

## **DNA marker tightly linked to the double flower locus in *Rosa* × *damascena* Mill. f. *trigintipetala* suitable for marker assisted breeding**

Rusanov K, Rusanova M, Kovacheva N, Atanassov I.

### **Резюме**

В настоящото изследване се докладва разработването на ДНК маркер, тясно свързан с фенотипа за кичест цвят (DF) при *R. × damascena*, подходящ за провеждане на маркерно асистирана селекция. Разработването на този маркер се основава на предходно идентифициране на геномна област, свързана с фенотипа DF при *R. × damascena* и скорошни изследвания, демонстриращи участието на гена AP2/TOE във формирането на DF при няколко вида от семейство *Rosaceae*. Ние идентифицирахме полиморфна област, наречена RdDF намираща се преди гена AP2/TOE при *R. × damascena* и използвахме данните за последователността за дизайн на PCR праймери. Анализът на сегрегирането на четирите алела на RdDF в популация от 104 растения, получени след самоопрашване на *R. × damascena*, показва, че един от алелите (RdDF-B, 203 бд) е тясно свързан с фенотипа DF. Анализът на сегрегирането на два SSR маркера, разположени на разстояние приблизително 1578 кб и 1129 кб от двете страни на RdDF, показва, че отдалечаването от разработения RdDF маркер води до наблюдаване появата на рекомбинантни растения с прости цветове, подкрепяйки по този начин асоциирането на RdDF с фенотипа DF. Обсъжда се приложението на разработения RdDF маркер за маркерно асистирана селекция (MAS) и селекционни програми, включващи *R. × damascena*, както и по-нататъшно изследване на молекулната основа на образуването на DF при този вид.

### **Abstract**

The present study reports the development of a DNA marker tightly linked to the double flower (DF) phenotype in *R. × damascena*, suitable for marker assisted breeding. The development of this marker is based on previous identification of genome region associated with the DF phenotype in *R. × damascena* and recent studies demonstrating involvement of the AP2/TOE gene in the formation of DF in several species from the Rosaceae family. We identified a polymorphic region named RdDF upstream of the AP2/TOE gene in *R. × damascena* and used the sequence data for designing PCR primers. Segregation analysis of the four alleles of RdDF in a population of 104 plants obtained after self-pollination of *R. × damascena* showed that one of the alleles (RdDF-B, 203 bp) is tightly linked to the DF phenotype. Analysis of the segregation of two SSR markers located at a distance of approximately 1578 kb and 1129 kb on both sides of RdDF, showed that walking away from the developed RdDF marker results in the observation of simple flower recombinant plants, supporting association of RdDF with the DF phenotype. The application of the developed RdDF marker for marker assisted selection (MAS) and breeding programmes involving *R. × damascena*, as well as further study of the molecular base of DF formation in this species are discussed.

## **Genetic diversity assessment of *Calendula officinalis* wilding plants locally grown in Bulgaria, using SRAP markers**

Zagorcheva T, Rusanova M, Rusanov K, Atanassov I.

### **Резюме**

Невенът (*Calendula officinalis* L.) е добре познато градинско растение, отглеждано и за медицински цели. У нас *C. officinalis* се отглежда като едногодишно растение, което често се самозасява и по този начин напуска пределите на градините. Настоящото изследване описва оценка на генетичното разнообразие на диворастящи растения *C. officinalis*, произхождащи от района на Розовата долина, България, с помощта на SRAP (sequence-related amplified polymorphism) маркери. Анализът на данните с помощта на софтуера Structure не показва съществуването на ясна генетична структура в рамките на набора от анализирани диви растения. Извършен беше допълнителен сравнителен SRAP анализ на малки групи растения *C. officinalis*, произхождащи от семена на диви растения и семена, получени от различни европейски доставчици на семена. Получените резултатите говорят за това, че генетичното разнообразие при анализирани диви растения до голяма степен наподобява нивото на генетично разнообразие на групите от растителния, получени от наличните в търговската мрежа семена на *C. officinalis*. Обсъжда се възможността за използване на диворастящи растения от *C. officinalis* за селекция на линии и сортове, добре адаптирани към местните условия и подходящи за органично отглеждане и производство на биоактивни екстракти и съединения.

### **Abstract**

The pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is a well-known garden plant cultivated also for medicinal purposes. In Bulgaria, *C. officinalis* is an annual plant, often self-seeding and generating garden escapees. The present study describes assessment of the genetic diversity of wilding *C. officinalis* plants originating from the region of the Rose Valley, Bulgaria, using SRAP (sequence-related amplified polymorphism) markers. Analysis of the data using the Structure software did not support the existence of a clear genetic structure within this set of analyzed wilding plants. Further comparative SRAP analysis of small sets of *C. officinalis* plants originating from seeds of wilding plants and seeds derived from various European seed suppliers was carried out. The results suggest that the genetic diversity of the tested wilding plants largely resembles the range of genetic diversity of the plant sets derived from commercially available *C. officinalis* seeds. The possibility of using wilding *C. officinalis* plants for selection of breeding lines and varieties, well adapted to the local conditions and suitable for organic growing and production of bioactive extracts and compounds is discussed

## **Genetic and flower volatile diversity in natural populations of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) letsw. in Bulgaria: toward the development of a core collection**

Alekseeva M, Zagorcheva T, Rusanova M, Rusanov K, Atanassov I.

### **Резюме**

Изследвахме генетичното разнообразие и разнообразието от летливи съединения в цветовете на растения от естествените популации на *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) letsw. в България с помощта на маркери за прости повторени последователности (SSR) и свързани с последователността амплифицирани полиморфизми (SRAP) и анализ с газова хроматография/маспектрометрия (GC/MS) на летливи съединения в цветовете от отделни растения. В това изследване са включени два района характерни за вида - Кресненското дефиле и Източните Родопи, включващи осем популации и 239 индивидуални растения. Анализ с 11 SSR маркера и осем SRAP праймерни комбинации показва, че SRAP маркерите са значително по-информативни от SSR маркерите като в допълнение бяха използвани за анализ на генетичното разнообразие. Резултатите показаха ниско до средно ниво на генетична диференциация между популациите със стойности на индекса на фиксация ( $F_{st}$ ), вариращи между 0,0047 и 0,11. Идентифицирани бяха общо 10 генетични групи. В резултат на анализът на разнообразието от летливи съединения в цветовете бяха идентифицирани общо 63 съединения, като по-голямата част от растенията принадлежаха към карвакроловия хемотип и само едно растение към тимоловия хемотип. Наблюдавани бяха големи вариации при отделните съединения във всеки регион, както и в популациите. Йерархичното клъстериране показва ясно групиране въз основа на двата различни региона. В допълнение, в резултат на задълбочен анализ бяха идентифицирани шест основни и 23 минорни метаболитни клъстера. Цялостният набор от данни и клъстерният анализ бяха използвани допълнително за разработването и тестването на проста и ясна стратегия за подбор на отделни растения за създаване на базова (кор) колекция, представляваща използваните в изследването естествени популации на този вид в България. Предложената стратегия включва прецизно генетично групиране на тестваните растения, последвано от избор на минимален набор от всеки генетичен клъстер, представляващ различните метаболитни клъстери. Избраният базов (кор) набор бе допълнително сравнен с базовия (кор) набор, извлечен от софтуера PowerCore. Сравнението на генетичната и метаболитната принадлежност на членовете на двата набора показва, че докладваният подход е избрал представители от всеки генетичен клъстер и минорен метаболитен клъстер, докато някои метаболитни клъстери не са били представени в набора избран от PowerCore. Обсъждат се осъществимостта и ефективността на прилагане на посочената стратегия за разработване на базова (кор) колекция представляваща, както генетичното, така и метаболитното разнообразие в естествените популации на ароматни и лечебни растения в посока следващи стъпки включващи отбор и селекция.

### **Abstract**

We studied the genetic and flower volatile diversity in natural populations of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) letsw. in Bulgaria using simple sequence repeat (SSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of flower volatiles from individual plants. Two regions, including the Kresna Gorge and Eastern Rhodopes, typical for the species comprising eight populations and 239 individual plants were included in this study. An analysis

with 11 SSR markers and eight SRAP primer combinations showed that SRAP markers were substantially more informative than the SSR markers and were further used for genetic diversity analysis. The results showed low-range to mid-range genetic differentiation between the populations with pairwise fixation index ( $F_{st}$ ) values ranging between 0.0047 and 0.11. A total of 10 genetic clusters were identified. An analysis of the flower volatile diversity identified a total of 63 compounds with the vast majority of plants belonging to the carvacrol chemotype and just a single plant to the thymol chemotype. Large deviations were observed for individual compounds within each region as well as within the populations. Hierarchical clustering showed a clear sample grouping based on the two different regions. In addition, an in-depth analysis identified six major and 23 minor metabolite clusters. The overall data set and cluster analysis were further used for the development and testing of a simple and straightforward strategy for the selection of individual plants for the development of a core collection representing the sampled natural populations for this species in Bulgaria. The proposed strategy involves precise genetic clustering of the tested plants followed by the selection of a minimal set from each genetic cluster representing the different metabolite clusters. The selected core set was further compared with a core set extracted by the PowerCore software. A comparison of the genetic and metabolic affiliation of the members of both sets showed that the reported approach selected representatives from each genetic cluster and minor metabolic cluster, whereas some metabolic clusters were unrepresented in the PowerCore set. The feasibility and efficiency of applying the pointed strategy for the development of a core collection representing both the genetic and metabolite diversity of natural populations in aromatic and medicinal plants toward subsequent steps of selection and breeding are discussed

## Exploring the capacity of endophytic fungi isolated from medicinal plants for fermentation and phenolics biotransformation of rose oil distillation wastewater

Rusanova M, Rusanov K, Butterweck V, Atanassov I.

### Резюме

Общо 139 изолата на ендофитни гъби, изолирани от 20 лечебни и ароматни растения, бяха тествани за способността им да ферментират отпадъчни води от дестилация на розово масло (RODW). Филогенетичен анализ, основан на вътрешната транскрибирана спейсърна последователност, свързва събраните изолати със седем рода и девет различни вида, от които *Alternaria alternata* бе най-широко представен. Ферментацията на RODW от гъби бе оценена чрез анализ на съдържанието на захар и фенолни съединения, както и фенолния състав. След култивиране в малък обем RODW, извършеният клъстерен анализ групира изолатите в четири отделни клъстера според способността им да ферментират захари и феноли от RODW. По-нататъшното култивиране чрез разклащане в колба с по-голям обем на избрана подгрупа от гъби с подчертан ферментационен капацитет спрямо RODW очерта три групи изолати с различен модел и динамика на ферментация на захари и феноли. Анализ с високоефективна течна хроматография на фенолни екстракти от RODW след ферментация от избраните гъбни изолати показва два основни типа промени в състава на фенолите: (1) промени в относителното количество на част от фенолните съединения на RODW, главно поради асимилиране на захарните остатъци от фенолни гликозиди в RODW и (2) биосинтеза на нови фенолни съединения, повечето от които са специфични за ендофитните гъбни изолати, използвани за ферментация на RODW. Общите резултати от проучването демонстрират ясно, че ендофитните гъбни изолати представляват богат и неизползван източник за ефективна ферментация на RODW и други богати на фенолни съединения агропромишлени отпадни води и подчертават техния капацитет за насочени промени и модифициране на фенолния състав на RODW в посока към по-нататъшно оползотворяване на фенолните съединения на отпадните води.

### Abstract

A total of 139 endophytic fungal isolates derived from 20 medicinal and aromatic plants were tested for their capacity to ferment rose oil distillation wastewater (RODW). Internal transcribed spacer sequence-based phylogenetic analysis affiliated the collected isolates to seven genera and nine different species, of which *Alternaria alternata* was the most widely represented. The fungal fermentation of RODW was evaluated through analysis of the sugar and phenolics content and phenolics composition. After cultivation in a small volume of RODW, the performed cluster analysis grouped the isolates in four distinct clusters according to their capacity to ferment RODW sugars and phenolics. Further larger volume shake-flask cultivation of a selected subset of fungi with a pronounced RODW fermentation capacity, outlined three groups of isolates with a distinct pattern and dynamics of sugars and phenolics fermentation. High-performance liquid chromatography analysis of RODW phenolics extracts following the fermentation by the selected fungal isolates showed two main types of changes in phenolics composition: (1) changes in the relative abundance of part of the RODW phenolic compounds, mainly due to utilization of sugar residues from the RODW phenolic glycosides and (2) biosynthesis of new phenolic compounds, most of which are specific to the endophytic fungal isolates used for RODW fermentation. The overall results of the study clearly demonstrate that endophytic fungal isolates represent a rich and untapped source for efficient fermentation of RODW and other agro-industrial phenolics-rich wastewaters and highlight their

capacity for directional changes and modification of RODW phenolics composition towards further wastewater phenolics valorization.

## **SRAP markers for genetic diversity assessment of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) varieties and breeding lines**

Zagorcheva T, Stanev S, Rusanov K, Atanassov I.

### **Резюме**

Лавандулата (*Lavandula angustifolia* Mill.) е етерично-маслено и лечебно растение с голямо икономическо и социално значение за България, която днес е най-големият производител на лавандулово масло в света. В момента в промишленото отглеждане на лавандула в България се използват до седем сорта, създадени през миналия век. Въпреки нарастващото промишлено отглеждане на лавандула, молекулните маркери са били слабо използвани за характеризиране на генетичните ресурси и отглеждането на лавандула. Настоящото изследване използва свързани с последователността амплифицирани полиморфизми (SRAP) за характеризиране на генетичните ресурси и генетичното разнообразие в рамките на и между две групи от десет български и пет чуждестранни сорта лавандула и селекционни линии. Данните, генерирани след анализ с 51 SRAP праймерни двойки, показва амплификация на голям брой (4697) и отношение (77,2%) на полиморфни SRAP фрагменти, което бе свързано с относително висока стойност на информационното съдържание на полиморфизма, със средно  $0,27 \pm 0,03$  за използваните двойки праймери. Анализът на молекулната вариация на данните от SRAP, допълнително показва високо ниво на генетично разнообразие (96,6% от общото вариране) в рамките на анализирани групи от български и чужди сортове и сравнително ниско разнообразие (3,4% от общото вариране) между двете групи. Обсъждат се възможностите за по-нататъшно приложение на SRAP маркерите в селекцията и отглеждането на лавандула.

### **Abstract**

Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) is an essential oil-bearing and medicinal plant of great economic and social importance to Bulgaria, which is the world largest producer of lavender oil nowadays. Currently, the industrial cultivation of lavender in Bulgaria employs up to seven varieties established during the last century. Despite the growing industrial lavender cultivation, few molecular markers have been applied for characterization of lavender genetic resources and breeding. The present study employed sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers to characterize the genetic resources and genetic diversity within and between two groups of ten Bulgarian and five foreign lavender varieties and breeding lines. The data generated following analysis with 51 SRAP primer pairs showed amplification of a high number (4697) and ratio (77.2%) of polymorphic SRAP fragments resulting in relatively high value of the polymorphism information content, with an average of  $0.27 \pm 0.03$  for the used primer pairs. Analysis of molecular variance of the SRAP data further revealed high level of genetic diversity (96.6% of the total variations) within the analyzed groups of Bulgarian and foreign varieties and rather low diversity (3.4% of total variations) between the two groups. The possibilities for further applications of SRAP markers in lavender breeding and cultivation are discussed.

## Genetic and flower volatile diversity in two natural populations of *Hyssopus officinalis* L. in Bulgaria

Zagorcheva T, Rusanov K, Rusanova M, Aneva I, Stancheva I, Atanassov I.

### Резюме

Анализирано бе генетичното разнообразие и разнообразието от летливи съединения в цветовете на 59 растения от две естествени популации на *Hyssopus officinalis* L., разположени на разстояние 73 km една от друга в типични за този вид райони на отглеждане в България. Анализът с 10 комбинации от праймери за свързани с последователността амплифицирани полиморфизми (SRAP) показва общо 1045 пика, от които 88,7% бяха полиморфни. Анализът на главните координати (PCoA) и клъстериране с използване на груповия метод на непретеглената двойка със средно аритметично (UPGMA) показаха ясно групиране на пробите, въз основа на техния произход от популации. Въпреки това, анализът на генетичната диференциация показва, че двете популации (Годеч и Извор) са генетично сходни, което се вижда от ниските стойности на  $F_{st}$  и  $G_{st}$ , както и от ниската стойност за генетична дистанция по  $N_{ei}$  и високия генен поток ( $N_m$ ). Анализ с газова хроматография-маспектрометрия (GC-MS) на екстракти от цветовете на същите отделни растения, които бяха използвани в анализа на генетично разнообразие, доведе до идентифицирането на общо 32 съединения. Анализът на главните компоненти (PCA), базиран на съдържанието на съединенията, показва наличие на два основни клъстера от проби, които не съответстват на техния произход по популации. Задълбоченият анализ на съдържанието на съединенията показва голямо вариране между двата идентифицирани клъстера, включително пълно присъствие/отсъствие на основни съединения и съществуването на два различни хемотипа, съответстващи на идентифицираните клъстери. Нашите резултати показват, че бъдещите усилия за създаване на колекции от генетични ресурси, както и преходът към полско отглеждане на този вид в България трябва да вземат предвид наличието на двата идентифицирани хемотипа в естествените популации и факторите (както генетични, така и епигенетични), които определят тяхното съществуване.

### Abstract

The genetic and flower volatile diversity of 59 plants from two natural populations of *Hyssopus officinalis* L. situated 73 km away from each other in typical growing regions for this species in Bulgaria were analysed. Analysis with 10 sequence related amplified polymorphism (SRAP) primer combinations scored a total of 1045 peaks of which 88.7% were polymorphic. Principal Coordinate Analysis (PCoA) and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering revealed clear grouping of samples based on their population origin. However, analysis of the genetic differentiation revealed that the two populations (Godech and Izvor) are genetically similar as shown by the low  $F_{st}$  and  $G_{st}$  values as well as by the low  $N_{ei}$ 's genetic distance and high gene flow ( $N_m$ ). Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis of flower extracts from the same individual plants that were used in the genetic diversity analysis identified 32 compounds. Principal Component Analysis (PCA) based on compound abundances revealed two major clusters of samples which did not correspond to their population origin. In depth analysis of the compound abundances showed large variation between the two identified clusters including complete presence/absence of major compounds and the existence of two distinct chemotypes corresponding to the identified clusters. Our results indicate that future efforts towards development of genetic resource collections as well as transition towards field cultivation of this species in Bulgaria should take into account the presence of the two identified chemotypes in natural populations and the factors (both genetic and epigenetic) which determine their existence

## **Plant organic farming research—current status and opportunities for future development**

Tsvetkov I, Atanassov A, Vlahova M, Carlier L, Christov N, Lefort F, Rusanov K, Badjakov I, Dincheva I, Tchamitchian M, Rakleova G, Georgieva L, Tamm L, Iantcheva A, Herforth-Rahmé J, Paplomatas E, Atanassov I.

### ***Резюме***

Тази статия представя обзор на най-новото в развитието на научните, законодателни, икономически и екологични аспекти на органичното земеделие. Влиянието на органичното земеделие върху биоразнообразието и почвеното плодородие се обсъжда в сравнение с конвенционалните системи. Значително препятствие за широкото приложение и бъдещо развитие на биологичното земеделие представлява съществуващото разнообразие от национални и международни инструменти на политиката в този сектор. Специално внимание е отделено на съвременните изследователски техники, които биха могли да помогнат за решаването на редица проблеми, обикновено срещани в органичното земеделие. Твърди се, че органичното земеделие все още не е достатъчно продуктивно, за да се счита за напълно устойчиво. Това подчертава необходимостта от силна подкрепа за по-ефективно прилагане на научноизследователски иновации и подобряване на работата в мрежа между всички заинтересовани страни – биологични производители, учени и съответни политици на национално и международно ниво.

### ***Abstract***

This paper reviews the recent development of the scientific, legislative, economic and environmental aspects of plant organic farming. The impact of organic farming on biodiversity and soil fertility is discussed in comparison with conventional systems. A significant barrier for wide application and future development of organic farming is the existing diversity of national and international policy instruments in this sector. Special attention is paid to up-to-date research techniques that could help solve a number of the problems typically faced in plant organic farming. It is argued that organic farming is still not productive enough to be considered fully sustainable. This underlines the necessity of strong support for more effective implementation of scientific research innovations and improvement of the networking between all stakeholders—organic producers, scientists and corresponding policy makers at the national and international level.

## Genetic control of flower petal number in *Rosa x damascena* Mill f. *trigintipetala*

Rusanov K, Kovacheva N, Rusanova M, Linde M, Debener T, Atanassov I

### Резюме

Изследвахме признака за брой на венчелистчетата в популация, получена след самоопрашване на *R. x damascena* f. *trigintipetala* посредством анализ на молекулни маркери, които преди това са били картирани в близост до основния доминантен локус Blfo/d6, определящ този признак при други видове рози, включително *R. multiflora* и *R. hybrida*. Резултатите показаха, че един и същи генетичен механизъм, който определя признака за брой на венчелистчетата в *R. multiflora* и *R. hybrida*, също контролира признака и при *R. x damascena* f. *trigintipetala* и е свързан с доминантния ефект на алел с едно копие в тетраплоидния геном на този вид. Ние също така анализирахме експресията на няколко цветни хомеотични гена, включително *R. x damascena* APETALA1/FUL-like (палео AP1 тип), *R. x damascena* euAPETALA 3 (euAP3 линия) и *R. x damascena* AGAMOUS в цветни пъпки на ранен етап, съответстващи на растения с кичести и прости цветове. Получените резултати показаха, че само *R. x damascena* AGAMOUS се експресира в различна степен между пробите от кичести и прости цветове, като относителната му експресия е с 3,5 пъти повишена регулация в прости цветове. В допълнение клонирахме и секвенирахме четирите геномни клона на *R. x damascena* AGAMOUS и проучихме потенциалния адитивен ефект на този ген чрез анализиране на сегрегацията на четирите му алела в популацията на самоопрашена *R. x damascena*. Анализът на дисперсията на данните за броя на венчелистчетата и сегрегацията на алелите не показва статистически значим ефект на която и да е алелна конфигурация на гена AGAMOUS върху признака за броя на венчелистчетата при *R. x damascena* f. *trigintipetala*.

### Abstract

We studied the petal number trait in a population obtained after self-pollination of *R. x damascena* f. *trigintipetala* following analysis of molecular markers which have previously been mapped near the major dominant locus Blfo/d6 determining this trait in other rose species including *R. multiflora* and *R. hybrida*. The results showed that the same genetic mechanism, which determines the petal number trait in *R. multiflora* and *R. hybrida* also controls the trait in *R. x damascena* f. *trigintipetala* and is related to the dominant effect of a single copy allele in the tetraploid genome of this species. We also analyzed the expression of several flower homeotic genes including *R. x damascena* APETALA1/FUL-like (paleo AP1 type), *R. x damascena* euAPETALA 3 (euAP3 line) and *R. x damascena* AGAMOUS in early stage flower buds corresponding to plants with double and simple flowers. The obtained results showed that only *R. x damascena* AGAMOUS was differentially expressed between the samples of double and simple flowers, its relative expression being upregulated 3.5-fold in simple flowers. We further cloned and sequenced the four genomic clones of *R. x damascena* AGAMOUS and studied the potential additive effect of this gene by analysing the segregation of its four alleles in the population of self-pollinated *R. x damascena*. Analysis of variance of the data for petal number and allele segregation did not show a statistically significant effect of any allele configuration of the AGAMOUS gene on the petal number trait in *R. x damascena* f. *trigintipetala*.

## **Genetic diversity and morphological characterisation of three turbot (*Scophthalmus maximus* L., 1758) populations along the Bulgarian Black Sea coast**

Ivanova P, Dzhebekova N, Atanassov I, Rusanov K, Raykov V, Zlateva I, Yankova M, Raev Y, Nikolov G

### **Резюме**

Калканът (*Scophthalmus maximus* L., 1758) е ценен промишлен вид риба, класифициран като застрашен. Опазването и устойчивостта на популациите на калкана изисква познаване на генетичната структура на популацията и постоянен мониторинг на нейното биоразнообразие. Настоящото изследване е проведено за оценка на популационната структура на калкана по българското черноморско крайбрежие с помощта на седем двойки микросателитни, два митохондриални ДНК (COIII и CR) и 23 морфологични (15 морфометрични и 8 меристични) маркера. Общо 72 екземпляра от три местообитания бяха генотипирани и бяха идентифицирани 59 алела. Наблюдаваният брой алели на микросателитите бе повече от ефективния брой алели. Общите средни стойности на наблюдаваната ( $H_o$ ) и очакваната хетерогенност ( $H_e$ ) бяха 0,638 и 0,685. Наблюдава се висока скорост на миграция между популациите на калкана (обща средна стойност на  $N_m = 17,484$ ), с максимална стойност (19,498) между местообитанията Шабла и Несебър. Този резултат съответства на ниското ниво на генетична диференциация между тези популации (обща средна стойност на  $F_{st} = 0,014$ ), но не бе отчетена корелация между генетичната и географска дистанция. Наблюдавано бе и високо ниво на генетично разнообразие в популациите. Средната стойност на индекса Garza-Williamson  $M$  за всички популации бе ниска (0,359), което предполага намаляване на генетичната вариация поради ефект на основателя или генетично затруднение. Що се отнася до митохондриалната ДНК, бяха идентифицирани общ брой от 17 хаплотипа за COIII и 41 хаплотипа за CR. Контролният регион на митохондриалната ДНК показва модели с високо хаплотипно разнообразие и много ниско нуклеотидно разнообразие, което показва значителен брой тясно свързани хаплотипове и предполага, че тази популация може да е претърпяла скорошно разширяване.  $D$  тестът на Tajima и  $F_S$  тестът на Fu предполагат скорошен ръст на популацията. Сравнение на стойностите на  $F_{st}$  по двойки показва много ниски стойности. Наблюдаваното смесване на популациите и липса на генетично структуриране сочат, че анализираниите популации вероятно принадлежат към една и съща генетична единица. Следователно, правилното разбиране и задълбочено познаване на нивото и разпределението на генетичното разнообразие при калкана е важна предпоставка за успешно устойчиво развитие и разработване на консервационни стратегии, с цел запазване на еволюционния потенциал.

### **Abstract**

Turbot (*Scophthalmus maximus* L., 1758) is a valuable commercial fish species classified as endangered. The conservation and sustainability of the turbot populations require knowledge of the population's genetic structure and constant monitoring of its biodiversity. The present study was performed to evaluate the population structure of turbot along the Bulgarian Black Sea coast using seven pairs of microsatellites, two mitochondrial DNA (COIII and CR) and 23 morphological (15 morphometric and 8 meristic) markers. A total of 72 specimens at three locations were genotyped and 59 alleles were identified. The observed number of alleles of microsatellites was more than the effective number of alleles. The overall mean values of observed ( $H_o$ ) and expected heterogeneity ( $H_e$ ) were 0.638 and 0.685. A high rate of migration between turbot populations (overall mean of  $N_m = 17.484$ ), with the maximum value (19.498) between Shabla and Nesebar locations, was observed. This result corresponded to the low level of genetic differentiation

amongst these populations (overall mean  $F_{st} = 0.014$ ), but there was no correlation between genetic and geographical distance. A high level of genetic diversity in the populations was also observed. The average Garza-Williamson  $M$  index value for all populations was low (0.359), suggesting a reduction in genetic variation due to a founder effect or a genetic bottleneck. Concerning mitochondrial DNA, a total number of 17 haplotypes for COIII and 41 haplotypes for CR were identified. The mitochondrial DNA control region showed patterns with high haplotype diversity and very low nucleotide diversity, indicating a significant number of closely-related haplotypes and suggesting that this population may have undergone a recent expansion. Tajima's  $D$  test and Fu's  $F_S$  test suggested recent population growth. Pairwise  $F_{st}$  values were very low. The admixture and lack of genetic structuring found pointed to the populations analysed probably belonging to the same genetic unit. Therefore, a proper understanding and a sound knowledge of the level and distribution of genetic diversity in turbot is an important prerequisite for successful sustainable development and conservation strategies to preserve their evolutionary potential.

## **Microwave plasma torch generated in argon for small berries surface treatment**

Bogdanov T, Tsonev I, Marinova P, Benova E, Rusanov K, Rusanova M, Atanassov I, Kozáková Z, Krčma F.

### ***Резюме***

Търсенето на качество на храните и продължителна свежест без използването на вредни химикали се превърна в основна тема през последното десетилетие. Новите технологии използват UV светлина, силно електрическо поле, озон и други реактивни агенти за обеззаразяване на хранителни повърхности. Нискотемпературната неравновесна (студена) плазма работеща при атмосферно налягане съчетава ефективно всички качества, споменати по-горе и по този начин, благодарение на тяхното синергично въздействие, могат да се получат обещаващи резултати при обеззаразяване на повърхността на плодовете. Настоящата публикация се фокусира върху приложимостта на наскоро разработената плазмена горелка с микровълнова повърхностна вълна за третиране на избрани малки плодове. Оптична емисионна спектроскопия бе използвана за определяне на плазмени активни частици (радикали, UV светлина) и параметри на плазмата по време на обработката на плодовете. Изображенията от инфрачервена камера потвърждават ниското и напълно приложимо нагряване на третираната повърхност, което гарантира липса на промени в качеството на плодовете. Подробното проучване показва, че ефективността на микробното обеззаразяване на избрани плодове, естествено замърсени с микроорганизми е силно зависима от формата на повърхността на плода. Обеззаразяването на грапавата повърхност на ягодите изглежда неефективно при настоящата конфигурация, но за гладките плодове бяха получени обещаващи резултати. И накрая, измерванията на антиоксидантната активност не показват промени, дължащи се на плазмено третиране. Резултатите потвърждават, че продължителният разряд на MW повърхностна вълна е приложим за обеззаразяване на повърхността на плодовете.

### ***Abstract***

Demand for food quality and extended freshness without the use of harmful chemicals has become a major topic over the last decade. New technologies are using UV light, strong electric field, ozone and other reactive agents to decontaminate food surfaces. The low-power non-equilibrium (cold) atmospheric pressure operating plasmas effectively combines all the qualities mentioned above and thus, due to their synergetic influence, promising results in fruit surface decontamination can be obtained. The present paper focuses on the applicability of the recently developed microwave surface wave sustained plasma torch for the treatment of selected small fruit. Optical emission spectroscopy is used for the determination of plasma active particles (radicals, UV light) and plasma parameters during the fruit treatment. The infrared camera images confirm low and fully applicable heating of the treated surface that ensures no fruit quality changes. The detailed study shows that the efficiency of the microbial decontamination of selected fruits naturally contaminated by microorganisms is strongly dependent on the fruit surface shape. The decontamination of the rough strawberry surface seems inefficient using the current configuration, but for smooth berries promising results were obtained. Finally, antioxidant activity measurements demonstrate no changes due to plasma treatment. The results confirm that the MW surface wave sustained discharge is applicable to fruit surface decontamination.

## Indigenous yeasts from rose oil distillation wastewater and their capacity for biotransformation of phenolics

Rusanova M, Rusanov K, Butterweck V, Atanassov I.

### Резюме

Изследвани бяха аборигенни дрожди, свързани със спонтанната ферментация на богати на фенол отпадни води от дестилация на розово масло (RODW), генерирани след промишлената дестилация на розово масло. Анализът на ITS-rDNA последователността на пробите, събрани от RODW, ферментирали при полустерилни условия, лагуна за отлагане на отпадъци и ендофитни дрожди, изолирани от промишлено култивирана *Rosa damascena*, предполага, че спонтанната RODW ферментация е причинена от дрожди от рода *Cyberlindnera*, открити също като ендофити в цветовете от роза. Филогенетичният анализ, базиран на нуклеотидните последователности на фактора на удължаване на транслацията (TEF1 $\alpha$ ) и гените за 18S- и 26S- rRNA, допълнително потвърди таксономичната принадлежност на RODW изолатите от дрожди с рода *Cyberlindnera*. Ферментационният капацитет на RODW на избран набор от аборигенни дрождеви изолати беше изследван и сравнен с този на обичайни щамове дрожди. Аборигенните дрождеви изолати демонстрираха много висока скорост на растеж, което води до почти двойно намаляване на фенолното съдържание във ферментирала RODW. Ферментацията с аборигенни дрожди доведе до промяна в състава на фенолните съединения на RODW. Нивата на някои фенолни гликозиди намаляват чрез изчерпването и ферментацията на тяхната захарна част. Следователно относителното наличие на съответните аглиconi и други фенолни съединения се увеличава. Обсъжда се капацитетът за биотрансформация на RODW феноли от аборигенни дрожди.

### Abstract

The indigenous yeasts associated with the spontaneous fermentation of phenolic-rich rose oil distillation wastewater (RODW) generated after the industrial distillation of rose oil were studied. The ITS-rDNA sequence analysis of the samples collected from RODW fermented at semi-sterile conditions, a waste deposition lagoon and endophytic yeasts isolated from industrially cultivated *Rosa damascena* suggests that the spontaneous RODW fermentation is caused by yeasts from the genus *Cyberlindnera* found also as endophytes in the rose flowers. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of the translation elongation factor (TEF1 $\alpha$ ) and 18S- and 26S- rRNA genes further confirmed the taxonomic affiliation of the RODW yeast isolates with the genus *Cyberlindnera*. The RODW fermentation capacity of a selected set of indigenous yeast isolates was studied and compared with those of common yeast strains. The indigenous yeast isolates demonstrated a superior growth rate, resulting in a nearly double reduction in the phenolic content in the fermented RODW. The indigenous yeasts' fermentation changed the RODW phenolics' composition. The levels of some particular phenolic glycosides decreased through the depletion and fermentation of their sugar moiety. Hence, the relative abundance of the corresponding aglycons and other phenolic compounds increased. The capacity for the biotransformation of RODW phenolics by indigenous yeasts is discussed.

## **A Set of highly polymorphic microsatellite markers for genetic diversity studies in the genus *Origanum***

Alekseeva M, Rusanova M, Rusanov K, Atanassov I.

### **Резюме**

Това изследване съобщава за разработването на набор от 20 високо полиморфни геномни SSR маркера, които могат да се използват, както за идентификация на сортове, така и за изследвания на генетично разнообразие при няколко вида *Origanum*, включително някои от най-познатите като бял риган (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), обикновен риган (*O. vulgare* L. ssp. *vulgare*) и сладка майорана (*O. majorana* L.). Анализът на полиморфното информационно съдържание (PIC) показва средна стойност на PIC от 0,75 с минимум 0,41 и максимум 0,89, като 17 от маркерите показват PIC стойности над 0,73. Сравнителният анализ на генетичното разнообразие на осем естествени популации на бял риган в България показва, че шест от геномните SSR маркери разкриват в значително по-висока степен генетичното разнообразие в популациите, в сравнение с 12 EST SSR маркера, използвани в нашето предишно проучване. Ние също сравнихме ефективността на същите шест геномни SSR маркера с резултатите от осем SRAP праймерни комбинации, които показаха, че SRAP маркерите улавят точно генетичната структура в естествените популации. Разработените силно полиморфни геномни SSR маркери могат да бъдат успешно приложени за оценка на генетичното разнообразие при род *Origanum*, въз основа на очакваната и наблюдавана хетерозиготност в популациите, както и за лесно идентифициране на селекционни линии и сортове въз основа на уникални SSR профили.

### **Abstract**

This study reports the development of a set of 20 highly polymorphic genomic SSR markers which can be used for both cultivar identification and genetic diversity studies in several *Origanum* species, including some of the most popular ones like Greek oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), common oregano (*O. vulgare* L. ssp. *vulgare*), and sweet marjoram (*O. majorana* L.). Analysis of the polymorphic information content (PIC) showed an average PIC value of 0.75 with a minimum of 0.41 and a maximum of 0.89, where 17 of the markers showed PIC values above 0.73. Comparative analysis of the genetic diversity of eight natural populations of Greek oregano in Bulgaria showed that six of the genomic SSR markers revealed significantly higher portions of genetic diversity in the populations, compared to 12 EST SSR markers used in our previous study. We also compared the performance of the same six genomic SSR markers with the results for eight SRAP primer combinations, which showed that SRAP markers captured more precisely the genetic structure in natural populations. The developed highly polymorphic genomic SSR markers can be successfully applied to evaluation of the genetic diversity in the genus *Origanum*, based on the expected and observed heterozygosity in the populations as well as for easy identification of breeding lines and cultivars based on unique SSR fingerprints.

## **Genetic diversity and population structure of Bulgarian autochthonous sheep breeds revealed by microsatellite analysis**

Mihailova Y, Rusanov K, Rusanova M, Vassileva P, Atanassov I, Nikolov V, Todorovska E.G.

### **Резюме**

Това изследване се опитва да даде по-задълбочен поглед върху настоящия генетичен статус на 12 български автохтонни породи овце с помощта на микросателитни (SSR) маркери. Общо 600 индивида от 50 стада бяха анализирани с помощта на панел от 13 SSR маркера. Общо 228 алела бяха идентифицирани в изследваните микросателитни локуси. Средният брой на алелите, ефективният брой на алелите и стойностите на полиморфно информационно съдържание (PIC) за локус бяха съответно 17,54, 5,250 и 0,799. Очакваната хетерозиготност ( $H_e$ ) за всички породи варираше от 0,70 до 0,82. Хетерозиготният дефицит в рамките на популацията ( $F_{is}$ ) варираше от -0,03 до 0,1, отразявайки значителни нива за 10 от 12-те породи. Средната генетична диференциация ( $F_{st}$ ) бе 0,046, демонстрирайки ниско разграничаване между породите. Генетичната дистанция, анализът на главните координати и анализът на структурата показаха, че две от изследваните породи – Местна Старозагорска /SZ/ и Местна Карнобатска /МК/ се отличават в най-голяма степен сред популациите. Подходът на байесовото групиране предполага ниско ниво на диференциация на породите за останалите 10 породи овце. Резултатите говорят за това, че в България трябва да се прилагат подходящи стратегии за управление и специфични политики за селекция, за да се избегне смесването на породи и да се намали ерозията на чистотата на породата, наблюдавана при някои породи.

### **Abstract**

This study attempts to provide a deeper insight into the current genetic status of 12 Bulgarian autochthonous sheep breeds using microsatellite (SSR) markers. A total of 600 individuals from 50 flocks were analyzed using a panel of 13 SSR markers. In total, 228 alleles were found in the studied microsatellite loci. The mean number of alleles, the effective number of alleles, and the polymorphic information content (PIC) values per locus were 17.54, 5.250, and 0.799, respectively. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) for all breeds ranged from 0.70 to 0.82. The within-population heterozygote deficit ( $F_{is}$ ) varied from -0.03 to 0.1, reflecting significant levels for 10 of the 12 breeds. The average genetic differentiation ( $F_{st}$ ) was 0.046, revealing a low discrimination between the breeds. The genetic distance, principal coordinate analysis, and the structure analysis showed that two of the studied breeds—Local Stara Zagora/SZ/ and Local Karnobat/MK/—were the most distinct sheep populations. The Bayesian clustering approach suggested poor breed differentiation for the remaining 10 sheep breeds. The results suggest that proper management strategies and specific breeding policies need to be implemented in Bulgaria to avoid the intermixing of breeds and to reduce the erosion of breed purity observed in some breeds.

## Fractions of methanol extracts from the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* have anti-breast cancer effects in model cell systems

Zasheva D, Mladenov P, Rusanov K, Simova S, Zapryanova S, Simova-Stoilova L, Moyankova D, Djilianov D

### Резюме

Ракът на гърдата е сред най-проблемните заболявания и водеща причина за смърт при жените. Широко използваните до момента методи на лечение са често с много странични ефекти, които сериозно нарушават качеството на живот на пациентите. За да се преодолеят тези ограничения, непрекъснато се тестват нови алтернативи за лечение на рак, включително биоактивни съединения от растителен произход. Нашата цел бе да проучим ефектите на фракции от метанолови екстракти на *Haberlea rhodopensis* върху клетъчната жизнестойност и пролиферацията на две моделни клетъчни линии на рак на гърдата с различни характеристики. В допълнение към силното намаляване на клетъчната жизнестойност, две от фракциите показаха значително влияние върху скоростта на пролиферацията на експресиращата хормонални рецептори MCF7 линия и тройно негативната MDA-MB231 клетъчна линия на рак на гърдата. Не бяха наблюдавани значими ефекти върху доброкачествената клетъчна линия MCF10A. Ние приложихме широкомащабен нецелесъобразен подход за пречистване и идентифициране на съединенията, налични във високи нива от активните фракции на екстракти от *H. rhodopensis*. Чрез комбинирания NMR/MS подход, във фракциите бе идентифициран миконозид, а в една от тях беше открит хиспидулин 8-C-(6-O-acetyl-2''-O-syringoyl- $\beta$ -glucopyranoside). Освен това извършихме анализ на молекулен докинг на възможни миконозидни взаимодействия с няколко протеини, важни за пролиферацията на рак на гърдата. Установена бе висока вероятност за свързване за GLUT1 транспортера, естрогенния рецептор и MYST ацетилтрансфераза. Нашите резултати са добра основа за бъдещи проучвания за използването на миконозид за целева терапия на рак на гърдата.

### Abstract

Breast cancer is among the most problematic diseases and a leading cause of death in women. The methods of therapy widely used, so far, are often with many side effects, seriously hampering patients' quality of life. To overcome these constraints, new cancer treatment alternatives are constantly tested, including bioactive compounds of plant origin. Our aim was to study the effects of *Haberlea rhodopensis* methanol extract fractions on cell viability and proliferation of two model breast cancer cell lines with different characteristics. In addition to the strong reduction in cell viability, two of the fractions showed significant influence on the proliferation rate of the hormone receptor expressing MCF7 and the triple negative MDA-MB231 breast cancer cell lines. No significant effects on the benign MCF10A cell line were observed. We applied a large scale non-targeted approach to purify and identify highly abundant compounds from the active fractions of *H. rhodopensis* extracts. By the combined NMR/MS approach, myconoside was identified in the fractions and hispidulin 8-C-(6-O-acetyl-2''-O-syringoyl- $\beta$ -glucopyranoside) was found in one of them. We further performed molecular docking analysis of possible myconoside interactions with several proteins, important for breast cancer proliferation. High probability of binding was established for GLUT1 transporter, estrogen receptor and MYST acetyltransferase. Our results are a good background for future studies on the use of myconoside for targeted breast cancer therapy.

## **High cross-pollination rate of Greek oregano (*O. vulgare* ssp. *hirtum*) with Common oregano (*O. vulgare* ssp. *vulgare*) under open field conditions as revealed by microsatellite marker analysis**

Alekseeva M, Rusanova M, Georgieva L, Rusanov K, Atanassov I

### **Резюме**

Изследвахме модела на опрашване при белия риган (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) при контролирани условия и при опрашване на открито. При отглеждане на закрито без присъствието на насекоми, растенията бял риган не формираха семена, което говори за ниско ниво на спонтанно самоопрашване. Прилагането на ръчно самоопрашване при същите условия доведе до формирането само на 16 семена, от които само 5 успяха да покълнат. В същото време, клонално размножено растение бял риган от същия генотип формира богат набор от над 300 семена в условия на открито, когато цветовете бяха посещавани от насекоми в район, където не бяха наблюдавани други видове *Origanum*. Анализът с SSR маркери показва, че над 70% от семената вероятно са резултат от самоопрашване, което показва, че опрашването с помощта на насекоми е от съществено значение за формирането на семена. Освен това анализирахме кръстосаното опрашване на бял риган с обикновен риган (*O. vulgare* ssp. *vulgare*) в условия на открито, където двата подвида бяха отглеждани в непосредствена близост. Използвайки SSR маркери, анализирахме 83 растения, получени от семена на три вегетативно размножени майчини растения бял риган. Изненадващо, резултатите показаха, че всички анализирани семеначета са получени в резултат от кръстосано опрашване на бял риган с обикновен риган, което показва, че кръстосаното опрашване между двата подвида може напълно да вземе връх над самоопрашването или кръстосаното опрашване между растенията бял риган. Обсъжда се възможното въздействие на наблюдаваната висока степен на кръстосано опрашване върху генетичния произход на семената на избрани линии и сортове бял риган, както и върху генетичното разнообразие и структурата на естествените популации.

### **Abstract**

We studied the mode of pollination in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) under both controlled and open pollination conditions. When grown indoors without the presence of insects, Greek oregano plants did not develop any seeds, indicating a low level of spontaneous self-pollination. Applying manual self-pollination under the same conditions resulted in only 16 seeds, of which only five were able to germinate. At the same time, a clonally propagated Greek oregano plant of the same genotype produced a rich set of over 300 seeds in open field conditions when the flowers were visited by insects in an area where no other *Origanum* species were observed. Analysis with SSR markers showed that over 70% of the seeds likely resulted from self-pollination, indicating that insect-mediated pollination is essential for the seed development. We further analyzed the cross-pollination of Greek oregano with Common oregano (*O. vulgare* ssp. *vulgare*) in open field conditions where the two subspecies were grown in close proximity. Applying SSR markers, we analyzed 83 plants obtained from seeds of three vegetatively propagated Greek oregano mother plants. Surprisingly, the results showed that all analyzed seedlings resulted from cross-pollination of Greek oregano with Common oregano, indicating that cross-pollination between the two subspecies can completely take over the self-pollination or cross-pollination between the Greek oregano plants. The possible impact of the observed high cross-pollination rate on the genetic origin of seeds of selected Greek oregano lines and varieties, as well as on the genetic diversity and structure of natural populations, is discussed.

## Identification of QTL controlling the ratio of linalool to linalyl acetate in the flowers of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Rusanov K, Vassileva P, Rusanova M, Atanassov I

### Резюме

Съдържанието на линалил ацетат и съотношението на линалол към линалил ацетат (съотношение L/LA) са едни от важните параметри, определящи качеството на лавандуловото масло. Характеризирането на сегрегираща популация, получена чрез самоопрашване на *Lavandula angustifolia* сорт *Hemus* доведе до идентифицирането на единичен QTL (L/LA-QTL), контролиращ съотношението L/LA и разположен на хромозома 8 в референтния геном на лавандулата. Анализът на данните за L/LA показва, че растенията, хомозиготни за един от алелите на L/LA-QTL, имат значително по-високо съдържание на линалол, по-ниско съдържание на линалил ацетат и по-високо съотношение L/LA, отколкото растенията, които са хетерозиготни или хомозиготни за другия алел. Не се наблюдава значителна разлика за сумата на съдържанието на линалол и линалил ацетат сред тези три групи растения, което предполага, че идентифицираният L/LA-QTL е свързан с ензимно превръщане на линалол в линалил ацетат. BLAST търсене показва, че региона на L/LA-QTL включва последователност от гена *LiAAT4* за монотерпен ацетилтрансфераза, считан за кандидат ген за L/LA-QTL локуса. Анализ на последователността на гена *LiAAT4* на сорт *Hemus* показва наличието на два алела, различаващи се в два нуклеотида и предполагаеми аминокиселинни замествания. Сравнението на алелните конфигурации на SSR, SRAP и *LiAAT4* локусите и съотношението L/LA на растенията, показващи рекомбинация в L/LA-QTL региона, осигури допълнителна подкрепа за това, че *LiAAT4* е кандидат ген, лежащ в основата на идентифицирания L/LA-QTL и контролиращ съотношението L/LA. Обсъжда се приложението на молекулни маркери за идентифицирания L/LA-QTL локус.

### Abstract

The content of linalyl acetate and the ratio of linalool to linalyl acetate (L/LA ratio) are one of the important parameters that determine the quality of lavender oil. The characterization of a segregating population derived from a self-pollinated *Lavandula angustifolia* var. *Hemus* resulted in the identification of a single quantitative trait locus controlling the L/LA ratio (L/LA-QTL) and located on chromosome 8 of the lavender reference genome. The L/LA data analysis demonstrated that plants homozygous for one of the L/LA-QTL alleles had significantly higher linalool content, lower linalyl acetate content and higher L/LA ratio, than the plants which were either heterozygous or homozygous for the other allele. No significant difference was observed for the sum of linalool and linalyl acetate content among these three groups of plants, suggesting that the identified L/LA-QTL is related to an enzyme conversion of linalool to linalyl acetate. The BLAST search revealed that the L/LA-QTL region included a sequence of the *LiAAT4* gene of monoterpene acetyltransferase, considered as a candidate gene for the L/LA-QTL locus. Sequence analysis of the *LiAAT4* gene of var. *Hemus* revealed the presence of two alleles differing in two nucleotides and predicted amino acid substitutions. The comparison of the allele configurations of SSR, SRAP and *LiAAT4* loci and the L/LA ratio of plants showing recombination in the L/LA-QTL region provided further support that *LiAAT4* is a candidate gene underlying the identified L/LA-QTL and controlling the L/LA ratio. The application of molecular markers for the identified L/LA-QTL is discussed.