

UDK: **582:998.1 (497.113 Srem)**

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

### **GENETIČKI DIVERZITET *Ambrosia sp.* NA PODRUČJU RAVNOG SREMA**

Galović Vladislava, Orlović Saša, Vasić Verica, Poljaković-Pajnik Leopold,  
Drekić Milan, Pap Predrag<sup>1</sup>

**Izvod:** Započeta su istraživanja genetičke karakterizacije *Ambrosia sp.* na području Ravnog Srema korišćenjem molekularnih metoda. Za genetičke analize je korišćen materijal sakupljen iz tri populacije od kojih je svaka predstavljena sa tri genotipa. Korišćeno je 5 SSR markera za lokuse Amb12, Amb15, Amb16, Amb30 i Amb82. Rezultati ukazuju da je moguće koristiti na domaćem materijalu SSR markere dizajnirane za severnoameričke vrste *Ambrosia artemisiifolia* kao i na postojanje visoke divergentnosti populacija Ambrozije na ovim prostorima.

**Ključne reči:** molekularna karakterizacija, mikrosateliti, Ambrozija, Vojvodina

### **GENETIC DIVERSITY OF *Ambrosia sp.* IN THE AREA OF RAVNI SREM**

**Abstract:** Research work in genetic characterization of *Ambrosia sp.* in the area of Ravni Srem, using molecular methods has been initiated. For genetic analysis plant material were collected from three populations, each represented by three genotypes. Five SSR markers for the loci Amb12, Amb15, Amb16, Amb30 and Amb82 were used. Results indicated that it is possible to apply the SSR markers originally designed for North American species of *Ambrosia artemisiifolia* on our material. The existence of high diversity in populations of *Ambrosia sp.* was revealed in the area of Ravni Srem.

**Key words:** molecular characterisation, microsatellites, *Ambrosia*, Vojvodina

---

<sup>1</sup> Dr Vladislava Galović, naučni saradnik; Dr Saša Orlović, naučni savetnik; Mr Predrag Pap, istraživač saradnik; Dr Branislav Kovačević, naučni saradnik; Mr Miroslav Marković, istraživač saradnik; <sup>1</sup>Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Srbija

## 1. UVOD

Ambrozija (*Ambrosia artemisifolia* L.) je najrasprostranjenija vrsta roda *Ambrosia* i autohtona biljna vrsta Severne Amerike. Ova invazivna biljna vrsta je naselila i mnoge evropske zemlje, ali se pojavila i u zemljama dalekog istoka. Stopa povećanja brojnosti vrste roda *Ambrosia sp.* i njihova introdukcija u regione koji nisu nativni za ovu vrstu vodi ka nestajanju autohtonih biljnih vrsta u tim zemljama (Pimentel et al., 2001). Njena izuzetna bioinvazivnost, kao i evolucionari mehanizmi koji su uključeni u taj proces su veoma intrigantni kako za bazična tako i za primenjena istraživanja u smislu iznalaženja mera suzbijanja i sprečavanje širenja ove biljne vrste. *Ambrosia artemisifolia* L. (syn. *A. elatior*) je jednogodišnja zeljasta biljka iz familije *Asteraceae*. U narodu je poznata pod nazivima pelenasta ambrozija, fazanuša, limundžik i pripada grupi korovsko-ruderalnih vrsta koje se brzo i intenzivno šire. Unešena je iz susednih evropskih zemalja na naše prostore (Konstantinović et al., 2004). *Ambrosia sp.* je u Srbiji prvi put zabeležena u Vojvodini 1953. godine (Slavnić, 1953) i za poslednjih 60. godina raširila se po čitavoj teritoriji Srbije. Rasprostranjena je u mnogim zemljama Evrope gde je veoma značajan korov i glavni prouzrokovač alergija kod humane populacije (Gyoffry et al., 1995). U optimalnim uslovima sredine biljke ambrozije izrastaju u visinu i preko 2 m i intenzivno su zelene boje (Vrbničanin et al., 2007). Ima veoma skromne zahteve u pogledu plodnosti i rastresitosti zemljišta tako da veoma dobro uspeva kako na plodnim i rastresitim tako i na siromašnim i zbijenim zemljištima (Bohren et al., 2006). Ambrozija je kasnoprolećna vrsta, optimalna temperatura za njeno klijanje je 20 – 22 °C. Cveta i plodonosi od juna do septembra shodno meteorološkim prilikama u datoj godini (Vrbničanin et al., 2007). Jedna biljka može da proizvede oko 500 do 3000 semena (Janjić i Kojić, 2000). Zahvaljujući svojim biološkim osobinama kao i edafskim i klimatskim uslovima ova vrsta se u našoj zemlji neprekidno širi, njena brojnost, gustina i pokrovnost se neprekidno povećava te se povećava i njeno učešće u korovskoj sinuziji useva i zasada (Veljković, 1996). U našoj zemlji je evidentirana i vrsta *Ambrosia trifida*. *Ambrosia trifida* je jednogodišnja biljka iz familije *Asteraceae*, nativna vrsta širom Severne Amerike. Polinacija kod ove vrste je prevashodno anemofilna ali se polen prenosi i insektima. Polen ove vrste je jedan od glavnih prouzrokovača jesenjih alergija.

Cilj ovoga rada bio je da utvrdimo da li već publikovani SSR markeri za *Ambrosia artemisifolia* L. mogu biti pouzdani za determinaciju našeg biljnog materijala kao i da sagledamo genetičku strukturu i varijabilnost vrste *Ambrosia sp.* na području Ravnog Srema. Važnost ispitivanja varijabilnosti *Ambrosia sp.* u našem regionu je od značaja za kontrolu širenja i eventualne introdukcije novih vrsta ili mutacije već postojećih u našim uslovima.

## 2. MATERIJAL I METODE

Biljni materijal, sveža lisna masa, sakupljena je iz tri populacije *Ambrosia sp.* u Vojvodini: Višnjićevo, Kuzmin i Morović. Svaki populacija je predstavljena sa tri

genotipa (V1, V2, V3; K1, K2, K3; M1, M2, M3). Za ekstrakciju DNK korišćeno je biljno tkivo, sveže mase 100mg, i samleveno u aparatu za homogenizaciju (Retsch MM400), 1min na 30 Hz. Za potrebe istraživanja izolovana je genomski DNK po uputstvu za korisnike Qiagen proizvoda DNeasy Plant Mini Kit sistema (www.qiagen.com).

Koncentracija DNK je determinisana spektrofotometrijskom analizom, a kvalitet i čistoća određena sistemom elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Za genetičku karakterizaciju korišćeno je 5 SSR markera za lokuse: Amb12, Amb15, Amb16, Amb30 i Amb82. Naziv lokusa, poreklo izolata, prajmer sekvenca i pristupni broj u gen banci (National Centre for Biotechnology Information-NCBI) prikazani su u tab. 1.

Pet SSR markera, originalno dizajnirani za *Ambrosia artemisiifolia* poreklom iz Severne Amerike (Genton et al., 2005) je korišćeno za determinaciju genetičkog profila ispitivanih genotipova. Prilikom istraživanja primenjeni su PCR protokoli po Genton et al. (2005). Statistička analiza sprovedena je korišćenjem programa STATISTIKA 7.1 (StatSoft Inc., 2006 ) softverskog paketa. U analizi grupisanja je korišćena matrica Jaccard's distanci pri čemu su konstruisani UPGMA dendrogrami i vizuelno prikazani korišćenjem TreeView programa (Page, 1996). Moć diskriminacije (PD) za pojedine mikrosatelitske DNK lokuse utvrđena je po Klosterman et al. (1993):  $PD = \sum G_i^2$ , gde je  $G_i$  frekvencija  $i$ -tog genotipa na posmatranom lokusu.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

Svi lokusi su uspešno amplifikovani. Na osnovu amplifikacije 5 lokusa, detektovano je ukupno 59 alela tj. u proseku 11,8 alela po lokusu (tab. 1).

Tab. 1 Lokusi mikrosatelitskih markera, pristupni broj u Banci gena, prajmer sekvence, broj detektovanih alela i moć razdvajanja za *Ambrosia sp.*

Tab. 1 *Microsatellites loci, Accession No. in Gen banks, primer sequences, No. of detected alleles and power of discriminations in Ambrisia sp.*

Lokusi	Pristupni broj	Rang alela(bp)	Broj alela	Snagadiskriminacije(PD)
<i>Locus</i>	<i>Accession No.</i>	<i>Allelic range (bp)</i>	<i>No.of alleles</i>	<i>Power of discrimination (PD)</i>
Amb12	AY849308	206-303	10	0.52
Amb15	AY849309	193-303	8	0.62
Amb16	AY849310	221-295	21	0.41
Amb30	AY849311	122'278	8	0.84
Amb82	AY849312	101-193	12	0.56
Ukupno Total:			59 alela <i>allels</i>	
			11,8 alela po lokusu <i>allels per locus</i>	

U tabeli 2 prikazana je detektovana dužina fragmenata po genotipovima. Multi lokusi nisu uzeti u obzir pri statističkoj obradi podataka. Na osnovu podataka o snazi

determinacije (PD) i na osnovu sagledavanja tabele 2 koja pokazuje zastupljenost i raspored dužine fragmenata po populacijama i genotipovima može se zaključiti da su markeri Amb30 i Amb15 pokazali najveću snagu diskriminacije vrednostima 0,84 i 0,62, svaki ponaosob. Najmanje diskriminantan marker bio je Amb16 (PD=0,41) kod koga je alelni polimorfizam bio izrazen (21 alel) ali raspoređen samo u okviru genotipova populacije iz Morovića. Kod populacije iz Morovića zabeležena je najveća a kod populacije iz Višnjićeva najmanja polimorfnost i zastupljenost ispitivanih lokusa.

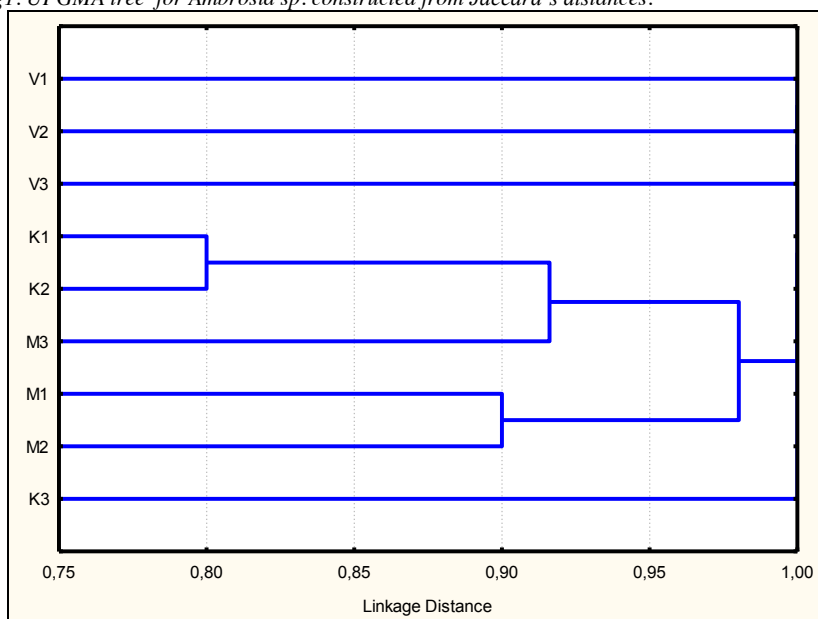
Tab. 2 Detektovana dužina fragmenata za ispitivane genotipove  
Tab. 2 The fragment length detection for the genotypes under observation

Lokusi Loci	Genotipovi Genotypes								
	V1 V1	V2 V2	V3 V3	K1 K1	K2 K2	K3 K3	M1 M1	M2 M2	M3 M3
Amb12	-	-	-	-	-	206,264,303	204,210, 216, 223	205,212, 224	-
Amb15	-	-	-	198	193, 198, 200, 265, 284 303	-	-	-	198
Amb16	-	-	-	-	-	-	221,231,237,243, 251,268,279,286,295	227,264,268, 224,239,250, 279,284,294	269,281,295
Amb30	-	262,271	263	278	198	-	129	122,129	134
Amb82	-	-	-	-	-	124	123,135,139, 151, 193	112,125,136	101,112

Rezultati su pokazali visoku genetičku sličnost između genotipova K1 i K2 (0,8), iz populacije Kuzmina kao i genotipova M1 i M2 (0,9) iz populacije Morovića. Genotip M3 pokazuje sličnost sa genotipovima K1 i K2 što ukazuje na sličnost populacija Morovića i Kuzmina. Može se zaključiti da postoji značajna genetička sličnost između populacija Morovića i Kuzmina dok je populacija Višnjićeva genetički udaljena.

Iz ispitivane grupe genotipova izdvajaju se sva tri genotipa iz populacije Višnjićeva i K3 genotip iz populacije Kuzmina koji ni međusobno ali ni sa ostalim genotipovima nemaju zajedničkih alela (Jaccard-ova distanca je 1). Ovaj podatak ide u prilog pretpostavci na moguće postojanje druge vrste roda *Ambrosija sp.* u populaciji Višnjićeva i Kuzmina. Poslednje je moguće objašnjenje s obzirom da su se, kod ovih populacija, od ukupno pet lokusa amplifikovala četiri ali od mogućih 30 detektovane su amplifikacije samo kod 9 genotipova u odnosu na 12 kod populacije Morovića. Ne postojanje sličnosti između svih genotipova unutar populacije Višnjićeva kao i izdvajanje genotipa K3 iz populacije Kuzmina ukazivalo bi na promene u genetičkoj strukturi kao posledica mutacija ili genetičkog drifta usled smanjenja adaptivnog potencijala što je karakteristično za invazivne vrste, a naročito se odnosi na male populacije i slaže se sa istraživanjima Dlugosch i Marker, (2008).

Graf.1 UPGMA stablo za *Ambrosia sp.* konstruisano korišćenjem Jaccard-ovih distanci  
Fig1. UPGMA tree for *Ambrosia sp.* constructed from Jaccard's distances.



Iz navedenih podataka možemo potvrditi da su SSR markeri bili pouzdano sredstvo u određivanju genetičke varijabilnosti vrste *Ambrosia sp.* na posmatranim lokalitetima Ravnog Srema. Utvrđeno je da se markeri, originalno dizajnirani za severno-američku vrstu *Ambrosia artemisifolia*, mogu uspešno primeniti na materijal našeg podneblja.

## LITERATURA

- Bohren C., Mermillod G., Delabays N. (2006): Common ragweed (*Ambrosia artemisifolia* L.) in Swyterland: development of a nationwide concerted action, *Journal of Plant Diseases and Protection*, XX 497 – 503
- Dlugosch K. M., and Marker I. M., (2008): Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17:431-449.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783–791.

- Genton B. J., Jonot O., Thevenet D., Fournier E., Blatrix R., Vautrin D., Solignac M., Giraud T. (2005): Isolation of five polymorphic microsatellite loci in the invasive weed *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae) using an enrichment protocol. *Molecular Ecology Notes*, 5: 381-383.
- Gyoffry, B., Hunyadi, K., Kadar, A., Molnar, J., Toth, A. (1995): Hungarian national weed surveys 1950-1992, 9<sup>th</sup> EWRS Symposium, Budapest, 1-11
- Janjić, V., Kojić, M. (2000): Atlas korova, Istitut za istraživanja u poljoprivredi Srbije, Beograd
- Kloosterman AD, Budowle B, Daselaar P (1993). PCR amplification and detection of human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *Int. J. Leg. Med.* 105: 257–264.
- Konstantinović, B., Meseldžija, M., Konstantinović, Bo. (2004): *Ambrosia artemisiifolia* L. spreading in urban environments and possibilities of control, *Acta herbologica*, 13, 2, 449-453
- Slavnić, Ž. (1953): Prilog flori našeg Podunavlja, *Glasnik biološke sekcije, Serija II/BT*, Zagreb, 4-6
- Pimentel D., Mc Nair S., Janecka J., (2001): Economic and environmental threats of alien plant, animal and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 84:1-20
- Page RDM (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357–358.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Rančić, D. (2007): Biologija ambrozije. u: Janjić V., Vrbničanin S. (ur.) *Ambrozija*, Beograd: Herbološko društvo Srbije, 29-45
- Veljković, B. (1996): Rasprostranjenost novounešenih korovskih vrsta *Ambrosia artemisiifolia* L. i *Iva xantifolia* Nutt. u Jugoslaviji, V Kongres o korovima, Banja Koviljača, Zbornik radova, 351 – 363

*Summary*

**GENETIC DIVERSITY OF *Ambrosia* sp. IN THE AREA OF RAVNI SREM**

*by*

Galović Vladislava, Orlović Saša, Vasić Verica, Poljaković-Pajnik Leopold, Drekić Milan, Pap Predrag

Ragweed (*Ambrosia artemisifolia* L.) is the most widespread plant of genus *Ambrosia* and native plant species in North America. This invasive plant species is present in many European and Far East countries and also appeared in Serbia. In Serbia ragweed was first recorded in Vojvodina 1953. and for the last 60 years spreaded across the whole territory of Serbia. It is widespread in many European countries where it become very problematic weed and important source of allergies in the human population. This extraordinary invasive species and its evolutionary mechanisms involved are very intriguing for both basic and applied research in this area in order to improve control measures and prevent the spread of this plant species.

The aim of this study was to determine whether already published SSR markers for *Ambrosia artemisifolia* L. can be reliable tools for the determination and analysis of genetic structure and variability of *Ambrosia* sp. in the area of Ravni Srem.

Research work in genetic characterization of *Ambrosia* sp. in the Vojvodina region using molecular methods have been initiated. For genetic analysis plant material were collected from three locations, each represented by three genotypes. Five SSR markers for the loci Amb12, Amb15, Amb16, Amb30 and Amb82 were used.

Results indicated that it is possible to apply on our material the SSR markers originally designed for North American species of *Ambrosia artemisifolia*. The existence of high diversity in populations of *Ambrosia* sp. in the area of Ravni Srem was revealed.