

EVALUATION OF THREE SPECIES FROM PYROLACEAE FAMILY USING ISSR MARKERS

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТРИ ВИДА ОТ СЕМЕЙСТВО PYROLACEAE ЧРЕЗ ISSR МАРКЕРИ

Tsvetanka RAYCHEVA*¹, Kiril STOYANOV¹, Iliya DENEV²

¹ Department Botany, Agricultural University - Plovdiv, 12 Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, orobanche@abv.bg

² Plant Physiology and Molecular Biology Department, University of Plovdiv, 24 Tsar Assent St., 4000 Plovdiv, iliden@uni-plovdiv.bg

Abstract

The family Pyrolaceae is represented in Bulgaria by six species, belonging to three genera. The viewpoints for the taxonomical position of the species in this family are not clearly unilateral. The aim of this study is to find molecular markers, allowing the objectively differentiation of the genera in this family, without use of morphological characters. Three species of the family were examined, representing the tree genera distributed in Bulgaria: *Moneses uniflora* (L.) A.Gray, *Orthilia secunda* (L.) House and *Pyrola minor* L. DNA was isolated from leaves and amplified via PCR reactions using 4 primers. The results were processed using cluster analysis and non-metric multidimensional scalling. The consequent cladogram, obtained by the mean euclidean distances, displayed grouping of the samples by genera, independently of their locality. The independent multitudes confirm the accuracy of the method for determination of the species in Pyrolaceae.

Keywords: *Moneses*, *Orthilia*, *Pyrola*, ISSR, molecular taxonomy

Резюме

Семейство *Pyrolaceae* е представено от шест вида, които се отнасят към три рода. Гледните точки за таксономичното положение на видовете в това семейство не са еднозначни. Целта на изследването е да се открият молекулни маркери, които да позволят обективно диференциране на родовете.

Изследвани са три вида от семейството, които представят трите рода в България: *Moneses uniflora* (L.) A.Gray, *Orthilia secunda* (L.) House и *Pyrola minor* L. ДНК е изолирана от листа и амплифицирана чрез PCR реакции, с помощта на 4 праймера. Резултатите са подложени на кластер анализ и неметрично многомерно скалиране. Заключителната кладограма, получена от средните евклидови разстояния, показва групиране на пробите по родове, независимо от техния локалитет. Независимите множества доказват прецизността на метода при разграничаването на родовете в *Pyrolaceae*.

Ключови думи: *Moneses*, *Orthilia*, *Pyrola*, ISSR, молекулярна таксономия

Detailed abstract

The family *Pyrolaceae* is represented in Bulgaria by six species, belonging to three genera. The viewpoints for the taxonomical position of the species in this family are not clearly unilateral. The not many morphological characters for the species differentiation are widely variable. The members of the family are semisaprophytic plants with specific endotrophic mycorrhysis resulting to transitions between mutualism and parasitism. These transitions cause variation in the shape and size of the leaves.

The aim of this study is to find molecular markers, allowing the objectively differentiation of the genera in this family, without use of morphological characters.

The study was carried out with living specimens from natural populations. Three species of the family were examined, representing the tree genera distributed in Bulgaria: *Moneses uniflora* (L.) A.Gray, *Orthilia secunda* (L.) House and *Pyrola minor* L. The voucher specimens (Table 1) were deposited in the Herbarium of Agricultural University – Plovdiv (SOA). DNA was isolated from leaves using DNAeasy plant mini kit following the original protocol. Our previous works [3, 4, 5, 6] suggested 4 primers (p817, p826, p836 and p857) as the most useful for the study. The process was optimised with tests of some PCR parameters, including DNA concentration, primer concentration and cycle counts. Reactions without primer were used as negative control. The PCR results were viewed electrophoretically (Fig. 3) as bands and compared to 1 kb DNA marker to register their sizes. The recorded molecular weights, were stored in boolean matrices and processed using cluster analysis (Fig. 1) and non-metric multidimensional scaling (Fig.2). The comparisons from each primer were stored as datasheets with Euclidean distances, then the calculated average distances were used to construct a consequent cladogram.

The analysis of the DNA products displayed similar levels of polymorphism using each of the 4 markers. The dendrograms show good recognition of the PCR products, according to the species. The distribution of the *Moneses* shown high similarity to *Pyrola* using p826 and grouping with *Orthilia* using p817, p836 and p857.

The independent multitudes, obtained using non-metric multidimensional scaling prove the accuracy of the method for recognition of the genera in *Pyrolaceae*. The consequent cladogram, obtained by the mean euclidean distances, displayed grouping of the samples by genera, independently of their locality (Fig. 4).

The genetic relationship of the species from different locations was illustrated as common clads. The highest relationship in *Pyrola* is displayed with the specimens 027 and 005, as the samples from the same region (006 and 007) are formed a neighboring clad. A similar grouping is displayed in the clad of *Orthilia*. The displayed levels of polymorphism are not related to the geographic distances. The grouping of

the both genera shows independence from the locality and lack of populational value. This probably depends of the variation in the reproduction.

The non-metric multidimension scalling (фиг. 2) disposed *Pyrola* and *Orthilia* in opposite quadrants. The sample of *Moneses* was better outlined using the products of p826 and p836. The polygon of *P. minor* is near the center of the p826 diagram. This suggests that in spite of the good grouping in *O. secunda*, and determination of *M. uniflora*, p826 is not conservative enough because it is individually selective in *P. minor*.

This study demonstrated the usability of ISSR method in the investigations of Pyrolaceae. The genetig differentiation of the three groups confirm the taxonomic independence of *Moneses uniflora* and *Orthilia secunda* from the members of genus *Pyrola*.

ВЪВЕДЕНИЕ

Семейство *Pyrolaceae* Lindl. включва 4 рода и около 45 вида, типични психрофити, разпространени в умерните и хладни области на северното полукълбо.

В България са известни 6 вида от семейството, разпределени в 3 рода *Moneses*, *Orthilia* и *Pyrola* [1][2]. Традиционното разграничаване на родовете се основава на морфологични характеристики, които са нестабилни и имат модификационен характер под влияние на околната среда.

В световен мащаб се наблюдава намаляване на размерите на популациите на видовете от семейството, което вероятно се дължи на разпространението на таксоните в специфичните за тях местообитания и размножителни системи [8]. Представителите на семейството са полусапрофитни растения със специфична ендотрофна микориза, в резултат на която се наблюдават преходи от мутуализъм към паразитизъм. Това е причина да се наблюдава вариране във формата и размерите на листата [7].

През последните години за откриване и оценка на генетичното разнообразие при растенията широко се използва ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) метода [12].

Целта на изследването е оценка генетичния полиморфизъм за таксономичната интерпретация на семейство *Pyrolaceae* в България чрез прилагане на ISSR маркери.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проучването е проведено върху живи образци от естествени популации. Изследвани са три вида от семейството, принадлежащи към трите разпространени в България рода: *Moneses uniflora* (L.) A.Gray, *Orthilia secunda* (L.) House и *Pyrola minor* L. Материалите (Табл. 1) са събирани през 2009 г. Ваучерни образци са депозиранни в Хербариума на Аграрен университет – Пловдив (SOA).

Свежи листа от растенията са замразени и стрити на фин прах с течен азот. Около 100 mg от материала са използвани за изолиране на геномна ДНК посредством DNaesy plant mini kit, следвайки оригиналния му протокол. Предварително са тествани ISSR праймери от колекцията на Сеулския държавен университет. Изводи от авторски изследвания в други родове висши растения [3,4,5,6] показват като най-удачни за работа с *Pyrolaceae* четири ISSR олигонуклеотидни праймера (p817, p826, p836 и p857), с по два арбитарни пуринови нуклеотида в 3'-края са използвани за ISSR-PCR. 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 ml PCR епруветки съдържащи 2 ml (150 ng) DNA матрица; 1 ml праймер (100 nmol.l⁻¹ концентрация); 25 ml PCR мастър микс (Fermentas, Cat No K0171) и 22 ml вода свободна от ДНК-ази (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 35 цикъла при 94° C – 1 min; 55° 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 ml буфер за нанасяне (Fermentas #R0611) и разделяни посредством 1,5% агарозен гел, съдържащ 0.5 mg/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”.

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 булеви матрици (наличие - 1 и отсъствие - 0). 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 и многомерното скалиране е използвана програмата PAST [10].

От получените матрици с евклидови разстояния от всички резултати са взети средни стойности, които са въведени в нова диагонална матрица на разстоянията и са използвани за конструиране на кладограма с помощта на T-Rex 3.0a1 [11] по метода Bio-NJ, която е визуализирана с PhyloDraw 2.0 [9].

РЕЗУЛТАТИ

Анализът на разпределението на полиморфните ивици на ДНК-продукти, получени чрез ISSR показва сходни нива на полиморфизъм и при четирите маркера (фиг. 1, 2, 3). Дендрограмите, получени чрез кластер-анализ, показват добро разделяне на PCR продуктите от *Pyrola minor* и *Orthilia secunda* в зависимост от видовата принадлежност.

Разпределянето на продуктите с р826 показва по-голямо генетично сходство на *Moneses* с две от пробите принадлежащи към род *Pyrola*, докато при р817, р836 и р857 той се групира с различни проби от *Orthilia* (фиг. 1, 2).

ОБСЪЖДАНЕ

Генетичната близост на видове от различни райони, групирани в общ клад показва родство и принадлежност към три ясно обособени таксономични групи. Най-високо генетично сходство в групата *Pyrola* показват пробите от 027 и 005, в сравнение с останалите проби от същия район (006 и 007), които се групират в близък, но обособен клад. Подобно групиране се наблюдава и в клада на *Orthilia*. Проба 007 от Бойково показва най-голямо генетично сходство с тази от Широка поляна (008). Тези нива на генетичен полиморфизъм нямат пряка връзка с географските разстояния. Групирането в двата рода показва независимост от локалитета и няма популационен характер. Това вероятно се дължи на факта, че видовете се размножават както семенно, при наличие на специфична микоризна гъба, така и вегетативно, чрез коренища.

При сравняване на диаграмите от неметрично многомерно скалиране (фиг. 2), се наблюдава, че независимо от използваните праймери, техните PCR продукти разполагат *Pyrola minor* и *Orthilia secunda* в противоположни квадранти на координатната система. Образецът от *Moneses uniflora* се отделя по-ясно в координатната система при продуктите на р826 и р836. Полигонът на *P. minor* в диаграмата на р826 е близо до центъра на координатната система. Това означава, че въпреки доброто групиране на *O. secunda* и отделяне на *M. uniflora*, р826 не е достатъчно консервативен и е селективен на индивидуално ниво при *P. minor*. Независимите множества, получени чрез неметрично многомерно скалиране демонстрират прецизността на метода за диференциране на таксони в *Pyrolaceae*.

В обобщената кладограма (фиг. 4), получена от изчисляване на средни евклидови разстояния, не се наблюдава разпределяне на изследваните популации по географска локализация. Обособяват се три групи, независими от локалитета на пробите, което потвърждава таксономичния им родов ранг. Генетично род *Moneses* показва по-голяма близост с род *Pyrola*, което кореспондира с близки морфологични белези (форма на листа), местообитания (сенчести и влажни места в иглолистни гори над 1200 м н. в.) и плътност на популациите в сравнение с род *Orthilia*, който проявява по-голяма толерантност по отношение на влажността и по-широк височинен диапазон (1000-2000 м н. в.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Това проучване демонстрира, че ISSR е подходящ метод за изследване на генетичните различия между филогенетично близки групи, принадлежащи към семейство *Pyrolaceae*. Генетичната диференциация на трите групи подкрепят таксономичната обособеност на *Moneses uniflora* и *Orthilia secunda* от представителите на род *Pyrola*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Това изследване е реализирано с финансовата подкрепа на договори ИФС-Б-606 и ДТК-02/40 при МОН.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Анчев, М., *Pyrolaceae* Lindl., в: Йорданов Д. (ред.), Флора на Р България. Т. VIII, изд. БАН, София, 1982. 279-287.
- [2] Делипавлов, Д., Чешмеджиев Ил. (ред.), Определител на растенията в България. 147. Акад. изд. АУ-Пловдив, 2003
- [3] Райчева Цв., Денев Ил., Димитрова Д., Стоянов К., Молекулярно-таксономично изследване на вътревидовата изменчивост при *Rumex pulcher* L. (*Polygonaceae* Juss.) в България. В: Велчева И., Цеков А. (ред.), Юбилейна научна конференция по екология (сборник доклади) (2009), 1.11.2008., Пловдив, 66-75.
- [4] Райчева Цв., Денев И., Тестване на ISSR маркери при *Rumex acetosella* complex в България. Юбилейна научна конференция с международно участие Традиции и предизвикателства пред аграрното образование, наука и бизнес. Научни трудове на Аграрен университет – Пловдив (2010), 55 (2): 149-154
- [5] Стоянов, К., Денев Ил., Таксономично изследване на пет вида *Phelipanche* (Pomel) Sojak (Orobanchaceae) в България с помощта на ISSR маркери, in:

Велчева И., Цеков А. (ред.), Юбилейна научна конференция по екология (сборник доклади) (2009), 1.11.2008., Пловдив, 76-84

- [6] Стоянов К., Денев И. Регионално молекулярно-таксономично изследване на *Orobanche* sect. *Glandulosae* чрез ISSR маркери. Юбилейна научна конференция с международно участие Традиции и предизвикателства пред аграрното образование, наука и бизнес. Научни трудове на Аграрен университет – Пловдив (2010), 55 (2): 101-106
- [7] Терехин, Э.С., Паразитные цветковые растения: эволюция онтогенеза и образ жизни. «Наука», Ленинград, 1977.
- [8] Beatty, G.E., McEvoy, P.M., Sweeney, O., Provan, J., Range-edge effects promote clonal growth in peripheral populations of the one-sided wintergreen *Orthilia secunda*. *Diversity and Distributions* (2008), 14: 546-555.
- [9] Choi JH, Jung HY, Kim HS, Cho HG., PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics* (2000), Nov;16(11):1056-1058.
- [10] Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica* (2001) 4(1): 9
- [11] Makarenkov, V., T-REX: reconstructing and visualizing phylogenetic trees and reticulation networks. *Bioinformatics* (2001), 17(7) : 664-668.
- [12] Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., Genome fingerprinting by simple sequence repeats(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* (1994), 20: 176-183.

Table 1. Voucher specimens (floristic region, UTM-coordinates, locality, collector, numbers)

Таблица 1. Ваучерни образци (флористичен район, УТМ-координати, локалитет, колектор, номер).

Moneses uniflora

Родопи(з): 35TKG63. гората над яз. Широка поляна, 1497 m, Ts.R. 04.05.2009, 09MON0001, SOA s/n

Rhodopes(w): 35TKG63. the forest above Shiroka-polyana dam lake, 1497 m, Ts.R. 04.05.2009, 09MON0001, SOA s/n

Orthilia secunda

Родопи(з): 35TKG62: гората над яз. Широка поляна, 1519 m, Ts.R. 09.2009, 09ORS0008, SOA s/n.

Rhodopes(w): 35TKG62: the forest above Shiroka-polyana dam lake, 1519 m, Ts.R. 09.2009, 09ORS0008, SOA s/n.

Родопи(с): 35TLG15: гората между Копривките и Цар Калоян, 1118 m, K.S. 4.05.2009, 09ORS0001, SOA s/n; 35TLG05: гората по пътя Бойково-Равнища, 1085-1187 m, K.S. 08.08.2009, 09ORS0005, 09ORS0006, 09ORS0007, SOA s/n.

Rhodopes(c): 35TLG15: the forest between Koprivkite and Tsar Kaloyan, 1118 m, K.S. 4.05.2009, 09ORS0001, SOA s/n; 35TLG05: the forest near the way Boykovo-Ravnishta, 1085-1187 m, K.S. 08.08.2009, 09ORS0005, 09ORS0006, 09ORS0007, SOA s/n.

Pyrola minor

Стара планина(с): 35TLH22: по пътеката между Карлово и х. Хубавец, 925 m, K.S. 30.07.2009, PYRO-0027, SOA s/n

Stara planina(c): 35TLH22: the path between Karlovo and Hubavets refuge, 925 m, K.S. 30.07.2009, PYRO-0027, SOA s/n

Родопи(с): 35TLG05: гората по пътя Бойково-Равнища, 1121 m, K.S. 08.08.2009, 09PYR0005, 09PYR0006, SOA s/n; гората между х. Равнища и ман. Св. Богородица, 1340 m, K.S. 09.09.2009, 09PYR0007, SOA s/n

Родопи(с): 35TLG05: the forest on the way Boykovo-Ravnishta, 1121 m, K.S. 08.08.2009, 09PYR0005, 09PYR0006, SOA s/n; the forest between Ravnishta refuge and the monastery St. Bogoroditsa, 1340 m, K.S. 09.09.2009, 09PYR0007, SOA s/n

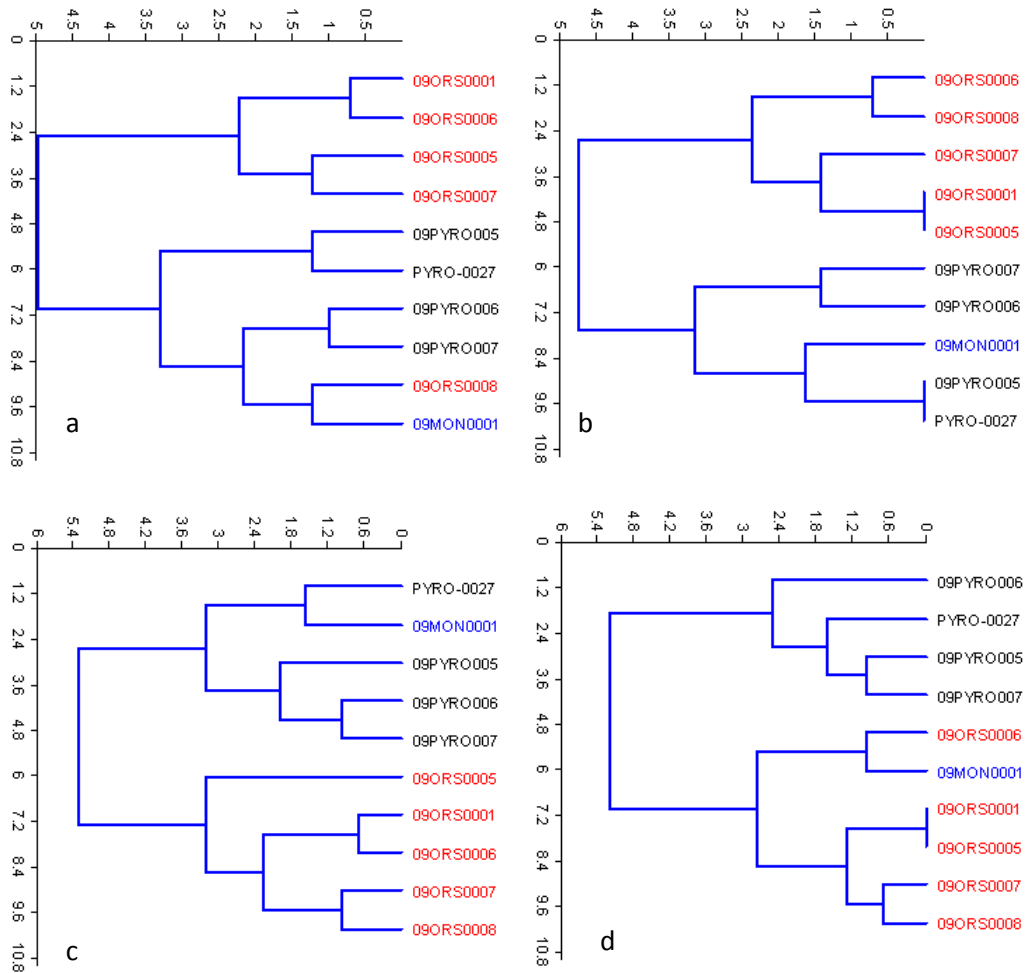
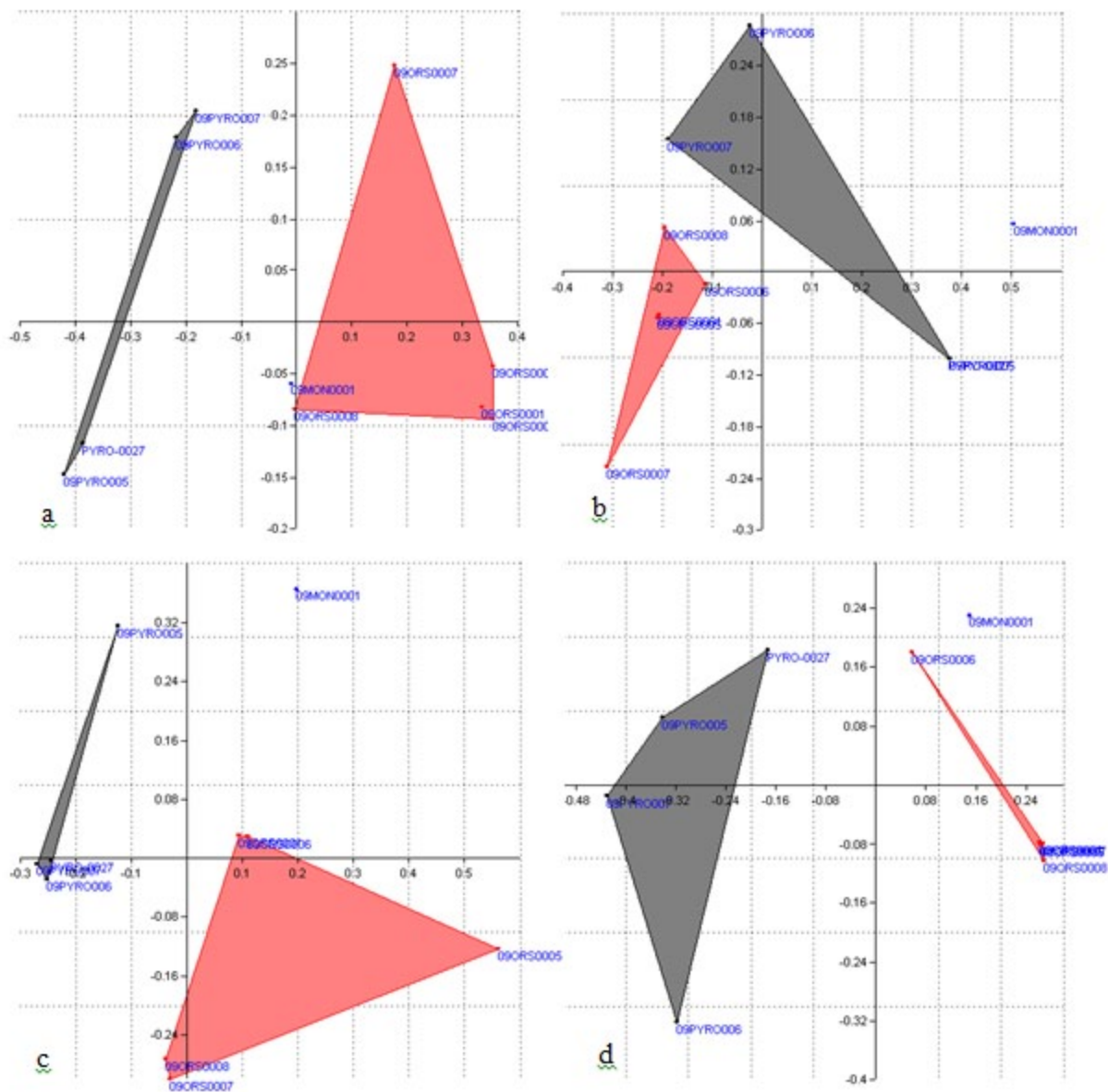


Fig.1. Cluster analysis of the results obtained by the PCR amplification using the primers p817 (a), p826 (b), p836 (c) и p857 (d)

Фиг. 1. Кластер анализ на резултатите получени от PCR-реакции с праймерите p817 (a), p826 (b), p836 (c) и p857 (d)



Фиг. 2. Неметрично многомерно скалиране на резултатите от PCR с праймерите: p817 (a), p826 (b), p836 (c) и p857 (d).

□ - полигон на *Pyrola minor*, □ - полигон на *Orthilia secunda*

Fig. 2 Non-metric multidimensional scaling of the PCR – results using the primers: p817 (a), p826 (b), p836 (c) и p857 (d).

□ - polygon of *Pyrola minor*, □ - polygon of *Orthilia secunda*

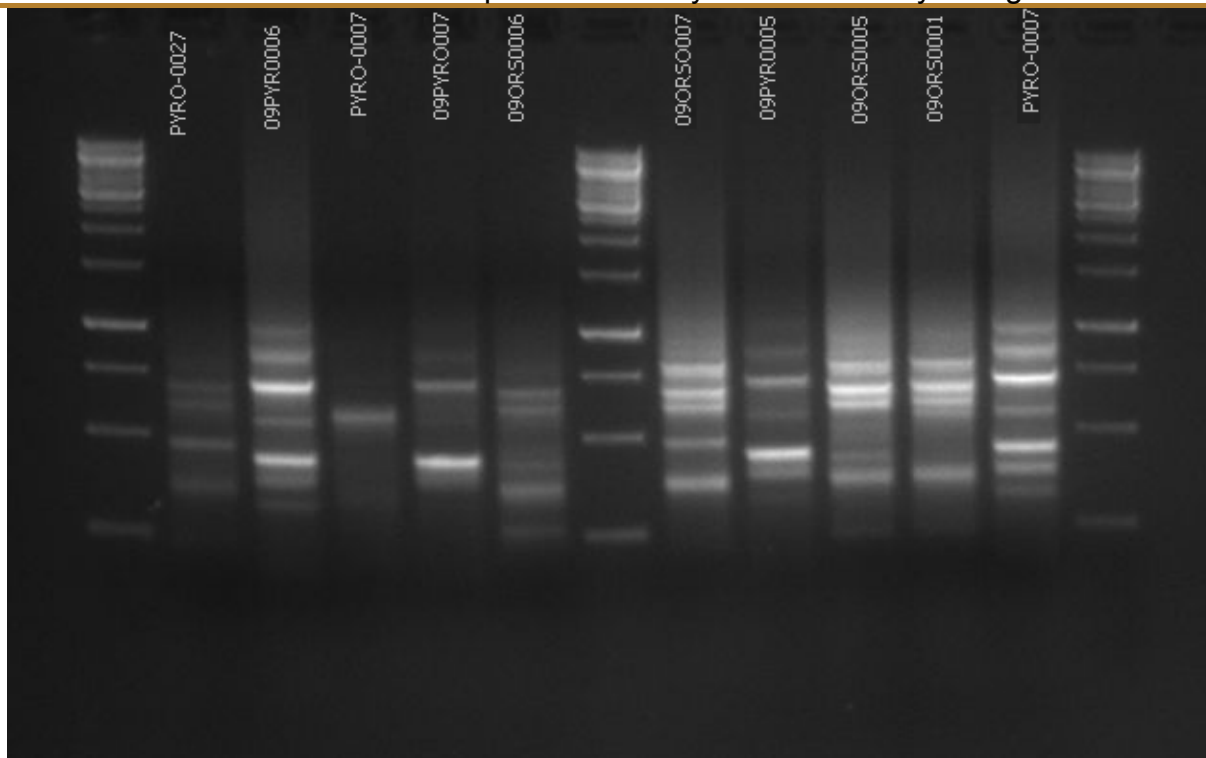


Fig. 3. Electrophoretically displayed products of the amplification using p836
 Фиг. 3. Электрофоретично проявени продукти от амплификация с p836

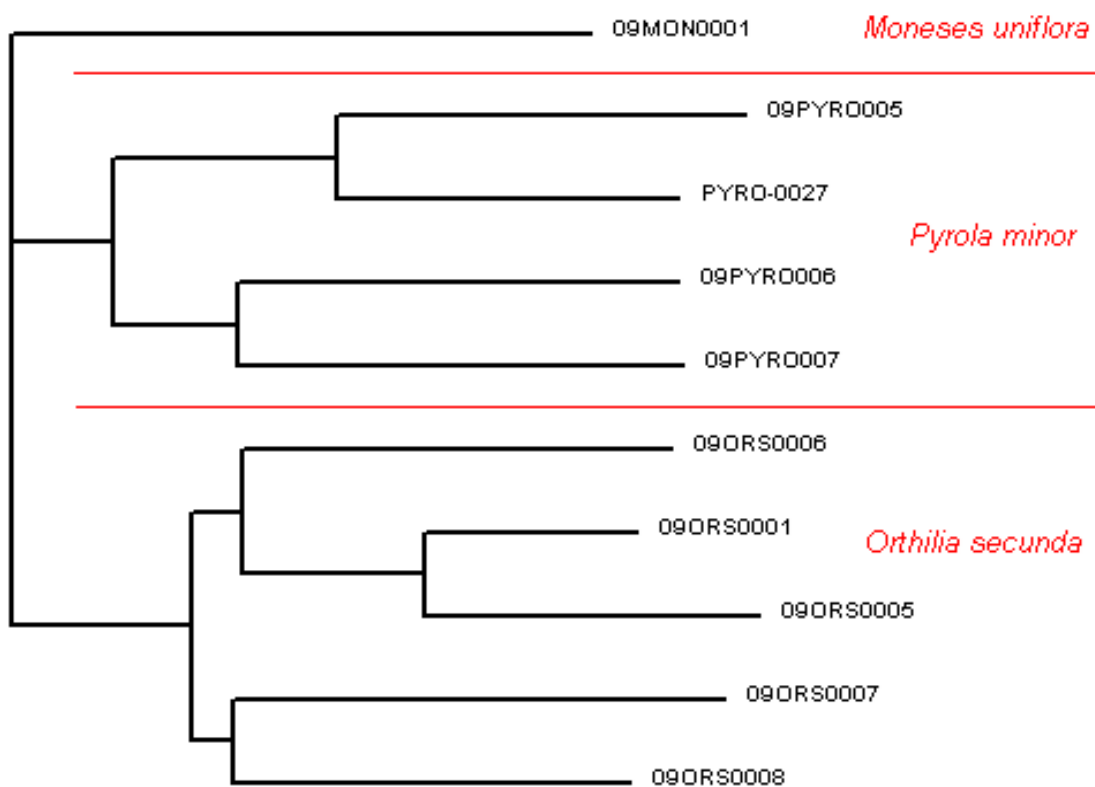


Fig. 4. Consequent cladogram of the united data