermentas, Cat No K0171) и 22 µl свободна от ДНК-ази вода (доставена с кита). PCR-реакциите са провеждани в PCR апарат Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) при използване на следната програма: начална денатурация на ДНК при 94° C – 5 min; 35 цикъла при 94° C – 1 min; 50° C – 1 min и 30 s; 72° C – 3 min и финално удължаване при 72° C за 2 min. PCR продуктите са смесени с 5 µl буфер за нанасяне (Fermentas #R0611) и разделяни посредством 1.5% агарозен гел, съдържащ 0.5 µg/ml етидиев бромид. Използван е 1X TAE буфер и електрическо напрежение 3.5 V/cm. Размерът на продуктите е определен по 1 kb ДНК маркер (Fermentas GeneRuler#SM0311). Резултатите са фотографирани на UV-светлина. Молекулните маси на фрагментите спрямо използвания ДНК-маркер са преразпределени в класове и въведени като булеви данни. За резултатите от всеки маркер са построени дендрограми и матрици от разстояния с програмата PAST (Hammer & al., 2001). Приема се работна хипотеза за неутралност на праймерите – резултатите са обединени като средна аритметична стойност от евклидовите разстояния, превърнати в перцентил. Обединената матрица е обработена до кладограма с T-Rex (Makarenkov 2001), визуализирана с PhyloDraw (Pusan National University).

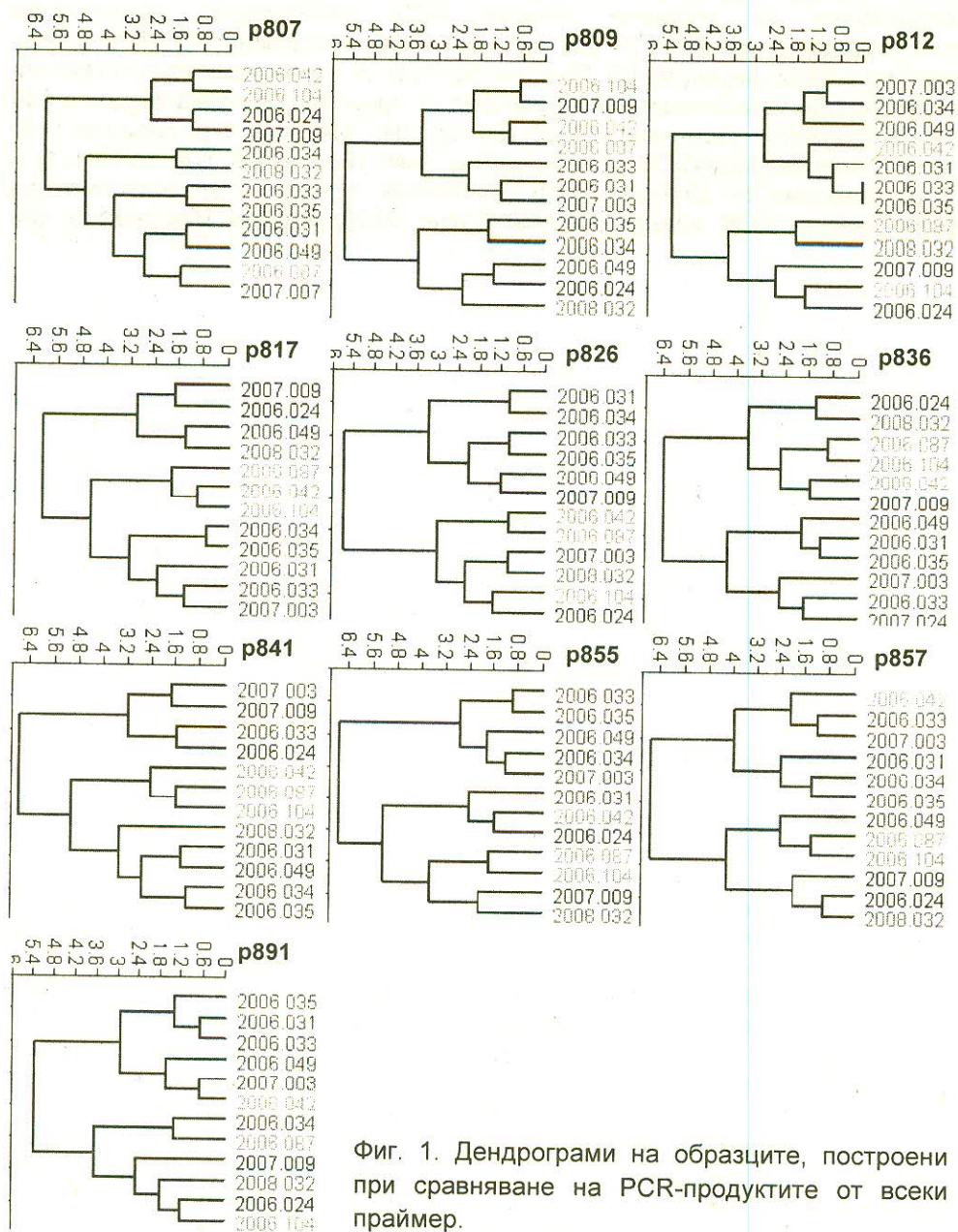
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За оценяване на използваните праймери, получените PCR продукти са разпределени по класове по молекулни маси, които са използвани за получаване на диагонални матрици от евклидови разстояния.

Деветте праймера показаха сходно групиране на изследваните индивиди в групи, съответстващи на познатите видове (фиг. 1). Резултатите не показват групиране в зависимост от локалитета или гостоприемника.

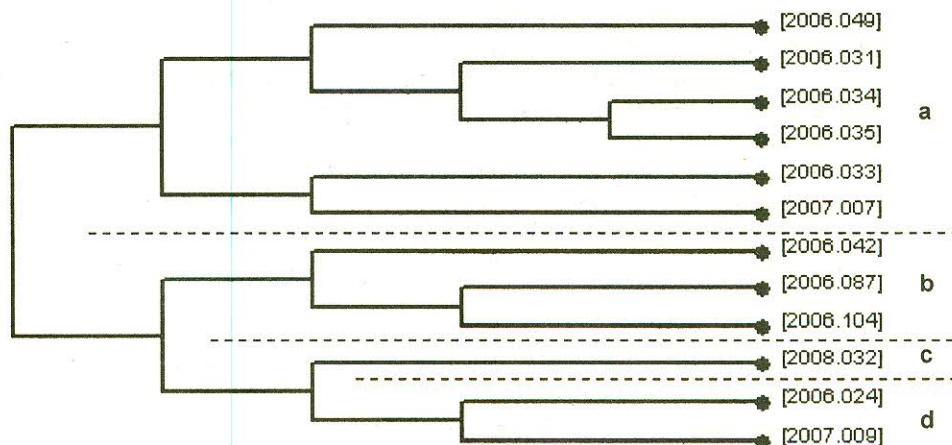
Orobanche alba и *O. reticulata* се разграничават в два ясно обособени кластера на базата на полиморфните продукти получени при ISSR амплификация с праймери p807, p855 и p857. Когато вместо тях за ISSR реакциите се използва p817, се наблюдава групиране на видовете в две двойки групи - *O. alba/O. reticulata* и *O. serbica/O. pancicii*.

При продуктите на p812, p826, p836, p855, p857 и p891 се наблюдава отделяне на полиморфния *O. alba* от останалите видове. Отделните проби показват висока степен на дисперсия и могат да бъдат разделени на генотипни групи. Това се забелязва при *O. alba*, при който са използвани по-голям брой проби. Образците от *O. pancicii* се групират в близост до *O. reticulata*. Пробата от *O. serbica* се групира в повечето случаи с *O. pancicii*. Всички праймери показват висок полиморфизъм при *O. alba*.



Фиг. 1. Дендрограми на образците, построени при сравняване на PCR-продуктите от всеки праймер.

Получената кладограма (фиг. 2) след обединяване на данните потвърждава самостоятелността на видовете и генетично детерминирания полиморфизъм при *O. alba*.



Фиг. 2. Кладограма получена след обединяване на резултатите: а – *O. alba*, b – *O. reticulata*, c – *O. serbica*, d – *O. pancicii*

ИЗВОДИ

Представеното изследване е част от проучването на *Orobanchaceae* с използване на ISSR маркери. Доказва се самостоятелността на видовете и разпространението им в България. Липсата на групиране по гостоприемници демонстрира независимост от условията на средата. Този подход може да бъде използван за проучване на филогенетичните връзки в род *Orobanche*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Съпоставянето с чужди материали стана възможно благодарение на проектите AT-TAF, ES-TAF (SYNTHEsys <http://www.synthesys.info/> финансирани от The European Community Research Infrastructure Action / FP6 "Structuring the European Research Area").

Молекулярните изследвания са осъществени по проектите ИФС-Б-606 и ДТК 02/40 (Фонд Научни изследвания, Министерство на образованието, младежта и науката на Република България).

ЛИТЕРАТУРА

1. **Георгиев, Т.** 1937. Ревизия на видовете от род *Orobanche* L., които се срещат в България. – Год. СУ, Агрон-лес. фак., 15(1): 41-56.
2. **Ковачев, И.** 1984. Сръбска синя китка - *Orobanche serbica* Beck & Petr. – В: Велчев, В. (ред). 1984. Червена книга на НР България, 1: 350. БАН, София.
3. **Beck von Managetta, G.** 1890. Monographie der Gattung *Orobanche*. Verlag von Theodor Fischer, Cassel.
4. **Beck von Managetta, G.** 1930. *Orobanchaceae*. – In: **Engler, A.** (ed.), Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis Conspectus. IV. Leipzig.
5. **Benharrat, H., Veronesi, C., Theodet, C. & Thalouarn, P.** 2002.

- Orobanche species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). – *Weed Res.*, 42: 470-475.
6. **Carlón, L., Gómez Casares, G., Laínz, M., Moreno Moral, G., Sánchez Pedraja, Ó. & Schneeweiss, G.** 2005. Más, a propósito de algunas *Orobanche* L. y *Phelipanche* Pomel (Orobanchaceae) del oeste del Paleártico. – *Doc. Jard. Bot. Atlántico* (Gijón), 3: 1–71.
 7. **De Pamphilis, C., Young, N. & Wolfe, A.** 1997. Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: Many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7367-7372.
 8. **Hammer, O., Harper, D. & Ryan, P.** 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontologia electronica*, 4(1): 1-9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
 9. **Király, G., Barina, Z., Horváth, T. & Mesterházy, A.** 2005. Az *Orobanche panceicii* Beck előfordulása Magyarországon. – *Fl. Pannonica*, 3: 17-25.
 10. **Kreutz, C.** 1995. *Orobanche*: the European broomrape species : a field guide. Vol. 1: Central and Northern Europe. Natuurhistorisch Genootschap in Limburg.
 11. **Makarenkov, V.** 2001. T-REX: reconstructing and visualizing phylogenetic trees and reticulation networks. – *Bioinformatics*, 17(7): 664-668.
 12. **Nagaoka, T. & Ogihara, Y.** 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. – *Theor. Appl. Genet.*, 94: 597-602.
 13. **Olmstead, R., de Pamphilis, C., Wolfe, A., Young, N., Elisons, W. & Reeves, P.** 2001. Disintegration of Scrophulariaceae. – *Am. J. Bot.*, 88(2): 348-361.
 14. **Rätzel, S. & Uhlich, H.** 2004. *Orobanche benkertii* spec. nov. (Orobanchaceae Vent.) und weitere *Orobanche*-Sippen aus dem NW-Kaukasus. – *Feddes Repert.* 115(1-2): 189-211.
 15. **Román, B., Satovic, Z., Rubiales, D., Torres, A., Cubero, J., Katzir, N. & Joel, D.** 2002. Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobanche crenata* from Spain and Israel revealed by inter simple sequence repeat markers. – *Phytopathology*, 92(12) 1262- 1263.
 16. **Stoyanov, K.** 2009. Chorology and critical notes on genus *Orobanche* (Orobanchaceae) in Bulgaria. – In: **Ivanova, D.** (ed.), *Proc. Fourth Balkan Bot. Congr.*, Sofia 2006. Pp. 248-257.
 17. **Tsumura, Y., Ohba, K. & Stratus, S.** 1996. Diversity and inheritance of intersimple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). – *Theor. Appl. Genet.*, 92: 40-15.
 18. **Wolfe, A., Randle, C., Liu, L. & Steiner, K.** 2005. Phylogeny and biogeography of Orobanchaceae. – *Folia Geobot.*, 40: 115-134.
 19. **Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D.** 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. – *Genomics*, 20: 176-183.