

Изследване на междувидовите отношения при българските представители на сем. *Orobanchaceae* посредством ISSR маркери

Кирил Стоянов¹, Илия Денев²

¹ Аграрен университет, бул. „Менделеев“ 12, 4000 Пловдив

² ПУ „Паисий Хилендарски“, ул. „Цар Асен“ 24, 4000 Пловдив, e-mail: iliden@uni-plovdiv.bg

Abstract

Stoyanov, K. & Denev, I. 2012. Investigation of the interspecific relationships between Bulgarian representatives of *Orobanchaceae* using ISSR markers. – In: Petrova, A. (ed.), Proc. VII Natl. Conf. Bot., 29–30.09.2011, Sofia, pp. 321–331. Bulg. Bot. Soc., Sofia. ISBN 978-954-92808-2-1

Microsatellite markers were used for evaluation of the biodiversity and phylogenetic relationships between Bulgarian representatives of the family *Orobanchaceae*. The plants were collected from various locations in the country. The DNA was isolated from the flowering stems and used as template for ISSR-PCR reactions. Eight out of 16 primers were selected for this study. The ISSR products were separated on agarose gel and visualized by UV-light. The molecular masses of the products were determined and used to fill Boolean matrices that were subjected to cluster analysis. Representatives from genus *Lathraea* (*Scrophulariaceae*) were used for external controls. The consequent cladograms, based on the average Euclidean distances, displayed clear grouping by species. Genus *Lathraea* was clearly separated from the representatives of *Orobanchaceae*. The representatives of subject. *Minores* were grouped in a separate cluster, as well as *O. gracilis* and *O. cumana*. *Orobanche cumana* showed genetic variability that depended on the host. The molecular markers confirmed the existence of *O. caryophyllacea* var. *macrolepis* and *O. gracilis* var. *sprunerii*.

Key words: cluster analysis, ISSR, *Lathraea*, microsatellite markers, *Orobanchaceae*

Въведение

Семейство *Orobanchaceae*, в съвременния му обхват, е най-голямото семейство паразитни висши растения (Bennett & Mathews 2006). В повечето регионални флори семейството е възприемано в „класическия“ му състав от облигатни коренови паразити (Цвелев 1981; Делипавлов 1995b; Zazvorka 2000; Foley 2001). Много автори го причисляват в състава на сем. *Scrophulariaceae* (Chater & Webb 1972; Teryokhin 1997). Други автори (Olmstead & al. 2001; Bennett & Mathews 2006), основавайки се на молекулярни изследвания, възприемат това семейство в по-голям обем, като

включват в състава му паразитни, полупаразитни и автотрофни представители на *Scrophulariaceae*. Част от видовете, които са с икономическо значение, се изследват интензивно, но техните диви родственици често се пренебрегват, въпреки че някои от тях имат консервационна стойност.

Представите за видовия състав на *Orobanchaceae* в България са основани на ревизията от Георгиев (1937) и разработката във *Флора на Р България* (Делипавлов 1995b). И в двата труда е възприета концепцията на Beck (1890). Съгласно Teryokhin (1997) българските представители на семейството са разпределени в два рода – *Phelipanche* Pomel и *Orobanche* L. Следвайки неговата таксономична схема, в България род *Phelipanche* е представен от секциите *Phelipanche* – с 3 вида, и *Arenariae* (Andary) Teryokhin – с 2 вида. Род *Orobanche* s.l. е представен от секциите *Inflatae* (Beck) Tzvelev – с 1 вид, и *Orobanche*. Последната секция е най-голяма и у нас е представена от подсекциите *Glandulosae* (Beck) Teryokhin – с 4 вида, *Minores* (Beck) Teryokhin – с 6 вида, *Galeatae* (Beck) Teryokhin – с 3 вида, *Orobanche* – с 3 вида, и *Cruentae* (Beck) Teryokhin – с 1 вид. Класификацията в *Orobanche* s.l. се затруднява от силната вътревидова изменчивост и редуцираните, малко на брой и непостоянни морфологични признаци.

Различни автори отнасят род *Lathraea* L. в *Orobanchaceae* (Beck 1930; Zhang & Tzvelev 2004; Olmstead & al. 2001) или в *Scrophulariaceae* s.str. (Новопокровски, Цвелев 1958; Thieret 1971). В българските „Флори“ този род е отнасян към сем. *Orobanchaceae* до 1948 г., а в по-новите издания е в *Scrophulariaceae*. У нас е представен от два рядко срещани се вида – *L. squamaria* L. и българския ендемит *L. rhodopaea* Dingler (Делипавлов 1995а).

Широко използван през последните години в молекулярната таксономия метод е ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats). Това е сравнително нов (Zietkiewicz & al. 1994), PCR-базиран метод, при който се използват единични праймери с дължина 16–18 нуклеотидни двойки, комплементарни на определени микросателитни секвенции. Праймерите могат да са закотвящи се, ако съдържат в 3' или 5' края си 2–4 арбитрарни нуклеотида. В ISSR-базираните изследвания най-често се използват ди- и тринуклеотидни типове микросателити, защото те са характерни за ядрения геном. Всеки ISSR-продукт кореспондира с фрагмент геномна ДНК, обградена от два микросателита с огледално обърнати секвенции (Zietkiewicz & al. 1994; Tsumura & al. 1996; Nagaoka & Ogihara 1997). ISSR методът е високо информативен и съчетава бързината на RAPD с надеждността на SSR методите. За разлика от SSR, при дизайна на праймерите не е необходимо да се знае предварително таргетната секвенция.

Надеждността и простотата на ISSR метода, сравнен с RFLP и RAPD, го правят предпочитан в таксономичните изследвания (Nagaoka & Ogihara 1997). Тези особености и по-голямата възпроизводимост, го правят по-удобен от другите налични маркерни системи в изследване на генетични вариации с близкородствени видове (Fang & Rose 1997; Nagaoka & Ogihara 1997). Изследвания на Benharrat & al. (2002) доказаха, че ISSR методът позволява успешно да се разграничават видовете *Orobanche hederatae*, *O. amethystea*, *O. cernua* и *O. cumanica*. Методът е проложим и

за характеризиране на между- и вътрепопулационното разнообразие, напр. при *Orobanche crenata* (Román & al. 2002) и *O. minor* (Thorogood & al. 2008, 2009).

При предишни изследвания (Hristova & al. 2011) беше установено, че 16 ISSR праймера са използвани за молекулярно-таксономични изследвания на *Orobanchaceae*, като 13 от тях дават полиморфни ивици, позволяващи разграничаването на родово и видово ниво, а други три, вероятно са приложими на надродово ниво. В настоящото изследване са тествани осем от тези праймери.

Целта на представеното изследване е да се оцени селективността на избраните праймери за изследване на междувидовите отношения в семейството и тяхната стойност на различни филогенетични нива.

Материали и методи

За съпоставяне на селективността на маркерите по родове, секции и подсекции са изследвани общо 20 образци от видовете *Phelipanche mutelii* (F.W.Schultz) Pomel, *Orobanche* sect. *Inflatae* (*O. cumanica* Wallr.), subsect. *Galeatae* (*O. caryophyllacea* Sm. – var. *caryophyllacea* и var. *macrolepis* T. Georgiev, *O. lutea* Baumg., *O. teucrisii* Holandre), subsect. *Minores* (*O. minor* Sm., *O. amethystea* Thuill., *O. pubescens* d'Urv.), subsect. *Glandulosae* (*O. alba* Steph., *O. panicisii* Beck) и subsect. *Cruentae* [*O. gracilis* Sm. – var. *gracilis* и var. *sprunerii* (F.W. Schultz) Beck]. В изследването са включени двата български представителя на род *Lathraea*. Във всяка таксономична схема този род е филогенетично по-отдалечен, в сравнение с другите два близки рода. С използването му се цели претегляне на селективността на избраните маркери на различни филогенетични нива. Пробите са събрани през периода 2006–2010 г., от различни райони и върху различни гостоприемници. Хербарни образци към всяка от изследваните проби са достъпни в Хербариума към Аграрен университет, Пловдив – SOA (Таблица 1).

Таблица 1. Образци на изследваните проби по флористични райони, координати, гостоприемници, дати, автори, проби и хербарни номера.

<i>Orobanche cumanica</i>	
Черноморско крайбрежие (Северно):	35TNH89, с. Кранево, 110 m, pl.n. <i>Artemisia santonicum</i> , 14.06.2006, К. Стоянов, А. Пухядас, Б. Перез, #2006.075, SOA 059464.
Родопи (Източни):	35TMF29, с. Свирачи, 243 m, pl.n. <i>Helianthus annuus</i> , 19.06.2008, К. Стоянов, #2008.022, SOA 059339.
Тракийска низина:	35TLG16, гр. Пловдив, 164 m, pl.n. <i>H. annuus</i> , 28.06.2006, К. Стоянов, #2006.100, SOA s/n.
<i>Orobanche alba</i>	
Родопи (Средни):	35TLG25, гр. Асеновград, 267 m, pl.n. <i>Thymus</i> sp., 07.05.2006, К. Стоянов, #2006.028 SOA s/n.
<i>Orobanche panicisii</i>	
Черноморско крайбрежие (Северно):	35TNJ90, гр. Балчик, 101 m, pl.n. ? <i>Seseli</i> , 14.06.2006, К. Стоянов, А. Пухядас, Б. Перез, #2006.079, SOA 059466 (sub <i>O. alsatica</i>).
<i>Orobanche minor</i>	
Родопи (Западни):	34TGM13, с. Елешница, 756 m, pl. n. <i>Vicia hirsuta</i> , 12.06.2008, К. Стоянов, #2008.015, SOA s/n.
<i>Orobanche amethystea</i>	
Родопи (Средни):	35TLG15, с. Марково, 475 m, pl.n. <i>Eryngium campestre</i> , 31.05.2008, К. Стоянов, #2008.004, SOA 059334 (sub <i>O. elatior</i>).

Таблица 1. Продължение.

Orobanchе pubescens

Тракийска низина: 35TKG86, Бесепарски ридове - Еленски вр., 417 m, pl.n. *Orlaya grandiflora*, 25.05.2008, К. Стоянов, #2008.009 SOA s/n.

Orobanchе lutea

Родопи (Средни): 35TLG13, с. Павелско, 869 m, pl.n. *Chamaecytisus cf. albus*, 10.06.2007, К. Стоянов, #2007.076, #2007.078, SOA s/n.

Orobanchе caryophyllacea* var. *caryophyllacea

Черноморско крайбрежие (Северно): 35TPJ21, местн. Яйлата, 17 m, pl.n. *Galium(?)*, 17.05.2010, К. Стоянов, #2010.025 SOA s/n.

Orobanchе caryophyllacea* var. *macrolepis

Стара планина (Източни): 35TMH43, прохода Вратник, 830 m, pl.n. ?, 10.07.2008, К. Стоянов, #2008.035.

Orobanchе teucriti

Тракийска низина: 35TKG96, с. Ново село, 284 m, pl.n. *Cirsium* sp., 02.05.2007, К. Стоянов, #2007.012, SOA s/n.

Orobanchе gracilis* var. *gracilis

Стара планина (Западни): 34TFN77, прохода Петрохан, 1302 m, pl.n. *Chamaespartium sagittale*, 5.07.2006, К. Стоянов, #2006.113, SOA s/n.

Родопи (Западни): 34TGM45, ез. Клептуза, 826 m, pl.n. *Chamaecytisus austriacus*, 06.06.2006, К. Стоянов, #2006.052, SOA s/n.

Orobanchе gracilis* var. *sprunerii

Родопи (Средни): 35TLG02, с. Зорница, 1286-1295 m, pl.n. *Fabaceae*, 4.07.2010, К. Стоянов, #2010.048, #2010.029, SOA s/n.

Phelipanche tutelii

Родопи (Средни): 35TLG52, гр. Габрово, 650 m, pl.n. *Nicotiana tabacum*, 10.08.2006, К. Стоянов, #2006.151, SOA 059208.

Lathraea squamaria

Родопи (Средни): 35TLG05, с. Марково, 529 m, pl.n. *Carpinus orientalis*, 04.05.2009, К. Стоянов, #9LSq01, SOA s/n.

Lathraea rhodopaea

Родопи (Средни): 35TLG05, с. Марково, 457-560 m, pl.n. *Carpinus orientalis*, 04.05.2009, К. Стоянов, #9LRh02, #9LRh03, SOA s/n.

ДНК е изолирана от съцветия посредством DNeasy Plant Mini kit (Qiagen). ISSR-PCR реакциите са провеждани с 250 µl PCR епруветки, съдържащи 2 µl (150 ng) ДНК матрица; 1 µl праймер (100 mmol.l⁻¹ концентрация); 25 µl PCR ма-стър 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 мин; 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 µl бу-фер 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 7 V/cm. Размерът на продуктите е определен по 1 kb ДНК маркер (Fermentas GeneRuler#SM0311). Агарозните гелове са фотографирани на UV-свет-лина посредством гел-документираща система BioVision 3000^{Plus}. Молекулните маси на фрагментите спрямо използвания ДНК-маркер са преразпределени в кла-сове и въведени като булеви данни. За резултатите от всеки праймер са построени

дендрограми (клъстер анализ – Ward's method) и биplotове (неметрично многомерно скалиране) с програмата PAST (Hammer & al. 2001).

Резултати и обсъждане

Молекулните маси на получените PCR продукти са изчислени спрямо ДНК-маркера. Разпределени по класове (Таблица 2), те са използвани за оценяване на приложимостта на използваните осем праймера.

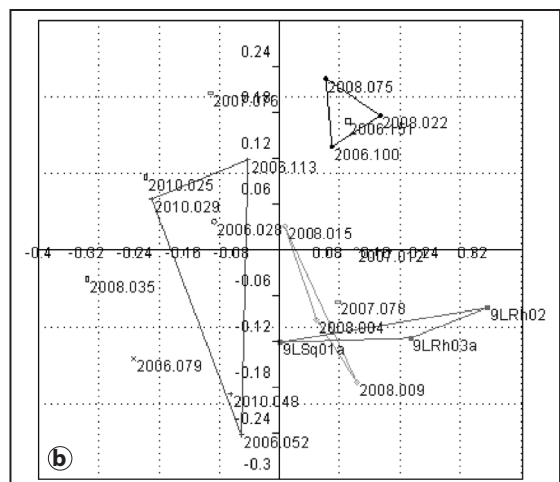
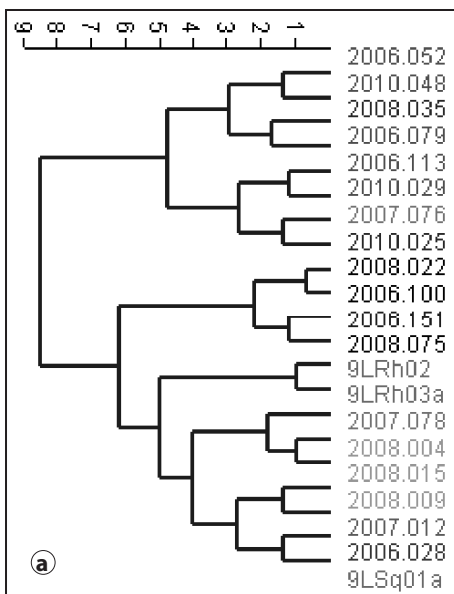
При продуктите на p2 (Фиг. 1), пробите от *O. citana* се отделят от останалите изследвани видове и се групират с *P. mutelii*. Видовете *O. gracilis* и *O. caryophyllacea* се групират заедно. Двата вида от род *Lathraea*, въпреки че остават във вътрешен клъстер, се отделят ясно един от друг и се групират в общ клъстер, заедно с представителите на subsect. *Minores*.

Неясно е групирането на продуктите от p7 (Фиг. 2). *Lathraea* и *O. citana* се отделят от останалите видове. Липсва подреждане в род *Lathraea*. При изключване на родовете *Phelipanche* и *Lathraea*, маркерът проявява селективност към секциите на род *Orobanchae*.

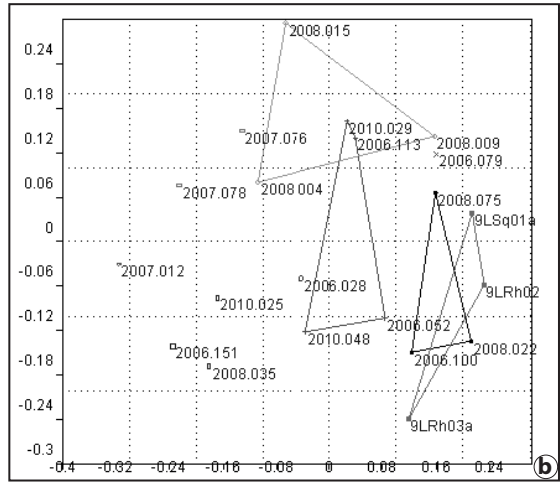
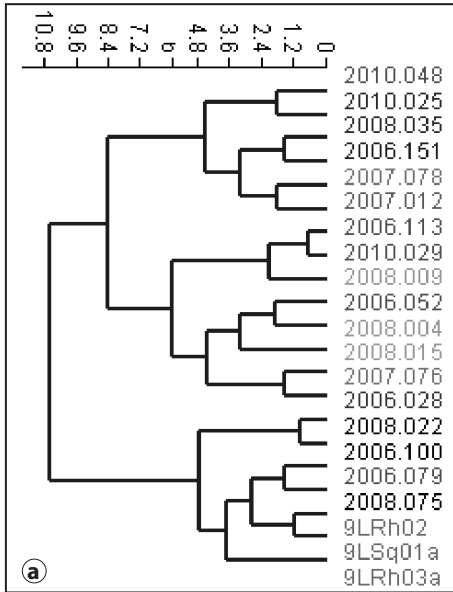
При продуктите от p809 (Фиг. 3) *O. gracilis* се отделя без групиране по разновидности. Видовете от subsect. *Minores* се разполагат далеч един от друг в клъстер от втори ред. Праймерът е селективен за *Orobanchae caryophyllacea* и *O. lutea*. Въпреки

Таблица 2. Получени фрагментни класове и молекулни маси на PCR фрагментите.

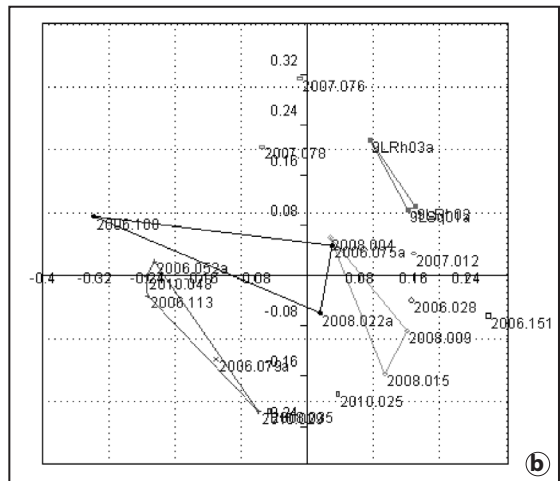
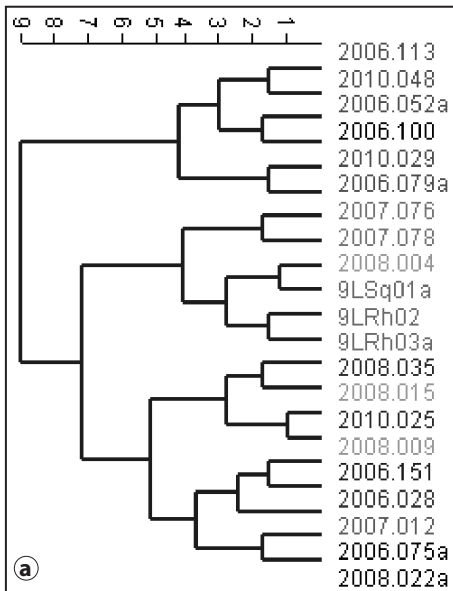
Праймер	Брой класове	Молекулни маси, н.д. (min-max)
p2	20	181–1417
p7	27	145–1889
p809	26	59–1444
p817	31	102–2250
p826	33	125–1773
p836	31	71–2310
p841	28	55–2158
p891	29	67–1322



Фиг. 1. Разделяне на продуктите от p2: а – клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.



Фиг. 2. Разделяне на продуктите от р7: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.



Фиг. 3. Разделяне на продуктите от р809: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.

че род *Lathraea* попада в най-вътрешните възли, разклоняването в неговия клъстер съответства с видовата принадлежност на пробите. Биplotът показва селективност за *Lathraea*, *O. gracilis*, и subsect. *Minores* (Фиг. 3б).

Маркерът р817 (Фиг. 4) разделя двата вида от род *Lathraea* и относително добре групира *O. gracilis*. Двете разновидности на *O. caryophyllacea* се разделят в първия възел. Сравнително добро е групирането в subsect. *Minores*. Пробите от *O. lutea* са в общ клъстер и subsect. *Glandulosae*. Както се вижда от биplotа, този маркер не е селективен за *O. citana*, а е селективен за видовете от *Orobanchae* sect.

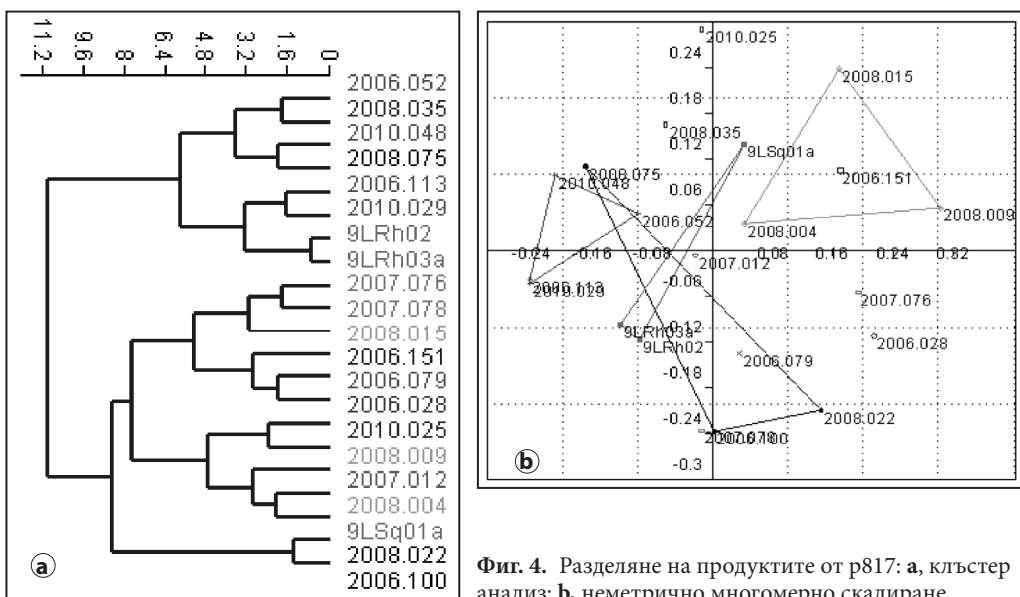
Orobanche. Селективността на маркера е добра в род *Lathraea* – двата вида попадат в противоположни квадранти на биплота.

Сравнително добро е групирането на продуктите от р826 (Фиг. 5). Род *Lathraea* се отделя в клъстер във втория възел, с подреждане по видове. *Orobanche cumana* се групира с *O. alba* в собствен клъстер. Subsect. *Minores* се групират заедно в клъстер и показват близко родство. *Orobanche gracilis* и *O. lutea* се групират в общ клъстер без закономерности. Двете разновидности на *O. caryophyllacea* попадат в отдалечени клъстери. От биплота се вижда добра селективност за видовете в *Lathraea*, *Orobanche* subsect. *Minores*, *O. gracilis* и *O. cumana*.

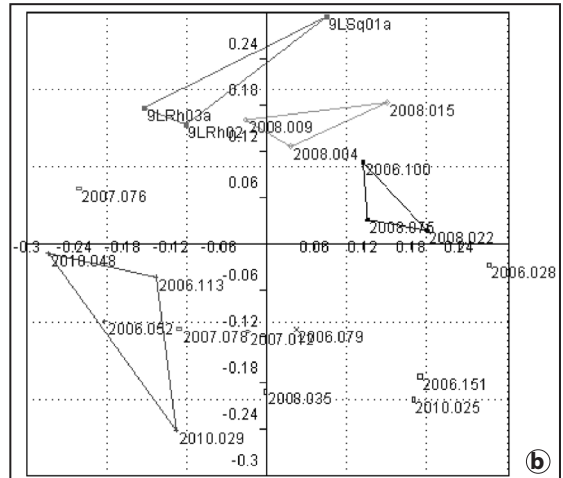
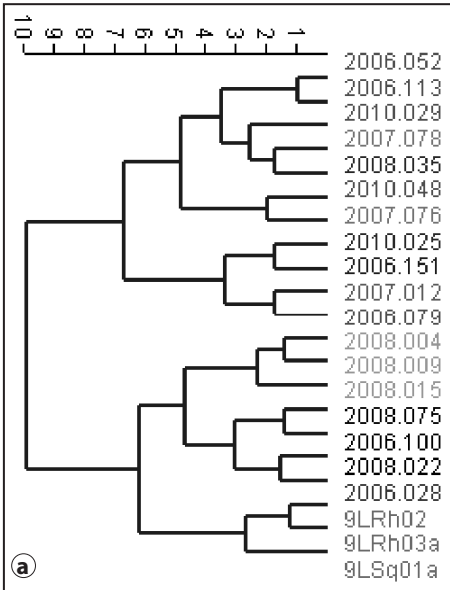
При продуктите на р836 двете разновидности на *O. gracilis* се разделят в първия възел (Фиг. 6). На същото ниво се отделят *O. cumana*, sect. *Minores* и двата вида от род *Lathraea*. Добро групиране се наблюдава при пробите от *O. lutea* и *O. caryophyllacea*. Биплотът показва селективност на маркера в границите на родовете, но липсва разграничаване на родово ниво.

При продуктите от р841 (Фиг. 7) липсва закономерност в разпределението на пробите от род *Lathraea*. Разделянето на *O. caryophyllacea* от *O. lutea* става още в първия възел, но без групиране на пробите. Наблюдава се добро групиране на разновидностите на *O. gracilis* и разделянето им във втория възел. В биплота тези две разновидности попадат в различни квадранти.

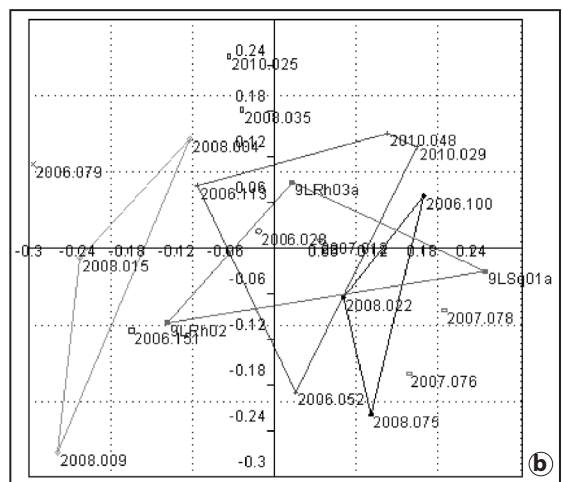
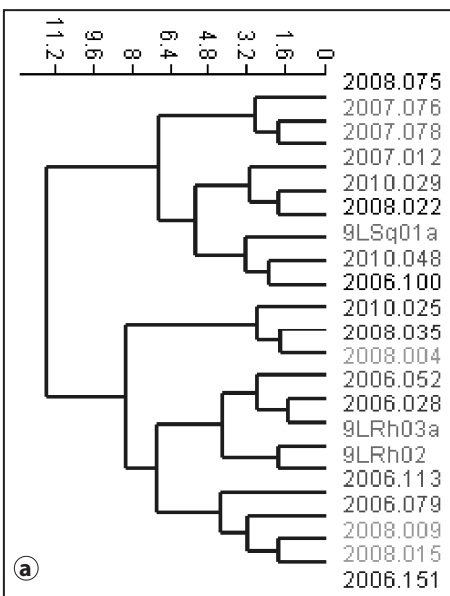
При продуктите от р891 двата вида от род *Lathraea* се групират и се разделят един от друг на ниво втори възел, в общ клъстер с *O. subsect. Minores*, *O. cumana* и *O. caryophyllacea* (Фиг. 8). Пробите на *O. gracilis* и *O. lutea* се групират сравнително добре, но без разделяне по разновидности в *O. gracilis*. Пробата от *O. teucris* се обединява в клъстер с *O. caryophyllacea*. Биплотът демонстрира селективност на маркера за *O. gracilis* и *O. lutea*, и неясна за останалите изследвани представители.



Фиг. 4. Разделяне на продуктите от р817: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.

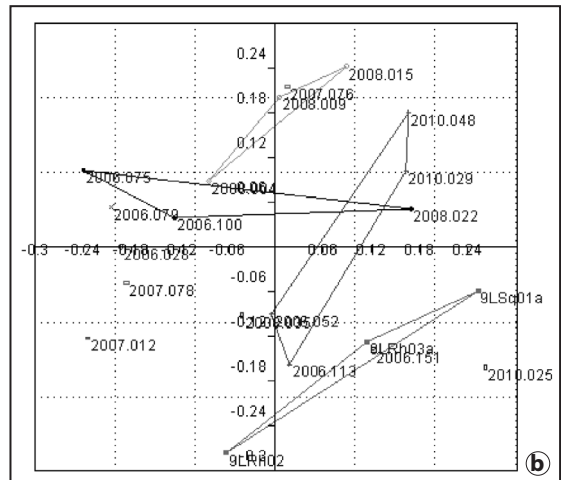
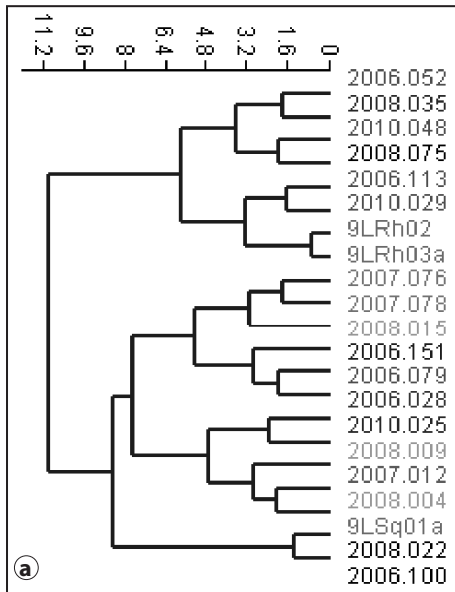


Фиг. 5. Разделяне на продуктите от p826: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.

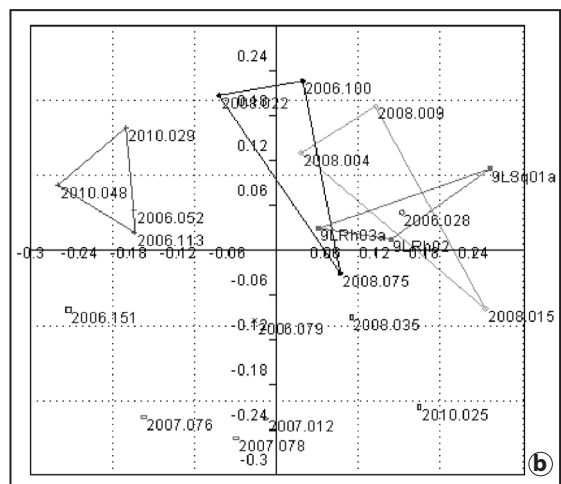
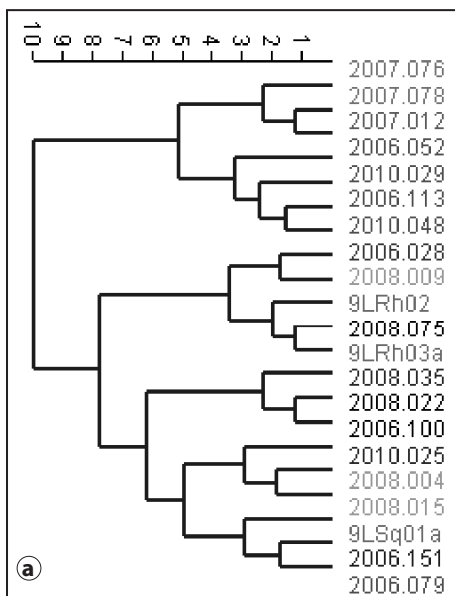


Фиг. 6. Разделяне на продуктите от p836: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.

Използваните праймери проявяват различна селективност при разделяне на родове, видове и разновидности. Добро е групирането в subsect. *Minores*, както и при *O. gracilis* и *O. cutana*. Използваните маркери се оказват недостатъчно селективни при разделянето на sect. *Inflatae* и subsect. *Glandulosae*. *Phelipanche mutelii* и *Lathraea* остават във вътрешни клъстери с видовете от род *Orobanchae* (Фиг. 1–8). Тези факти показват, че избраните маркери не са селективни на ниво род и семейство.



Фиг. 7. Разделяне на продуктите от p841: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.



Фиг. 8. Разделяне на продуктите от p891: а, клъстер анализ; б, неметрично многомерно скалиране.

Специфични за двата вида от род *Lathraea* са p2, p809, p817, p826, p836 и p891 (Фиг. 1, 3–6, 8), което показва, че посочените маркери не са достатъчно специфични за разграничаване на двете семейства.

Селективни за *O. simana* се оказват маркерите p2, p7, p826 (Фиг. 1, 2 и 5). При p7 прави впечатление, че този вид се групира с *P. mutelii* в първия възел и се отделя от останалите представители на *Orobanchae*. Този факт съответства с разполагането на *O. simana* в sect. *Inflatae*. Наблюдава се слабо генетично вариране

на *O. cumanica* в зависимост от гостоприемника (*Helianthus annuus* или *Artemisia maritima*) при продуктите от p2, p7, p809, p817, p836, p891 (Фиг. 1–4, 6, 8).

Представителите на subsect. *Galeatae* се обединяват само от продуктите на p809 и p826, на ниво първи възел (Фиг. 3, 5). Прави впечатление голямото евклидово разстояние между двете разновидности на *O. caryophyllacea*, в сравнение с изследваните индивиди от *O. lutea* (Фиг. 3, 4, 6, 8). Този факт подкрепя представата за достоверността на *O. caryophyllacea* var. *macrolepis*.

Продуктите на *O. gracilis* се групират по разновидности (Фиг. 6, 7) или без закономерност (Фиг. 1–5, 8), което потвърждава статуса на *O. gracilis* var. *sprunerii* и не позволява повишаването на ранга му. Селективни по отношение на представителите на subsect. *Minores* се явяват маркерите p2, p7, p817, p826 и p891 (Фиг. 1, 2, 4, 5, 8). В пет от случаите представителят на *O. pubescens* се отделя от другите два вида в подсекцията (p2, p7, p891), което съответства и на по-ясните му морфологични белези.

Заклучение

Представеното изследване е част от проучването на сем. *Orobanchaceae* в България. Използваните маркери подкрепят таксономичния статус на *O. caryophyllacea* var. *macrolepis* и *O. gracilis* var. *sprunerii*. Генетичните разлики между индивидите от *O. cumanica* върху културни и диви гостоприемници показват влияние на гостоприемника при този вид. Несъвместимостта на позицията на род *Lathraea* спрямо изследваните образци от *Orobanchaceae* показва, че избраните праймери не са подходящи при разграничаването им.

Изследването илюстрира прецизност на метода на ниво видове, подвидови и надвидови групи.

Благодарности. Изследването е осъществено благодарение на финансовата подкрепа по проекти ИФС – Б-606, ДТК 02/40, BG051PO001-3.3.04/17 (НФНИ към МОМН), NATO grant CLG 983884 и ERA 117.

Литература

- Георгиев, Т. 1937. Ревизия на видовете от род *Orobanche* L., които се срещат в България. – Год. СУ, Agron-лес. фак., 15(1): 41-56.
- Делипавлов, Д. 1995а. Род *Lathraea* L. – В: Кожухаров, С. (ред.), Флора на Република България. Т. 10, 273-276. Изд. БАН “Проф. Марин Дринов”, София.
- Делипавлов, Д. 1995б. Род *Orobanche* L. – В: Кожухаров, С. (ред.), Флора на Република България. Т. 10, 291-325. Изд. БАН “Проф. Марин Дринов”, София.
- Новопокровский, И., Цвелев, Н. 1958. Сем. *Orobanchaceae* Lindl. – В: Шишкин, В. (ред.), Флора СССР. Т. 23, 19-117. Изд. АН СССР, Москва.
- Цвелев, Н. 1981. Сем. *Orobanchaceae* Vent. – В: Федоров, А. (ред.), Флора Европейской части СССР. Т. 5, 317-336. Наука, Ленинград.

- Beck, G. 1890. Monographie der Gattung *Orobanche*. Verlag von Theodor Fischer, Cassel.
- Beck, G. 1930. *Orobanchaceae*. – In: Engler, A. (ed.), Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis Conspectus. IV. Leipzig.
- Bennett, J.R. & Mathews, S. 2006. Phylogeny of the parasitic plant family *Orobanchaceae* inferred from phytochrome A. – Amer. J. Bot., **93**: 1039-1051.
- Benharrat, H., Veronesi, C., Theodet, C. & Thauloarn, P. 2002. *Orobanche* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). – Weed Res., **42**: 470-475.
- Chater, A. & Webb, D. 1972. *Orobanche* L. – In: Tutin, T.G. & al. (eds), Flora Europaea. Vol. 3, pp. 286-293. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Fang, D.Q. & Rose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. – Theor. Appl. Genet. **95**(3): 408-417.
- Foley, M.J.Y. 2001. Genus *Orobanche* L. – In: Castroviejo, S. (ed.), Flora Iberica. Vol. 10, pp. 32-72. Real Jardín Botánico, Madrid.
- Hammer, O., Harper, D. & Ryan, P. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – Palaeontol. Electronica, **4**(1): 1-9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hristova, E., Stoyanov, K., Gevezova, M. & Denev, I. 2011. Application of ISSR methods in studying Broomrape's (*Orobanchaceae*) biodiversity in Bulgaria. – Biotechnology & Biotechnological Equipment, **25**(1): 2248-2253.
- 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.
- Olmstead, R., de Pamphilis, C., Wolfe, A., Young, N., Elisons, W. & Reeves, P. 2001. Disintegration of *Scrophulariaceae*. – Am. J. Bot., **88**(2): 348-361.
- 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.
- Teryokhin, E. 1997. Weed Broomrapes – systematics, ontogenesis, biology, evolution. Aufstieg-Verlag, Landshut.
- Thieret, J. 1971. The genera of *Orobanchaceae* in the south-eastern United States. – J. Arnold Arbor., **52**(1): 404-434.
- Thorogood, C.J., Rumsey, F.J., Harris, S.A. & Hiscock, S.J. 2008. Host-driven divergence in the parasitic plant *Orobanche minor* Sm. (*Orobanchaceae*). – Molec. Ecol., **17**: 4289-4303.
- Thorogood, C.J., Rumsey, F.J. & Hiscock, S.J. 2009. Gene flow between alien and native races of the holoparasitic angiosperm *Orobanche minor* (*Orobanchaceae*). – Ann Bot., **103**: 1005-1014.
- 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.
- Zazvorka, J. 2000. *Orobanchaceae* Vent. – In: Slavik, B. (ed.), Kvetena České Republiky. Vol. 6., pp. 480-489. Akademia, Praha.
- Zhang, Z-Y. & Tzvelev, N. 2004. *Orobanchaceae*. – In: Zhengyi, W. & Raven, P. (eds), Flora of China. Vol. 18, pp. 229-243. Sci. Press, Beijing & Missouri Bot. Gard. Press, St. Louis, Missouri.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. – Genomics, **20**: 176-183.

