ЮБИЛЕЙНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ЕКОЛОГИЯ (СБОРНИК С ДОКЛАДИ)
Ред. Илиана Г. Велчева, Ангел Г. Цеков • Пловдив, 1ви ноември 2008 • стр. 76-84

PROCEEDINGS OF THE ANNIVERSARY SCIENTIFIC CONFERENCE OF ECOLOGY
Eds. Iliana G. Velcheva, Angel G. Tsekov • Plovdiv, November 1st 2008 • p. 76-84

ТАКСОНОМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПЕТ ВИДА *PHELIPANCHE* (POMEL) SOJAK (OROBANCHACEAE) В БЪЛГАРИЯ С ПОМОЩТА НА ISSR МАРКЕРИ

***Кирил Х. Стоянов*[1], *Илия Д. Денев*[2]**

[1] *Аграрен университет – Пловдив, E-mail: orobanche@abv.bg*
[2] *Пловдивски университет, E-mail: iliya.denev@gmail.com*

Abstract: Five species of *Phelipanche* genus in Bulgaria are studied using ISSR markers – *Phelipanche purpurea, Ph. arenaria, Ph. mutelii, Ph. oxyloba* and *Ph. ramosa.* Dendrograms are constructed by the results of each primer and used for the construction of a cladogram. The results show a specific grouping of species and sections. Because the method is free of environment influence this approach could be used for better understanding of taxonomic relationships in Orobanchaceae.

Key words: ISSR, маркери, Orobanchaceae, *Phelipanche*

ВЪВЕДЕНИЕ

В българската флора се срещат 7 вида от род *Phelipanche* (Pomel) Sojak, известен още като *Phelipaea* Dsf. (VELENOVSKY 1891; 1898) и *Orobanche* sect. *Trionychon* Wallr. (BECK-MANNAGETTA 1890, ГЕОРГИЕВ 1937; СТОЯНОВ & СТЕФАНОВ 1925; ДЕЛИПАВЛОВ 1995; ДЕЛИПАВЛОВ & ЧЕШМЕДЖИЕВ 2003). Доказаните представители на този род в България са *Ph. mutelii* (Shultz) Pomel, *Ph. ramosa* (L.) Pomel, *Ph. nana* (Reut.) Sojak, *Ph. oxyloba* (Reut.) Sojak, *Ph. arenaria* (Borkh.) Pomel и *Ph. purpurea* (Jacq.) Sojak. Разпространението на *Ph. aegyptiaca* (Pers.) Pomel в България не се потвърждава (STOYANOV 2005a).

Род *Phelipanche* е ясно разделен на две секции – *Arenariae* (Andary) Teryokhin и *Phelipanche* (TERYOKHIN 1997). Разграничаването в типовата секция не е изяснено. *Phelipanche oxyloba* е отделен от *Ph. ramosa* по формата на дяловете от долната венечна устна (CHATER & WEBB 1978). В зависимост от съотношението на прицветника към чашката и формата на венечните дялове, *Ph. oxyloba* може да се отдели от групата, представена от *Ph. mutelii, Ph. ramosa* и *Ph. nana* (КОЖУХАРОВ 1992). TERYOKHIN (1997) обединява *Ph. oxyloba* с *Ph. nana* като подвид на *Ph. ramosa* и отделя *Ph. mutelii* от тази група. От друга страна, *Ph. mutelii* е често приеман в състава на *Ph. ramosa*, а *Ph. oxyloba* е отделян като самостоятелен вид (CHATER & WEBB 1978; MUSSELMAN 1994).

Съвременните филогенетични изследвания в *Orobanchaceae* се основават на секвениране на пластидни (MANEN *et al.* 2004; PARK *et al.,* 2007a) и ядрени гени (PARK *et al.* 2007b; SCHNEEWEISS 2007). Филогенетичните изследвания във *Phelipanche* посредством ITS последователности (SCHNEEWEISS *et al.* 2004) подкрепят концепцията за филогенетичната независимост на рода и потвърждават известните секции.

Концепцията за *Orobanchaceae* в България до сега се е основавала главно на морфологията на събраните образци. Последните изследвания на *Phelipanche* в България се основават на семенна морфология (STOYANOV 2005b) и перокдидсазни спектри (STOYANOV & STOYANOVA 2007). Комбинирането на класическите флористични с модерни молекулярно – таксономични методи ще позволи да изясним видовата и вътревидовата принадлежност на спорни таксони и да конкретизираме таксономичното им положение.

ISSR (INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEATs) е един от широко използваните през последните години в молекулярната таксономия методи. Той е базиран на PCR амплификация при който се използват единични праймери с дължина 16-18 нд комплементарни на определени микросателитни секвенции. Праймерите могат да са закотвящи се или не закотвящи се в зависимост от това дали съдържат в 3’ или 5’ края си 2-4 арбитрарни нуклеотида (ZIETKIEWICZ *et al.,* 1994). В ISSR-базираните изследвания най-често се използват ди- и тринуклеотидни типове микросателити, защото те са характерни за ядрения геном, докато мононуклеотидните типове се характерни за хлоропластният геном. Всеки получен в резултат на ISSR продукт кореспондира с фрагмент геномна ДНК обградена от две микросателита с огледално обърнати секвенции (ZIETKIEWICZ *et al.,* 1994; TSUMARA *et al.,* 1996; NAGAOKA *et al.,* 1997).

ISSR методът е високо информативен и съчетава бързината на RAPD с надеждността на SSR методите. За разлика от SSR обаче при дизайна на праймерите не е необходимо да се знае предварително таргетната секвенция.

Високата надеждност и простота на ISSR метода сравнен с RFLP и RAPD, го правят предпочитан в таксономичните изследвания на различни видове. Тези особености, комбинирани с по-голямата възпроизводимост, правят този метод по-удобен от другите налични маркерни системи в изследване на генетични вариации с близко родствени видове (NAGAOKA & OGIHARA, 1997). Методът е приложим и в изследвания на подвидово и популационно ниво (BORNET & BRANCHARD, 2001)

Целта на представеното изследване е да се изяснят с помощта на молекулни маркери връзките между таксоните във *Phelipanche* от България.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1) *Събиране на проби и образци*. Изследвани са образци от *Ph. arenaria*, *Ph. purpurea*, *Ph. oxyloba*, *Ph. mutelii* и *Ph. ramosa* в периода 2006-2007 г., събрани от различни райони и гостоприемници. Всички образци са депозирани като ваучери в Хербариума към Аграрен университет – Пловдив – SOA (таблица 1). Сравнителни морфологични данни са използвани от хербариумите SOA, SO, SOM, W, WU и MA.

2) ***Изолация на геномна ДНК***. Поради нетрайността на вегетативния материал, най-подходящи за изолация на ДНК при паразитните видове са цветовете, тъй като са богати на ДНК и са сравнително свободни от полифеноли и полизахариди. Използван е DNaesy plant mini kit, по оригиналния му протокол.

3) ***ISSR-PCR реакции***. Шест олигонуклеотидни праймера, с обща формула $(MY)_6RR$, са използвани за ампликфикации. Праймерите носят в 3'-края по два арбитрарни пуринови нуклеотида. За оптимизиране на реакционните условия, са тествани няколко PCR параметъра, включително ДНК концентрация (50-250 ng / реакция), концентрация на праймера (10-500 pmol / реакция) и брой цикли (25-40). Реакции без ДНК са използвани като негативни контроли. След определяне на оптималните условия, са проведени амплификации в 250 μl PCR епруветки съдържащи 2 μl (150 ng) DNA матрица; 1 μl праймер (100 $mmol.l^{-1}$ концентрация); 25 μl PCR мастър микс (Fermentas, Cat No K0171) и 22 μl вода свободна от ДНази (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; след това 40 цикъла при 94° C – 1 мин; 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 (крайна концентрация). Използван е 1x TAE буфер и електрическо напрежение 3,5 V/cm. Размерът на продуктите е определен чрез сравняване с 1 kb ДНК маркер (Fermentas GeneRuler#SM0311).

Молекулярно-биологичните изследвания са проведени в лабораториите по Молекулярна биология към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ към ПУ „Паисий Хилендарски.“

4) Анализ на данни. Амплифицираните недвусмислени линии са отбелязани като молекулни маси посредством програмата GelPro и след това ръчно са преразпределени в класове от молекулни маси за съставяне на матрица за отсъствие/присъствие на бандове. Делът полиморфизъм на междувидово ниво е изчислен като пропорция на полиморфните локуси към общия брой локуси, отбелязани за всички образци от същия таксон. За кластер анализите е използвана програмата PAST (HAMMER *et al.,* 2001).

Матриците с евклидови разстояния от всички резултати са сумирани на база таксономична значимост (консервативност) на комплементарните последователности:

$$D_s = \frac{D_1 10^{r1} + ... + D_n 10^{rn}}{10^n},$$

където: $D_{1..n}$ – евклидово разстояние, изчислено между две проби с използването на всеки праймер, превърнато в проценти;

r1 ... rn – ранг на консервативност за всеки праймер;

n – брой използвани праймери.

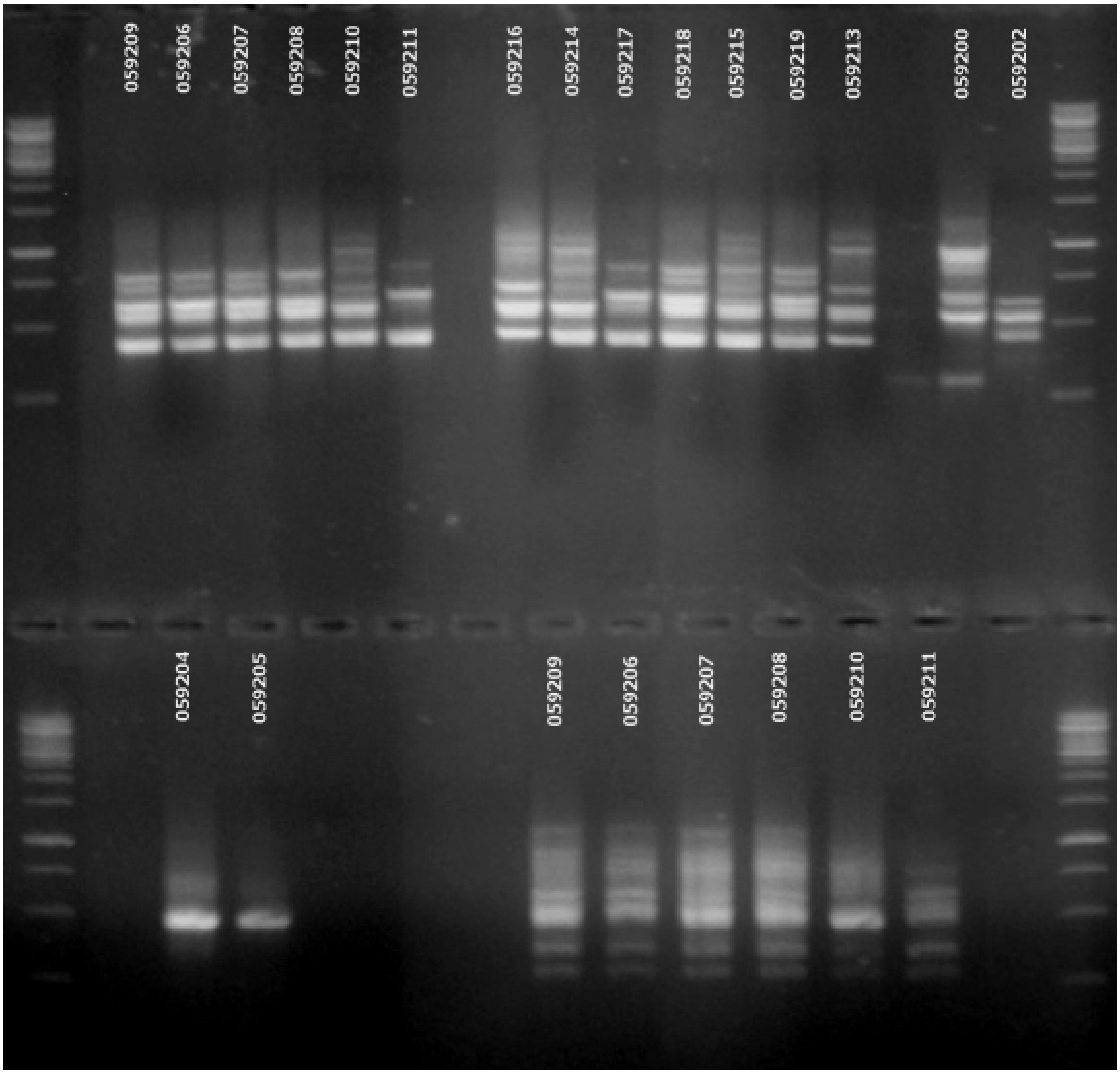
Таблица 1. *Изследвани образци*

MGRS позиция	ориентир, височина	гостоприемник	дата, автори на сбора	номер в SOA
***Ph. arenaria* (Borkh.) Pomel**:				
Северно Черноморие:				
35TPJ00	Чиракман, 26 m	*Tanacetum millefolium*	15.06.2007; Стоянов, Пухядас & Перез*	059202
Централни Родопи:				
35TLG05	Марково, 460 m	*Achillea pectinata*	17.06.2007; Стоянов	059203
***Ph. purpurea* (Jacq.) Sojak**:				
Тракийска низина:				
35TKG86	Триводици, 220 m	*A. millefolium*	22.05.2006; Стоянов	059200
***Ph. oxyloba* (Reut.) Sojak**:				
Северно Черноморие:				
35TPJ10	Св. Никола, 70 m	*Centaurea solstitialis*	15.06.2006; Стоянов, Пухядас & Перез*	059204
35TPJ21	Горун, 45 m	*?*	15.06.2006; Стоянов, Пухядас & Перез*	059205
***Ph. mutelii* (F.Schultz) Pomel**:				
Централни Родопи:				
35TLG52	Комунига, 643 m	*Nicotiana tabacum*	10.08.2006; Стоянов	059206 059207
35TLG52	Пошево, 650 m	*N. tabacum*	10.08.2006; Стоянов	059208
Тракийска низина:				
35TKG85	Козарско, 241 m	*N. tabacum*	1.08.2006; Христева & Стоянов	059209
35TKG85	Козарско, 241 m	*Lamium amplexicaule*	2.05.2007; Христева	059210
35TKG85	Козарско, 241 m	*Neslia paniculata*	2.05.2007; Христева	059211
***Ph. ramosa* (L.) Pomel**:				
Западни Родопи:				
34TGM14	Дагоново, 820 m	*Nicotiana tabacum*	14.09.2006; Стоянов	059212
34TGM15	Юруково, 840 m	*N. tabacum*	14.09.2006; Стоянов	059213
Тракийска низина:				
35TKG85	Козарско, 246 m	*Xanthium italicum*	1.08.2006; Христева & Стоянов	059214
35TKG85	Козарско, 246 m	*N. tabacum*	1.08.2006; Христева & Стоянов	059215 059216
35TKG85	Козарско, 246 m	*Lycopersicon esculentum*	1.08.2006; Христева & Стоянов	059217
35TKG85	Козарско, 246 m	*Brassica oleracea*	1.08.2006; Христева & Стоянов	059218
35TLG16	Прослав, 172 m	*N. tabacum*	7.09.2006; Стоянов	059219

* 2006 г. – експедиция по проект COST849.

Рангът *r* се определя от нивото на разделяне. Най-висока консервативност ($r = n$-1) е дадена на праймера, който разделя пробите на познатите секции. Най-нисък ранг ($r = 0$) е даден на праймера, който не води до познато групиране. Изчислените стойности са въведени в нова диагонална матрица на разстоянията и са използвани за конструиране на кладограма с помощта на T-Rex 3.0a1 (Vladimir Makarenkov, University of Quebec in Monreal) с използване на метода Neighbour joining, която е визуализирана с PhyloDraw.

РЕЗУЛТАТИ



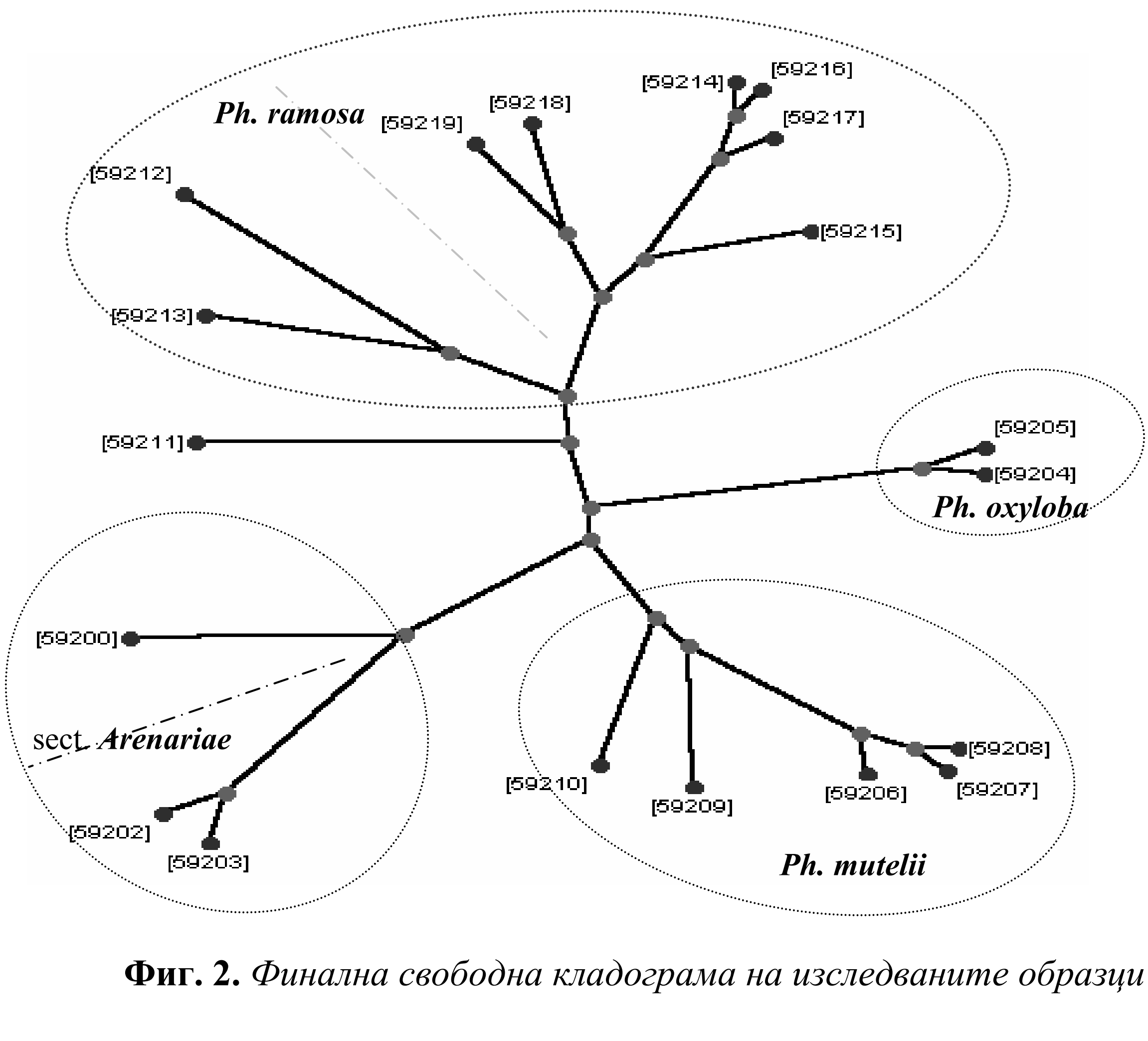
Фиг. 1. *Получени фрагменти от p817 и p826*

Приложеният метод, в зависимост от използваните праймери, групира изследваните индивиди в секции (*Arenariae* и *Phelipanche*), видове и популации. Най-добро разделяне в рода се демонстрира с разпределението на p836 – продукти (Фиг. 1). Секцията *Arenariae* винаги остава в собствен кластер. Всички PCR продукти показват ясно разделяне между *Ph. arenaria* и *Ph. purpurea*. PCR – продуктикте от *Ph. mutelii* са повече или по-малко групирани в кластер с *Ph. oxyloba*. Изключение се наблюдава в продуктите от p836 и p817 – *Ph.*

oxyloba показва по-голямо подобие с *Arenariae*. Един образец от *Ph. mutelii* открит на *Neslia* има по-големи различия от останалите образци от същия вид и заема междинна позиция между изследваните образци от sect. *Phelipanche.*

Таблица 2. *Получени фрагментни класове, молекулни маси на PCR фрагментите и рангове на консервативност*

праймер	брой класове	молекулни маси, kB (min-max)	ранг
p809	19	241 – 1426	**1**
p817	19	63 – 1250	**2**
p826	22	41 – 1336	**4**
p836	20	198 – 1203	**5**
p841	19	100 – 1026	**3**
p891	22	191 – 1246	**0**



Фиг. 2. *Финална свободна кладограма на изследваните образци*

На базата на гореописаните резултати, и в зависимост от видимостта на получените бандове, е даден ранг на консервативност на всеки използван праймер (Таблица 2). Използвайки дадените рангове и евклидовите разстояния, са преизчислени различията между образците, като от получената матрица е конструирана свободна кладограма (Фиг. 2).

ОБСЪЖДАНЕ

Получената кладограма илюстрира високата прецизност на метода, като се различават секции, видове и популации.

Високо подобие се наблюдава между изследваните образци от *Ph. arenaria* и *Ph. purpurea*.

Образците в sect. *Phelipanche* могат да се разделят ясно на трите познати вида – *Ph. oxyloba, Ph. mutelii* и *Ph. ramosa*.

Phelipanche oxyloba показва най-голяма близост до sect. *Arenariae*. Вероятно произходът на този вид е по-стар от *Ph. mutelii* и *Ph. ramosa.*

Прави впечатление и групирането на всички образци от *Ph. mutelii* в един клад, независимо от локалитета или гостоприемника. Пробите от *Ph. mutelii*, събрани от тютюн през август, се групират с образци, събрани от диви гостоприемници през май. От друга страна, се наблюдава ясен полиморфизъм, например един образец *Ph. mutelii*, открит на *Neslia paniculata* се отделя далеч от останалите проби и показва междинна позиция между *Ph. ramosa* и *Ph. oxyloba*.

Изменчивостта на *Ph. ramosa* е по-висока от очакваната. Тя не е зависима от гостоприемниците, но образците от Западните Родопи показват големи различия в сравнение с тези от Тракийската низина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеното изследване е първото проучване на *Phelipanche* в България с използване на ISSR маркери. Липсата на групиране по гостоприемници при *Ph. ramosa* демонстрира независимостта на метода от условията на средата и в същото време показва липсата на тясна трофична специализация в рода. Групирането демонстрира и независимост на метода от рекомбинациите, които протичат в цветовете. Праймерът p836 е комплементарен на най-консервативните последователности в генома на *Phelipanche*. Големите различия в sect. *Phelipanche*, открити с p817, p826 и p841 потвърждават таксономичната самостоятелност на *Ph. ramosa, Ph. mutelii* и *Ph. oxyloba.* Образецът с междинни белези подсказва междувидови взаимоотношения в sect. *Phelipanche*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Това изследване е подпомогнато от проектите SYNTHESYS (AT-TAF-3133 и ES-TAF-4407) http://www.synthesys.info/ финансирани от European Community Research Infrastructure Action по програмата FP6 "Structuring the European Research Area" и ИФС-Б-606.

Авторите благодарят на Антонио Пухядас, Бегоня Перез и Цвета Христева за събраните образци.

ЛИТЕРАТУРА

ДЕЛИПАВЛОВ, Д. 1995. *Orobanche* L. – в: Кожухаров, С. (ред.), Флора на Република България. 10: 291-325. Акад. изд. „Професор Марин Дринов“, София.

ДЕЛИПАВЛОВ, Д. & ЧЕШМЕДЖИЕВ, И. (ред.). 2003. Определител на растенията в България. 590 стр., Академично издателство на Аграрен Университет – Пловдив.

ГЕОРГИЕВ, Т. 1937. Ревизия на видовете от род *Orobanche* L., които се срещат в България – Год. Соф. Унив., 15(1): 41-56.

KOZHUHAROV, S. (ред.). 1992. Определител на висшите растения в България. Наука и изкуство, София.

СТОЯНОВ, Н. & СТЕФАНОВ, Б. 1925. Флора на България, т. 2. Държавна печатница, София.

BECK VON MANAGETTA, G.R. 1890. Monographie der Gattung *Orobanche.* Verlag von Theodor Fischer, Cassel, 275 pp.

BORNET B, & BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 209-215.

CHATER, A. & WEBB. D. 1972. Orobanchaceae. – In: Tutin, T. (ed.). Fl. Eur., Vol. 3, Pp. 285-293. Cambridge Univ. Press.

HAMMER O., HARPER D.A.T. & RYAN P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia electronica. 4(1): 9 pp.

MANEN J-F., HABASHI CHR., JEANMONOD D., PARK J-M. & SCHNEEWEISS G. 2004. Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from plastid rbcL sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 33: 482–500

MUSSELMAN, L. J. 1994. Taxonomy and spread of *Orobanche*. – In: Pieterse, A. H., J. A. C. Verkleij & S. J. Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*, Proceedings of the 3rd International Workshop on *Orobanche* and Related *Striga* Research. Pp. 27-35. Royal Tropical Institute, Amsterdam.

NAGAOKA, T. & OGIHARA, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polumorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and applied genetics, 94: 597-602.

PARK, J-M., MANEN, J-F. & SCHNEEWEISS, G. 2007a. Horizontal gene transfer of a plastid gene in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 43 (2007) 974-985.

PARK, J-M., SCHNEEWEISS, G. & WEISS-SCHNEEWEISS, H. 2007b. Diversity and evolution of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements in the non-photosynthetic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). Gene 387: 75-86.

SCHNEEWEISS, G. 2007. Correlated evolution of life history and host range in the nonphotosynthetic parasitic flowering plants *Orobanche* and *Phelipanche* (Orobanchaceae). J Evol Biol., 20 (2): 471-478.

SCHNEEWEISS, G.M., A.COLWELL, J.-M. PARK, C.-G. JANG & T.F.STUESSY. 2004. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) inferred from nuclear ITS sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 30: 465-478.

STOYANOV, K. 2005a. Floristic materials and critical notes on the genus *Orobanche* subgen. *Phelipanche* in Bulgaria. Fl. Medit., 15: 461-476.

STOYANOV K. 2005b. Seed morphology of the representatives of genus *Phelipanche* (Pomel) Sojak (Orobanchaceae) in Bulgaria. Proceedings Balkan Scientific Conference of Biology. May 19-21, 2005, Plovdiv, Bulgaria. 277-292.

STOYANOV, K. & STOYANOVA, S. 2007. Polymorphism in peroxidase isozymes detected in *Phelipanche* (Orobanchaceae) from Bulgaria. Phytologia balcanica 13(2): 209-212

TERYOKHIN, E.S. 1997. Weed Broomrapes – systematics, ontogenesis, biology, evolution. Aufstieg-Verlag, Germany, 182 pp.

TSUMURA, Y., OHBA, K. & STRATUS, S. H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theoretical and applied genetics, 92:40-45.

VELENOVSKY, 1891. *Phelipaea* Dsf. in: Flora Bulgarica. Pragae. 438-439.

VELENOVSKY, 1898. *Phelipaea* Dsf. in: Flora Bulgarica – supplementum I, Pragae. 222-225.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. & LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics,* 20: 176-183.

TAXONOMIC EVALUATIION OF FIVE *PHELIPANCHE* SPECIES (*OROBANCHACEAE*) IN BULGARIA USING ISSR MARKERS

Kiril H. Stoyanov, Ilia D. Denev

[1] *Agricultural University – Plovdiv, E-mail: orobanche@abv.bg*
[2] *University of Plovdiv, E-mail: iliya.denev@gmail.com*

Five species of *Phelipanche* genus in Bulgaria are studied using ISSR markers – *Phelipanche purpurea, Ph. arenaria, Ph. mutelii, Ph. oxyloba* and *Ph. ramosa.* Dendrograms are constructed by the results of each primer and used for the construction of a cladogram. The results show a specific grouping of species and sections. Because the method is free of environment influence this approach could be used for better understanding of taxonomic relationships in Orobanchaceae.