

Молекулярно-таксономично изследване на *Rumex* sect. *Acetosa* (*Polygonaceae*) в българската флора

Цветанка Райчева¹, Илия Денев²

¹ Аграрен Университет, бул. „Менделеев” 12, 4000 Пловдив

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

Abstract

Raycheva, Ts. & Denev, I. 2012. Molecular taxonomic investigation of *Rumex* sect. *Acetosa* (*Polygonaceae*) in the Bulgarian flora. – In: Petrova, A. (ed.), Proc. VII Natl. Conf. Bot., 29–30.09.2011, Sofia, pp. 311-319. Bulg. Bot. Soc., Sofia. ISBN 978-954-92808-2-1

The genetic diversity and relationships between the four Bulgarian species from the genus *Rumex* L. subgen. *Acetosa* sect. *Acetosa* was assessed. Specimens collected from natural populations of *R. acetosa*, *R. tuberosus*, *R. thyrsiflorus* and *R. arifolius* have been examined. The determination keys for species of sect. *Acetosa* available in taxonomic literature are based on several vague morphological characteristics, which was the reason to believe that they are not sufficient and reliable enough to distinguish species in this section. The aim of the study was to test the applicability of ISSR molecular markers as a tool to assess genetic diversity and relationships among Bulgarian wild species of sect. *Acetosa*. For this purpose a total DNA was isolated from the collected samples and was used as a template for conducting ISSR-PCR reactions with seven different primers. The distribution of polymorphic ISSR products obtained from each primer was analyzed using the PAST software. The resulting matrix of Euclidean distances was used to construct consequent cladograms representing genetic differences between the studied species. The analysis of the distribution of polymorphic products displayed grouping in four clusters, corresponding to the assessed species. Despite the minimal morphological differences between the species studied, they showed discrete genetic differences and better differentiation on molecular level. The grouping corresponds to the ecological specialization of the studied taxa.

Key words: ISSR markers, molecular taxonomy, *Rumex*, sect. *Acetosa*

Въведение

Традиционно в таксономичната литература на род *Rumex* ботаниците са приели групиране в четири подрода: *Acetosella* (Meissner) Rech. f., *Acetosa* (Mill.) Rech. f., *Rumex* (= *Lapathum* (Campd.) Rech. f.) и *Platypodium* (Willk.) Rech. f. (Rechinger 1937, 1964; Löve 1943; Degraeve 1975; Rechinger & Akeroyd 1993). Някои автори

(Löve & Kapoor 1968; Kubát 1990) издигат четирите групи в по-висок таксономичен ранг – род: *Rumex* L., *Acetosa* Mill., *Acetosella* (Meissn.) Fourr. и *Vicephalophora* Pau (subgenus *Platypodium*). Това групиране не е прието от останалите изследователи на тази група висши растения. Ние също считаме, че критериите за издигане на таксономичните групи от род *Rumex* в по-висок родов ранг са недостатъчно основателни.

Европейските видове от подрод *Acetosa* са групирани в 4 секции (Бородина 1978). Многогодишните видове са обособени в секция *Acetosa* (Mill.) DC., която включва двудомни видове с $2n = 14$ за плодниковите екземпляри, $2n = 15$ за тичинковите и монотипната секция *Scutati* Á. Löve (с двуполови цветове и $2n = 20$). Едногодишните видове от другите две секции *Hastati* Á. Löve и *Vesicarii* Á. Löve включват хермафродитни и полигамни видове с основно хромозомно число $x = 9, 10$. По отношение на разпространението, последните две секции се срещат в субтропичните и умерено топли райони на Стария свят. За разлика от ограниченото разпространение на едногодишните видове, многогодишните таксони от подрод *Acetosa* секция *Acetosa* имат широко разпространение в Европа, Азия и Америка. Тази група е била обект на интензивни цитологични проучвания във връзка с механизмите за определянето на полови хромозоми (Zuk 1963; Wilby & Parker 1987; Ainsworth & al. 2005; Navajas-Peres & al. 2005). Въпреки, че в цитологично отношение подрод *Acetosa* е добре проучен, в таксономично отношение съществуват редица неизяснени проблеми (Rechinger 1961; Бородина 1978). Видовете притежават силно изравнен морфологичен комплекс от белези, което затруднява определянето им (Бородина 1989). Разграничаването на видовете в таксономичната литература се основава на малко на брой, припокриващи се морфологични характеристики, което е причина да считаме, че те са недостатъчно убедителни, както за разграничаване на видовете от секция *Acetosa*, така и за изясняване на генетичното разнообразие и филогенетичните взаимоотношения между тях.

Един широко използван в съвременната молекулярна таксономия метод е ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz & al. 1994). Това е 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 или незакотвящи се, в зависимост от това дали 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, докато мононуклеотидните типове са характерни за хлоропластния геном. Всеки получен в резултат на ISSR-PCR продукт кореспондира с фрагмент геномна ДНК, обградена от два микросателита с огледално обърнати секвенции (Zietkiewicz & al. 1994; Tsumara & al. 1996; Nagaoka & Ogihara 1997).

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

Високата надеждност и простота на ISSR метода, сравнен с RFLP и RAPD, го правят предпочитан в таксономичните изследвания на различни видове (Nagaoka & Ogihara 1997). Тези особености, комбинирани с по-голямата възпроизводимост, правят този метод по-удобен от другите налични маркерни системи в изследване на генетични вариации с близкородствени видове (Fang & Roose 1997; Nagaoka & Ogihara 1997). Методът е приложим и в изследвания на подвидово и популационно ниво (Bornet & Branchard 2001).

Целта на настоящето изследване е да се тестват ISSR молекулни маркери, чрез които да се оцени генетичната обособеност и родствените връзки при българските диворастящи видове от подрод *Acetosa* секция *Acetosa*.

Материали и методи

Изследвани са всички разпространени в българската флора представители на *Rumex* sect. *Acetosa*. Материалите са събрани от естествени местообитания от различни флористични райони на България, през периода 2010–2011 г.

Изследваните материали са определени на базата на съществуващите описания и определителни ключове в европейските флористични издания. Възприели сме таксономичната схема, предложена от Бородина (1978):

Genus *Rumex* L.

Subgen. *Acetosa* (Mill.) Rech. f.

Sect. *Acetosa* (Mill.) DC.

R. acetosa L.

R. tuberosus L.

R. thyriflorus Fingerh.

R. arifolius All.

Хербарни образци към всяка от изследваните проби са депозираны в хербариума към Аграрен университет, SOA (Таблица 1).

Таблица 1. Образци на изследваните български видове от sect. *Acetosa*.

Таксон, проба (№), флористичен район, УТМ координати, надморска височина, находище.

Rumex acetosa

1. AC 04 (17.1) GM-45, 1084 m, Родопи (*Западни*), над Велинград, 03.07.2010.

2. AC 50 (5.2) LH-85, 307 m, Предбалкан (*Източен*), около с. Вългевци, 18.04.2011.

3. AC 51 (5.2) MH-87, 186 m, Североизточна България, преди гр. Велики Преслав, Шуменско, 18.04.2011.

Rumex tuberosus

4. TU 48 (17.2) LG-24, Родопи (*Средни*), ман. „Св. Петка”, Асеновградско, 10.04.2011.

5. TU 49 (1.1) PJ-10, 43, Черноморско крайбрежие (*Северно*), буферната зона на резерват Калиакра, 17.04.2011.

6. TU 51 (17.2) LG-25, 370 m, Родопи (*Средни*), местн. Анатема, над Асеновград, 27.05.2010.

7. TU 52 (2) 35TMJ13, 75 m, Североизточна България, Природен парк „Русенски Лом”, Ивановски скални църкви, 28.05.2010.

Таблица 1. Продължение.

Таксон, проба (№), флористичен район, УТМ координати, надморска височина, находище.

Rumex arifolius

8. AR 31 (5.2) LH-63, 1193 m, Стара планина (Средни), вр. Шипка, около паметника, ливади, 29.05.2010.
 9. AR 40 (17.2) LG-02, 1402 m, Родопи (Средни), по пътя към с. Зорница, 04.07.2010.
 10. AR 41 (17.2) LG-13, 1378 m, Родопи (Средни), над х. „Пашалийца“, при с. Павелско, 04.07.2010.
 11. AR 42 (15) GM-37, 1580 m, Рила, около язовир „Белмекен“, 03.07.2010.
 12. AR 43 (17.2) GM-36, 1515 m, Родопи (Западни), над местн. Юндола, 03.07.2010.
 13. AR 44 (9) FM-37, 1525 m, Западни гранични планини, около х. „Трите буки“, Осогово, 15.07.2010.
 14. AR 45 (17.2) LG-01, 1364 m, Родопи (Средни), по пътя към Пампорово, 04.07.2010.

Rumex thyrsoiflorus

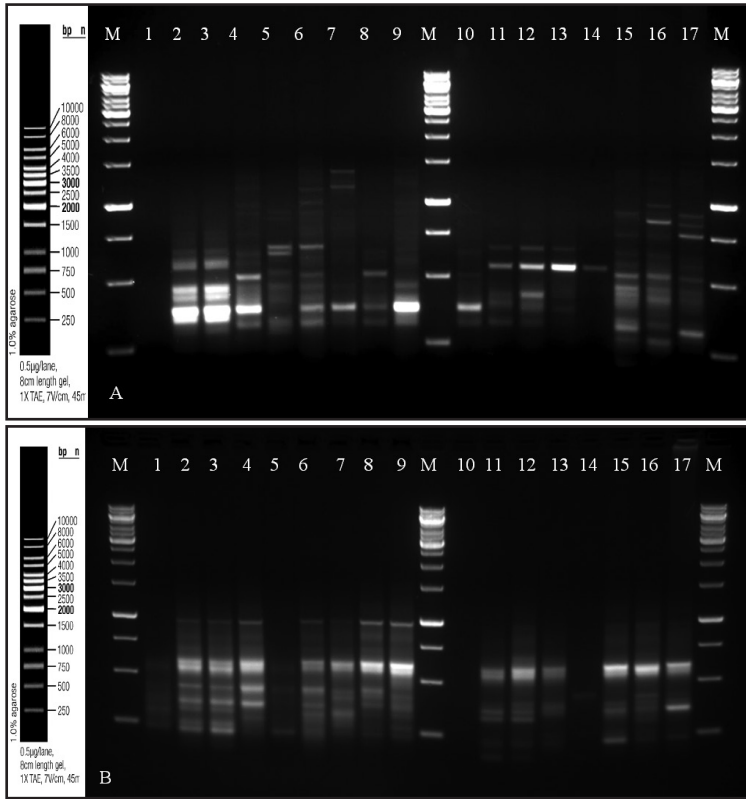
15. TR 61 (17.2) GM-36, 1548 m, Родопи (Западни), сухи места над местн. Юндола, 03.07.2010.
 16. TR 62 (16.1) KH-63, 802 m, Софийски район, по пътя преди с. Антон, 08.07.2010.
 17. TR 64 (16.1) KH-71, 1020 m, Средна гора (Западна), с. Панагюрски колонии, 08.07.2010.

ISSR-PCR реакции. Свежи листа от растенията са замразени и стрити на фин прах с течен азот. Около 100 mg от материала са използвани за изолиране на геном-на ДНК посредством DNeasy plant mini kit (Qiagene), следвайки оригиналния му протокол. Подборът на праймерите е резултат от експериментални предварителни проучвания на авторите в род *Rumex*, които показаха като най-удачни за работа в тази група седем ISSR олигонуклеотидни праймера (p2, p7, p810, p811, p817, p826, p836), с по два арбитрарни пуринови нуклеотида в 3'-края. ISSR-PCR реакциите са провеждани чрез смесване на 2 µl (~150 ng) DNA матрица; 1 µl праймер (10 mmol.l⁻¹ концентрация); 25 µl PCR мастьър микс (Fermentas, Cat No K0171) и 22 µl вода свободна от ДНК-ази (доставяна с кита). PCR-реакциите са провеждани в PCR апарат Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) при използване на следната програма: начална денатурация на ДНК при 94 °C – 5 min; след това 35 цикъла при 94 °C – 1 min; 55 °C – 1,30 min; 72 °C – 3 min и финално удължаване при 72 °C за 2 min.

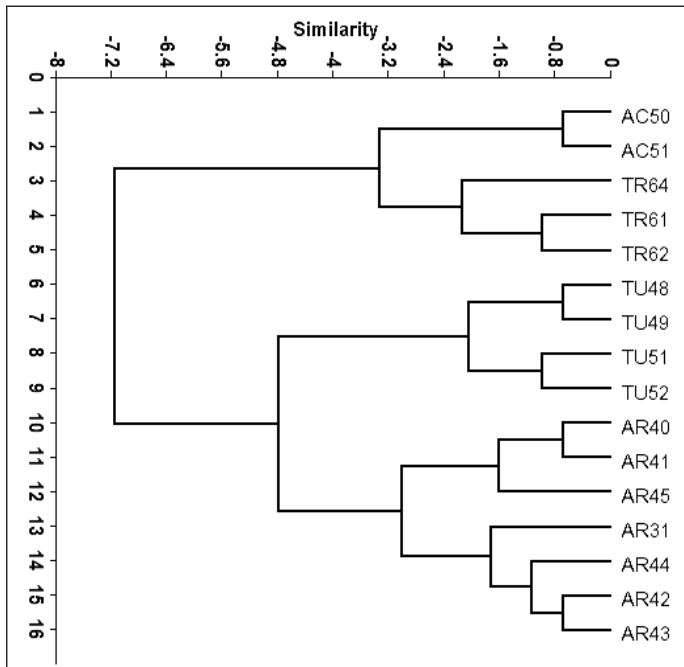
Гел електрофореза. PCR продуктите са смесени с 6 ml буфер за нанасяне (Fermentas #R0611) и разделяни посредством 1,5% агарозен гел, съдържащ 0,5 mg/ml етидиев бромид (крайна концентрация). Използван е 1×TAE буфер и електрическо напрежение 7 V/cm. Размерът на продуктите е определен чрез сравняването им с 1 kb ДНК маркер (Fermentas GeneRuler#SM0311).

Молекулярните изследвания са проведени в научноизследователската лаборатория по Молекулни маркери към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при ПУ „Паисий Хилендарски“.

Анализ на данните. Първоначално са определяни молекулните маси на амплифицираните ясно видими ISSR-PCR продукти (Фиг. 1) посредством програмата GelPro, а след това са преразпределяни в класове от молекулни маси за съставяне на булеви матрици според наличие (1) и отсъствие (0) на специфични полиморфни ивици. Данните от всички използвани праймери са групирани в обща матрица, която е използвана за конструиране на обобщена кладограма (Фиг. 2) с помощта на софтуер за дискретен и кластер анализ на генетичен полиморфизъм – PAST (Hammer & al. 2001). За да се избегнат грешки в резултатите, при построяване на обобщената кладограма са изключени отделни проби, които показват неясни ивици.



Фиг. 1. Разделяне на амплифицираните ISSR продукти със: **A** – p810, **B** – p836 на 1,5% агарозен гел (номерът на пробите е представен в таблица 1; **M** – маркер, молекулните маси са дадени вляво).



Фиг. 2. Обобщена кладограма за видовете от sect. *Acetosa*, въз основа на разпределението на молекулните маси на ISSR-PCR продуктите със 7 праймера (номерът на пробите е представен в таблица 1).

Резултати и обсъждане

Морфологичен анализ

Изследваната група обединява видове с изравнен морфологичен комплекс. Анализът на метричните белези показва високо изразено морфологично сходство. В търсене на микро- и макро- морфологични белези, които да улеснят диференцирането на видовете в отделните подродове на род *Rumex*, изследователите отбелязват като основни диагностични белези морфологията на листата, околоцветника и плодовете (Rechinger 1932; Snogerup 1991).

В определителните ключове, видовете – обект на изследването, се разграничават главно по вегетативните характеристики: размери и форма на приосновните листа и разнищеност на охреите, както и някои генеративните белези като разклоняване на съцветието и размери на валвите. Както повечето двудомни растения, видовете киселец не показват полов диморфизъм преди полова зрялост. През репродуктивната фаза генеративните органи, цветове, плоден перигон и орехчета при изследваните видовете не показват ясни различия, което затруднява определянето на таксоните само по тези признаци (Таблица 2). По наши наблюдения морфологията на подземните вегетативни части показват дискретни различия и позволяват идентификация, както в предрепродуктивна, така и в репродуктивна фаза по следните признаци:

R. acetosa – късо коренище, с нишко-видни добавъчни корени без задебеляване, които не проникват надълбоко.

R. tuberosus – характерни за вида са вретеновидно-груdkовидните задебелявания на добавъчните корени, което позволява лесна идентификация в сравнение с останалите видове в групата. Доказателство за това е факта, че депозираните в националните хербариуми образци от вида са еднозначно определени от авторите, докато образците от останалите 3 вида са обект на ревизии.

R. thyrsiflorus – силно развит вертикален корен, неразклонен или слабо разклонен, който достига на значителна дълбочина.

R. arifolius – пълзящо коренище с тънки, добавъчни корени.

Морфологично *R. arifolius* се отличава от останалите членове на изследваната група по формата на приосновните листа – листната петура е с копиевидна основа, размерите дължина/ширина са приблизително равни, докато при останалите видове дължината превишава ширината от 2 до 4 пъти, като най-голямо е съотношението при *R. thyrsiflorus*. Височината на стъблото е белег, който силно варира при отделните видове. Проучването показва, че при някои таксони най-силно изменчиви са характеристиките на приосновните листа – дължина и ширина на листната петура. Този белег е с модификационен характер, поради което като диагностичен би бил

Таблица 3. Получени фрагментни класове, молекулни маси на PCR фрагментите.

Праймер	Брой класове	Молекулни маси, kB (<i>min-max</i>)
P2	20	129–1368
P7	16	195–991
P810	19	209–1406
P811	22	131–1429
P817	12	207–1000
P826	16	226–949
P836	12	121–1146

полезен само спрегнат с други белези, които не се влияят в такава степен от външни фактори. Размерите на валвите при плода е ниско информативен белег, което се доказва от близките метрични стойности при изследваните видове (Таблица 2).

Таблица 2. Метрични морфологични белези на изследваните български видове от sect. *Acetosa*.

Показател	<i>R. acetosa</i> x±Sx	<i>R. tuberosus</i> x±Sx	<i>R. thyriflorus</i> x±Sx	<i>R. arifolius</i> x±Sx
Дължина валви (в mm)	3,79±0,05	3,57±0,08	3,54±0,03	3,89±0,03
Ширина валви (в mm)	3,25±0,03	3,19±0,03	3,01±0,02	3,53±0,03
Дължина приоснови листа (в cm)	9,63±2,03	8,48±1,72	12,57±1,93	7,46±1,72
Ширина приосновни листа (в cm)	4,11±1,11	4,36±1,06	4,51±0,92	5,26±0,73
Орехче дължина (в mm)	2,29±0,03	2,37±0,02	2,21±0,02	2,10±0,03
Орехче ширина (в mm)	1,62±0,02	1,70±0,01	1,70±0,01	1,46±0,01

ISSR анализ

Секвенциите на използваните праймери и молекулните маси на получените от тях фрагменти са представени в Таблица 3. Подбраните праймери успешно амплифицират микросателитни последователности в генома на изследваните 4 вида от секция *Acetosa*. Обобщената кладограма (Фиг. 2) илюстрира различията между отделните образци, базирани на ISSR продуктите, получени от изследваните видове.

Кладистичният анализ на генетичните разстояния показва ясно групиране на проби с различна принадлежност в два клада. Единият обединява проби от видовете *R. acetosa* и *R. thyriflorus*. Вторият клад включва образците от видовете *R. arifolius* и *R. tuberosus*.

При *R. arifolius* се наблюдава групиране по географска локализация – проби от Средни Родопи (AR40, AR41 и AR45) са в общ отделен клад, което показва близко, в сравнение с останалите проби от този вид, генетично сходство; пробите от Белмекен (AR42) и Юндола (AR43), също показват малки генетични разлики и се групират в отделен подклад. Най-близо до тях е проба от Осоговска планина (AR44), като в генетично отношение най-различни са образците от Средна Стара планина (AR31) (Фиг. 2).

Такава генетична корелация по географски произход при останалите три вида не се наблюдава. При *R. thyriflorus* пробата от с. Антон (TRS62) се групира с тази от местн. Юндола (TRS61), въпреки че, по географска локализация е по-близка с тази от Панагюрски колонии (TRS64), която показва генетична отдалеченост. Подобни са резултатите при групирането и на *R. tuberosus* – пробите от Родопи са в два отделни клада, заедно с пробите от Калиакра и Русенски Лом, географски достатъчно отдалечни, но показват генетично сходство. Най-вероятно това е свързано с географското припокриване на екологичните местообитания при изследваните видове, както и близкият период на цъфтеж между тях, което не изключва напълно възможността за обмен на гени, чрез междувидова хибридизация, въпреки специализацията на видовете в двудомност.

Нашите резултати не съвпадат с данните базирани на морфологичните характеристики при изследваните видове. Метричните и качествени показатели на генера-

тивните структури при subg. *Rumex* имат диагностична стойност. За разлика от тях при видовете от subg. *A. sect. Acetosa* няма дискретни различия, които да позволят разграничаване на таксоните само по този показател (Таблица 2). Най-близки морфологични параметри показват видовете *R. acetosa* и *R. tuberosus* – слабо разклонено съцветие, листа със сърцевидна основа, до 3 пъти по-дълги, отколкото широки.

Неизяснените механизми при subg. *A. sect. Acetosa*, свързани с популационната структура и диференциацията на видовете, се опитваме да изясним чрез комбиниране на екологичен и генетичен подход. По отношение на надморската височина единствено *R. arifolius* е алпийски и субалпийски, мезофилен вид – среща по ливади и покрай горски фитоценози във всички наши планини при надморски височини между 800 и 2200 m. По отношение на височинния диапазон, останалите три вида се срещат в равнините до предпланинския пояс (от 0 докъм 1500 m н.в.). Най-ксерофилни характеристики притежава *R. tuberosus*. Образоването на грудковидни задебелявания на добавъчните корени, несъмнено е резултат от приспособяването на вида към полуаридни местообитания, сухи тревисти и каменисти места, както и пукнатини на варовити скали. *Rumex thyrsoiflorus* е централно европейски вид. У нас се среща по сухи открити места и като плевел по пътищата. Поради близки характеристики материали от вида често са определяни като *R. acetosa*. От изследваните видове най-широко разпространен в Европа, Азия, С. Америка, както и натурализиран в много части на света е *R. acetosa*, типичен мезофилен, ливаден вид и като култивиран в лични стопанства. Въпреки морфологичното сходство на последните три вида, *R. acetosa* и *R. thyrsoiflorus* са филогенетично по-близки един с друг (Фиг. 2), отколкото с *R. tuberosus*, който заема дивергентна позиция по отношение на генетичната диференциация, което кореспондира и с екологичната му специализация като термофилен и ксерофилен вид. Групирането *R. tuberosus* с *R. arifolius* в един клад не е в съответствие с екологичната обособеност и морфологията им. Считаме, че генетичното сходство между тези два вида е резултат от добре развита екологичната изолация.

Заклучение

Проведените ISSR-PCR рекации при българските видове от subg. *A. sect. Acetosa* показват видово специфични фрагменти при продуктите, получени с праймери 2, 7, 810, 811, 826 и 836. Продуктите амплифицирани с праймер 817 не показват полиморфизъм между изследваните таксони. Въпреки, че моделът на групиране не корелира с морфологичните характеристики и екологичната специализация на изследваните видове, молекулярни ISSR маркери позволяват ясно и недвусмислено разграничаване на таксоните в секция *Acetosa*. Считаме, че в по-нататъшните ни изследвания това ще позволи изясняването на филогеничните взаимоотношения на различни таксономични нива (подрод, секция).

Благодарности. Изследването е финансирано по договори ИФС-Б 606, ДОО 2-15 и ДТК 02/40 (Фонд Научни изследвания, Министерство на образованието, младежта и науката на Република България).

Литература

- Бородина, А.Е.** 1978. О видах рода *Rumex* L. европейской части СССР. II. – Новости сист. высш. раст., **15**: 99-112.
- Бородина, А.Е.** 1989. Род *Rumex* L. (*Polygonaceae*) во флоре Кавказа. – Новости сист. высш. раст., **26**: 57-63.
- Ainsworth, C., Rahman, A., Parker, J. & Edwards, G.** 2005. Intersex inflorescences of *Rumex acetosa* demonstrate that sex determination is unique to each flower. – *New Phytol.*, **165**(3): 711-720.
- Bornet, B. & Branchard, M.** 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. – *Plant Mol. Biol. Rep.*, **19**: 209-215.
- Degraeve, N.** 1975. Contribution à l'étude cytotaxonomique des *Rumex* – I. Le genre *Rumex* L. sensu stricto. – *Caryologia*, **28**(1): 187-201.
- Fang, D.Q. & Roose, M.L.** 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. – *Theor. Appl. Genet.*, **95**: 408-417.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontol. Electron.*, **4**(1): 9.
- Kubát, K.** 1990. *Rumex* L. – In: **Hejný, S. & Slavík, B.** (eds), Květena České Republiky. Vol. 2, pp. 311-339. Academia, Praha.
- Löve, Á. & Kapoor, B.M.** 1968. A Chromosome Atlas of the Collective Genus *Rumex*. – *Cytologia*, **32**: 328-342.
- Löve, Á.** 1943. Cytogenetic studies on *Rumex*, subgenus *Acetosella*. – *Hereditas* (Lund), **30**: 1-136.
- Nagaoka, T. & Oghihara, 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.
- Navajas-Peres, R., Herran, R., Gonzalez, G., Jamilena, M., Lozano, R., Rejon, C., Rejon, M. & Garrido-Ramos, M.** 2005. The Evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within *Rumex* (*Polygonaceae*) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data. – *Mol. Biol. Evol.*, **22**(9): 1929-1939.
- Rechinger, K.H.** 1932. Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Rumex*. I. – *Beih. Bot. Centralbl.*, Abt. 2, **49**(1): 1-132.
- Rechinger, K.H.** 1937. Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Rumex*. V. The North American species of *Rumex*. – *Publ. Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser.*, **17**(1): 1-151.
- Rechinger, K.H.** 1961. Notes on *Rumex acetosa* in the British isles. – *Watsonia*, **5**(2): 64-66.
- Rechinger, K.H.** 1964. *Rumex* L. – In: **Tutin, T.G. & al.** (eds), *Flora Europaea*. Vol. 1, pp. 82-89. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Rechinger, K.H. & Akeroyd, J.R.** 1993. *Rumex* L. – In: **Tutin, T.G. & al.** (eds), *Flora Europaea*. Ed. 2, Vol. 1, pp. 99-107. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Snogerup, S.** 1991. *Rumex* subgen. *Rumex* in the flora Nordica area. – *Svensk Bot. Tidskr.*, **85**(4): 249-260.
- Tsumura, Y., Ohba, K. & Stratus, S.H.** 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). – *Theor. Appl. Genet.*, **92**: 40-45.
- Wilby, A.S. & Parker, J.S.** 1987. Population structure of hypervariable Y-chromosomes in *Rumex acetosa*. – *Heredity*, **59**: 137-143.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D.** 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. – *Genomics*, **20**: 176-183.
- Zuk, J.** 1963. An investigation on polyploidy and sex determination within the genus *Rumex*. – *Acta Soc. Bot. Pol.*, **32**: 5-72.

