



МОЛЕКУЛЯРНО – ТАКСОНОМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЪТРЕВИДОВАТА ИЗМЕНЧИВОСТ ПРИ *R. PULCHER* L. (*RUMEX* L., *POLYGONACEAE* JUSS.) В БЪЛГАРИЯ

Цветанка Г. Райчева¹, Илия Д. Денев²,
Десислава Димитрова³, Кирил Х. Стоянов¹

¹ Аграрен университет – Пловдив, E-mails: raicheva@abv.bg; orobanche@abv.bg

² ПУ „П. Хилендарски“, E-mail: iliden@uni-plovdiv.bg

³ Институт по Ботаника – БАН, E-mail: desco@bio.bas.bg

Abstract. Four subspecies of *Rumex pulcher* occur in Bulgaria are studied – subspp. *pulcher*, *woodsii*, *raulinii*, *anodontus*. *Rumex pulcher* subsp. *anodontus* is new, recently recorded subspecies for the Bulgarian flora. We applied a combination of morphological and molecular taxonomy (ISSR) methods. The amplified as a result of PCR-ISSR reaction unambiguous bands are scored by molecular weights and redistributed in classes to compile a presence/absence matrix. The dendrograms are based on the results obtained by each primer used. They displayed a specific grouping in subspecies and populations. Because the method is free of environment influence this approach could be used for better understanding of taxonomic position of taxa and relationships in genus *Rumex* s. str.

Key words: genus *Rumex* s. str., *Rumex pulcher* subspp. *pulcher*, *woodsii*, *raulinii*, *anodontus*, morphological key, ISSR markers.

ВЪВЕДЕНИЕ

Rumex pulcher е полиморфен вид, представен в Европа от 4 подвида (AKERROYD & RECHINGER, 1993). Различни автори в Европа възприемат морфологичната изменчивост в *R. pulcher* с различен таксономичен ранг (НАУЕК, 1924; RECHINGER, 1932; CULLEN, 1967). В първите обобщаващи за страната флорни издания не се посочва вътревидова изменчивост за *R. pulcher* (СТОЯНОВ и др., 1924; 1933; 1948; СТОЯНОВ & др. 1966). По-късно ВЪЛЕВ (1966) посочва три подвида за България. ДЕЛИПАВЛОВ (2003) също потвърждава участието на *Rumex* subspp. *pulcher*, *divaricatus* (чието приоритетно име е *woodsii*) и *raulinii*. Въпреки че до настоящото изследване няма депозираните материали от subspp. *woodsii* нашата ревизия на съществуващите материали и теренни проучвания потвърждават участието на трите подвида във флората на България (РАУСНЕВА *et al.*, 2007). *Rumex pulcher* subsp. *pulcher* е широко разпространен в страната и се проявява с плевелни и рудерални

характеристики. Подвидовете *woodsii* и *raulinii* са разпространени предимно в райони със средиземноморски климат, а новоустановеният таксон *subsp. anodontus* е локализиран до момента наредко в най-южната част на Черноморско крайбрежие – ксерофитни, тревисти местообитания край с. Резово.

Един широко използван през последните години в молекулярната таксономия метод е ISSR (INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEATs). Това е сравнително нов, PCR-базиран метод при който се използват единични праймери с дължина 16-18 нд комплементарни на определени микросателитни секвенции. Праймерите могат да са закотвящи се или не закотвящи се в зависимост от това дали съдържат в 3' или 5' края си 2-4 арбитрарни нуклеотида (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). В ISSR-базираните изследвания най-често се използват ди- и тринуклеотидни типове микросателити, защото те са характерни за ядрения геном, докато мононуклеотидните типове се характерни за хлоропластният геном. Всеки получен в резултат на ISSR продукт кореспондира с фрагмент геномна ДНК обградена от две микросателита с огледално обърнати секвенции (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; TSUMARA *et al.*, 1996; NAGAOKA *et al.*, 1997).

ISSR метода 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 таргетната секвенция.

Високата надеждност и простота на ISSR метода сравнен с RFLP и RAPD, го правят предпочитан в таксономичните изследвания на различни видове (NAGAOKA & OGINARA, 1997). Тези особености, комбинирани с по-голямата възпроизводимост, правят този метод по-удобен от другите налични маркерни системи в изследване на генетични вариации с близко родствени видове (NAGAOKA & OGINARA, 1997). Методът е приложим и в изследвания на подвидово и популационно ниво (BORNET & BRANCHARD, 2001).

Целта на настоящото изследване е да се проучи вътревидовата изменчивост на *R. pulcher* в България, чрез комбиниране на класически морфологичен подход и молекулярни ISSR маркери.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проби и образци. Изследването се базира на материали от авторски сборове, колекционирани през периода 2003-2006 г. от различни флористични райони на България. Ваучерните образци са депозираны в хербариумите на Аграрен Университет, Пловдив SOA и Институт по ботаника SOM (Таблица 1). Таксономичната принадлежност на пробите, събрани от различни региони на страната е определена посредством съществуващите описания и сравнителни материали от хербариумите SOA, SO, SOM, W и WU.

Изоляция на ДНК. За изолиране на ДНК са използвани 7 дневни прорастъци на експерименталните растения, които са стрити с течен азот. Тоталната ДНК е изолирана с DNAesy Plant Mini кит на Qiagene, като е следван оригиналният протокол към кита.

ISSR-PCR реакции. За провеждане на PCR реакциите е използвана следната реакционна смес: 1 µl ДНК с концентрация 100 µl/ml; 1 µl праймер (MY)n – 100 pmol/µl, 22 µl стерилна дестилирана вода и 2.5 µl Master Mix (Fermentas Cat No K0171). Общ обем на реакционната смес 50 µl. PCR амплификацията е провеждана посредством апарат Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) при използването на следната програма : 94°C – 5 min (за по-добра денатурация) – 1 цикъл; 40 цикъла 94°C – 1 мин; 51.5° C – 1.30 min; 72°C – 3.5 min; единичен цикъл при 72°C за 2 min.

Таблица 1. Ваучерни образци на подвидове от *R. pulcher*.

№, флористичен район, УТМ коорд., надм. височина, локалитет, ваучерен номер
<i>R. pulcher</i> L. ssp. <i>pulcher</i> 200 (1.1) NG-67, 20 м, Крайморие – Бургаско, 23.06.2003, SOA 59238; 208A (1.2) PJ-10, 40 м, Нос Калиакра, 16.06.2004, SOA 59240; 207 (17.3) MF-29, 160 м, Пустеещи земи – Ивайловград, 15.07.2005, SOA 56930; 202 (17.3) MF-28, 78 м, При с. Одринци, 15.07.2005, SOA 163906, SOM 163906; 201 (18) LH-10, 275 м, Сухи места край с. Песнопой, 03.07.2005, SOA 59241; 206 (10) FL-68, 200 м, След с. Струмешница, 18.06.2005, SOA 163911; 205 (1.1) NG-67, 20 м, Скалисти места след Китен, 06.06.2006, SOM 163887; 208 (1.1) NG-59, 25 м, Вилно селище Созопол, 03.07.2004, SOA 59239; 209 (17.3) LF-69, 452 м, По реката при Момчилград, 21.06.2003, SOA 59242; 204 (17.1) GM-22, 725 м, По р. Места при с. Господинци, 17.06.2005, SOM 163912; 203 (18) KG-99, 300 м, Около яз. Пясъчник, 22.06.2003, SOA 56407;
<i>R. pulcher</i> L. ssp. <i>woodsii</i> (De Not.) Arcang. 212 (17.3) 194 м., MF-28, Между Одринци и Сив кладенец, 14.07.2005, SOA 56931; 213 (1.1) NG-85, 40 м, Между Ахтопол и Синеморец, 03.07.2004; SOA 57068; 214 (1.1) NG-85, 20 м, Устието на р. Силистар, 03.07.2004, SOM 163978;
<i>R. pulcher</i> L. ssp. <i>raulinii</i> (Boiss.) Rech. f. 210 (11) MF-38, 170 м, Между с. Скрът и Ключ, 18.06.2005; SOA 56927 215 (1.1) NG-85, 40 м, Сред Ахтопол покрай дъбови гори, 03.07.2004, SOA 57067;
<i>R. pulcher</i> L. ssp. <i>anodontus</i> (Hauskn.) Rech. f. 211 (1.1) NG-84, 10 м, Резово – сухи тревисти места, 15.07.2005, SOA59089.

Гел-електрофореза. ISSR-PCR продуктите са смесени с 5 µl буфер за нанасяне и са разделени на 1,5 % агарозен гел съдържащ 0,5 µg/ml етидиев бромид, при напрежение 3,5 V/cm. Използван е ДНК маркер (Fermentas GeneRuler#SM0311) 1kb – 6 µl. Получените продукти са визуализирани посредством UV светлина.

Молекулярно-биологичните изследвания са проведени в лабораториите по Молекулярна биология към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ към ПУ „Паисий Хилендарски“.

Анализ на данни. Амплифицираните недвусмислени линии са отбелязани като молекулни маси, посредством програмата GelPro и след това ръчно са преразпределени в класове от молекулни маси за съставяне на матрица според отсъствие/присъствие на бандове. Получените полиморфни ивици са групирани в матрици и подложени на кластер-анализ с програмен пакет PAST (HAMMER *et*

al., 2001), като дендрограмите са оценени според консервативността на праймерите. Матриците от евклидови разстояния на всички резултати са сумирани на база таксономична значимост на комплементарните последователности:

$$D_s = \frac{D_1 10^{r_1} + \dots + D_n 10^m}{10^n},$$

където:

$D_{1..n}$ – евклидово разстояние между две проби с използване на всеки праймер;

$r_1 \dots r_n$ – ранг на консервативност на праймера, получен в хода на изследването;

n – брой използвани праймери.

Рангът r се определя от нивото на разделяне. Най-висока значимост ($r = n-1$) е дадена на праймера, който разделя пробите на познатите подвидове. Най-ниска значимост е дадена на ($r = 0$) е дадена на праймера, който не води до до познато групиране. Изчислените стойности са въведени в нова диагонална матрица на разстоянията и са използвани за конструиране на кладограма с помощта на T-Rex 3.0a1 (Vladimir Makarenkov, University of Quebec in Montreal) с използване на метода Neighbour joining, която е проявена с PhyloDraw.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Теренните проучвания показват, че *R. pulcher* subsp. *pulcher* е разпространен в цялата страна като плевелен и синантропен вид, често в поксерофитни местообитания. Кръстопътното географско положение и разнообразният релеф на страната ни, определят богат набор от екологични ниши, което е причина процесът на увеличаване на таксономичното разнообразие да продължава и до днес. Свидетелство за това е вторичното проникване на видове през последните десетилетия, а именно *R. pulcher* subsp. *divaricatus* и *raulinii*, а авторските проучвания доведоха до установяването и на *R. pulcher* subsp. *anodontus* за флората на България. Последният подвид е известен за флорите на Кипър, Гърция и Турция (откъдето вероятно е проникнал у нас) и районите на югозападна Азия – Ирак, Иран, Кавказ (RECHINGER, 1932). У нас е локализиран до момента наредко в най-южната част на Черноморско крайбрежие – ксерофитни, тревисти местообитания край с. Резово. Установеното у нас находище ограничава ареала на подвида в северна посока.

Определителен морфологичен ключ

1. Валвите с 4-9 неравномерни зъбчета по-дълги от 1 мм. Страничните разклонения на съцветието къси, разперени и преплетени. Обикновено голи растения.....2

1*. Валвите с няколко равномерни зъбчета, дълги до 0,5-0,8 мм. Страничните разклонения на съцветието дълги и непреплетени. Основата на

стъблата и долната повърхност на приосновните листа с прости къси власинки.....3

1. Отделни зъбчета на валвите с дължина до 3-3,5 мм.
.....**subsp. raulinii** (Boiss.) Rech. f.

2*. Отделни зъбчета на валвите с дължина до 1,5-2 мм..... **subsp. pulcher**

3. Валвите 5,2 – 5,8 мм дълги, 4,2 – 5,2 мм широки, с приблизително еднакви дължина и ширина, закръглени; ръбовете с равномерни зъбчета от основата почти до върха, 6–8 на брой, 0,5-0,8 мм дълги.....**subsp. woodsii** (De Not.) Arcang.

3*. Валвите 4,8-5,6 мм дълги, 3-3,5 мм широки, по-дълги отколкото широки, триъгълни; ръбовете целокрайни или неясно, неравномерно назъбени, близо до основата, отделни зъбчета до 0,5 мм дълги
.....**subsp. anodontus** (Hauskh.) Rech. f.

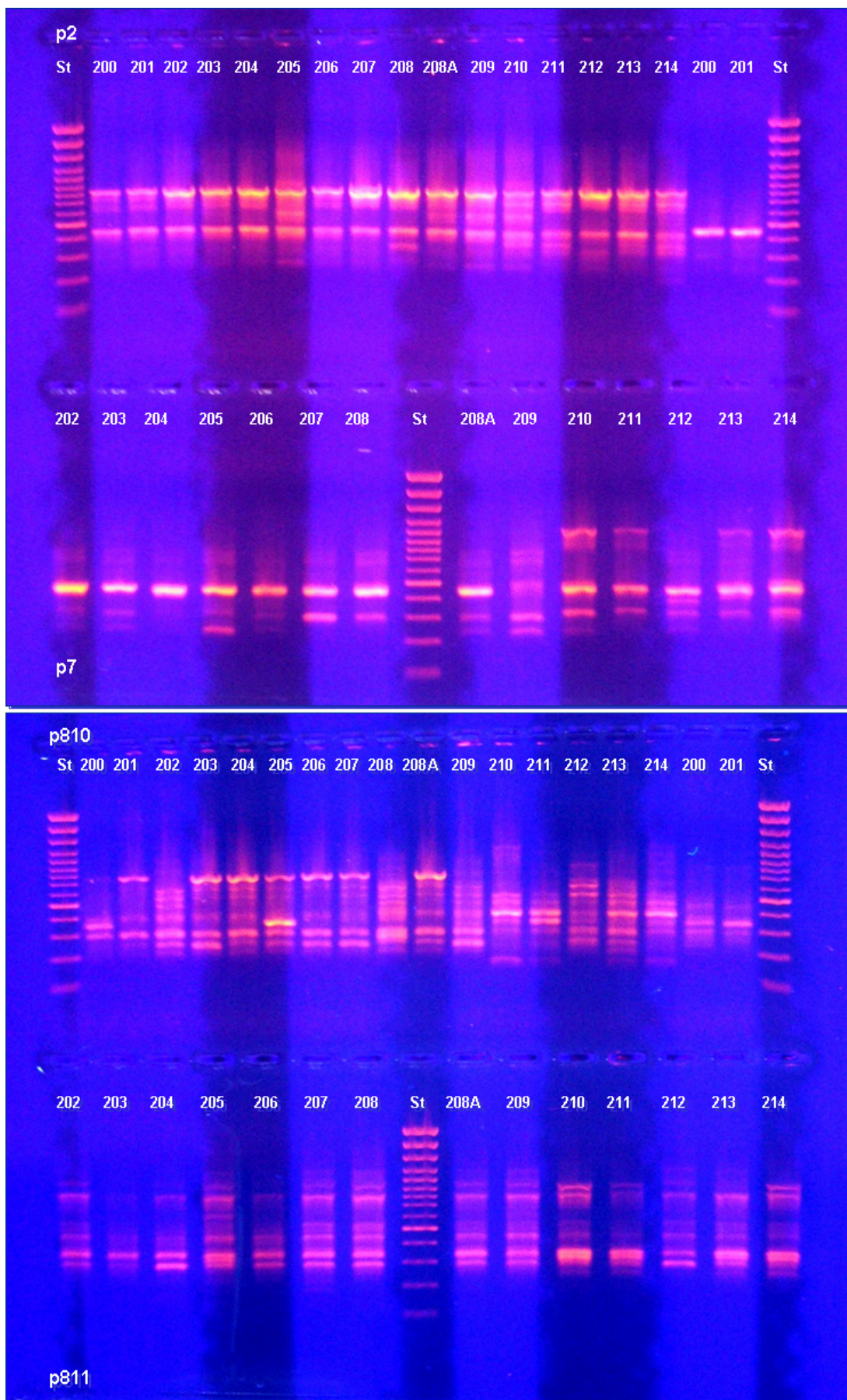
ISSR продуктите получени с проби от отделните подвидове са представени на Фиг. 1. Полиморфните ивици са използвани за построяване на дендрограма представяща различията между подвидовете на *R. pulcher*. В зависимост от използваните праймери, изследваните индивиди се групират в подвидове и популации.

Типовете праймери и масите на получените фрагменти са представени в Таблица 2. При търсене на съответствие с получените резултати по други методи, най-добро разделяне и групиране в изследваната група се демонстрира от разпределението на продуктите от p810 и p2, което предполага, че последователностите им са комплементарни на най-консервативните участъци в ДНК на *R. pulcher*. Полиморфните ивици са използвани за построяване на дендрограма, представяща различията между подвидовете в *R. pulcher*. ISSR продуктите, получени с проби от отделните подвидове са разделени по подобен начин, като общият вид на геловите е представен на Фиг. 1.

На базата на изложените резултати и в зависимост от видимостта на бандовете, е даден ранг на значимост за всеки един от използваните праймери (Таблица 2). По този ранг, от евклидовите разстояния при всеки праймер, са преизчислени различията между изследваните проби.

Таблица 2. Получени фрагментни класове, молекулни маси на PCR – фрагментите и рангове на значимост. Ранговете на значимост са получени след кластер-анализ.

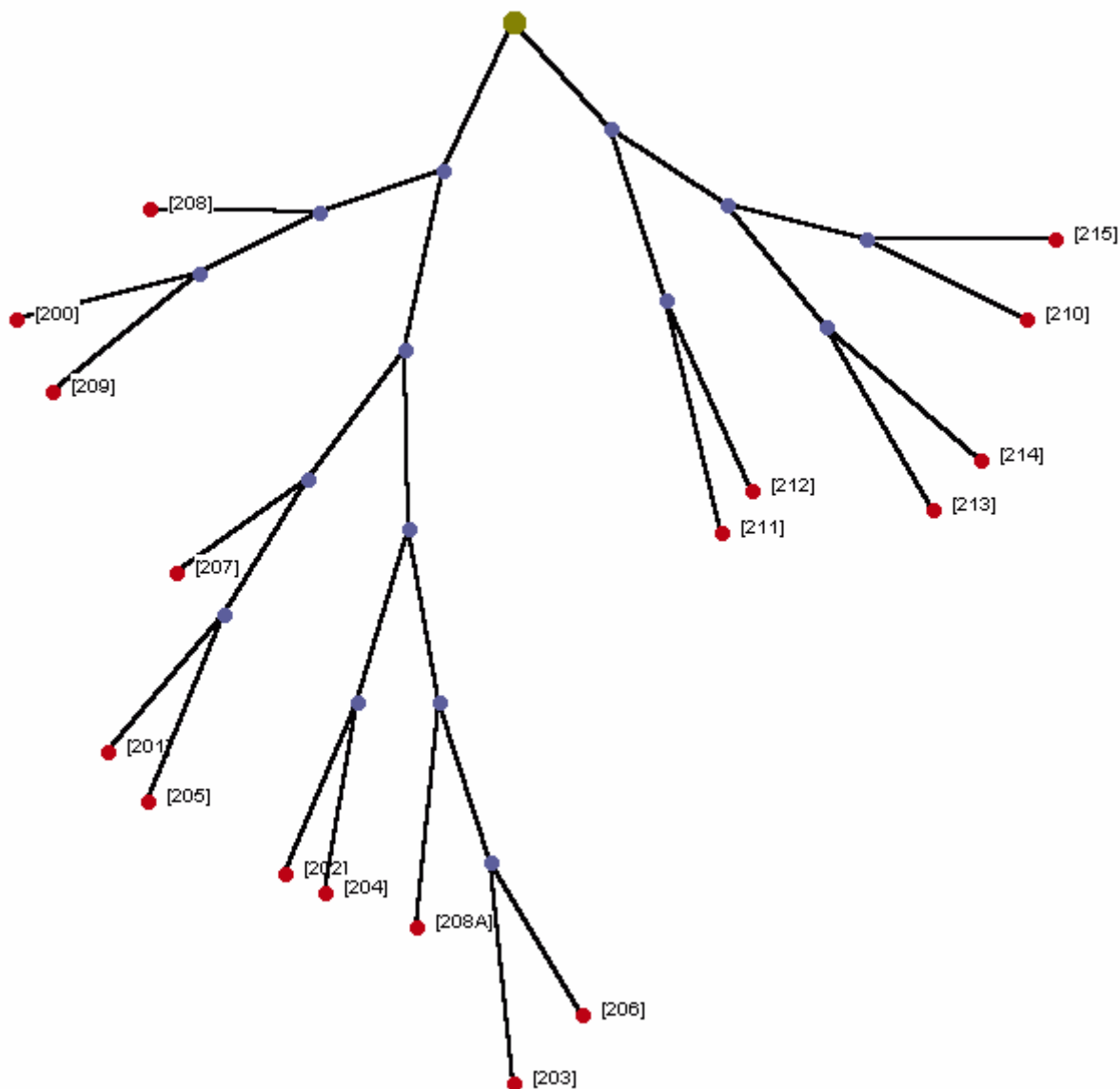
праймер	брой класове	фрагменти, kВ (min-max)	ранг
p2	17	383 – 3882	1
p7	14	526 – 4333	2
p810	20	457 – 4842	3
p811	19	305 – 6875	0



Фиг. 1. Разделяне на ISSR продуктите на 1.5 % агарозен гел.

Получената обединена матрица е използвана за построяване на обобщена кладограма (Фиг. 2).

Полиморфните ивици са използвани за построяване на дендрограма представяща различията между подвидовете на *R. pulcher*. ISSR продуктите, получени с проби от отделните подвидове са разделени по подобен начин, като общият вид на геловите е представен на Фиг. 1.



Фиг. 2. Обобщена кладограма, резултат от групиране на евклидовите разстояния, получени при групиране на PCR-продукти от четирите използвани праймера, според ранга им на значимост.

Приложеният метод в зависимост от използваните праймери групира изследваните проби в подвидове и популации. Резултатите показват ясно разграничаване на пробите по подвидова принадлежност.

Обособяват се два кластера (Фиг. 2) – с номера от 200 до 209 и втори, с номера 210 до 215. Проби с номера от 200 до 209 принадлежат на *R. pulcher* subsp. *pulcher*. Популациите от типичния подвид се групират в отделен кластер, който се разграничава от останалите подвидове. При subsp. *pulcher* се наблюдава висока изменчивост. Образците от Западни Родопи (207, 209) и Черноморско крайбрежие (200, 205, 208, 208А) попадат в различни групи – това се наблюдава при продуктите от използваните праймери (Фиг. 1). Този факт не е свързан с дискретни морфологични различия. Групирането на популации, произхождащи от различни флористични райони, подсказва, че полиморфизмът вероятно е свързан с обмен на гени, поради доказаните хибридни взаимоотношения в изследваната група. Въпреки високата изменчивост типичния подвид заема дивергентна позиция от останалите таксони (Фиг. 2).

Проба 210 и 215 принадлежат към *R. pulcher* subsp. *raulinii*. Популациите от Черноморие и Беласица оформят дискретна група (Фиг. 2). Подвидът се обособява в самостоятелен кластер, което корелира с диференциацията му по морфологични и метрични белези. Проби с номера 212, 213, 214 са от популации на *R. pulcher* subsp. *woodsii*. Образците от Черноморско крайбрежие (213 и 214) се групират в отделен кластер и ясно се разграничават от останалите подвидове. Една от популациите на subsp. *woodsii* (212) от Западни Родопи показва малки различия с останалите образци от същия подвид и се групира с PCR – продукта на *R. pulcher* subsp. *anodontus* (211). Вероятна причина за това са близките морфологични белези между двата подвида, а също и факта, че в изследването е включена една популация от subsp. *anodontus*. Най-ясно изразен полиморфизъм по отношение на молекулните маси се наблюдава при разделяне на PCR – продуктите с р810 (Фиг. 1). Морфологично подвидът е ясно диференциран от останалите подвидове на *R. pulcher*.

Високото различие в *R. pulcher* чрез използване на PCR – продукти от различни популации в страната, потвърждава вътревидовата изменчивост и съществуването на 4 подвида (subsp. *pulcher*, *woodsii*, *raulinii* и *anodontus*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото проучване демонстрира успешно прилагане на класически морфологичен подход и съвременни молекулярни методи. Получените ивици от ISSR продукти, са с ясно изразен полиморфизъм. Кластерният анализ на резултатите показва таксономично значимо групиране в четири основни кластера, съответстващи на четирите изследвани подвида на *R. pulcher* – subsp. *pulcher*, *woodsii*, *raulinii* и *anodontus* в българската флора. Вътревидовият полиморфизъм при *R. pulcher*, кореспондира с различния характер на разпределение на нуклеотидни последователности при полиморфните варианти.

Методът може успешно да бъде приложен и при други критични, полиморфни групи от род *Rumex* s. str.

БЛАГОДАРНОСТИ

Проучването се осъществява с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“, проект ВУ-Б 10/5 и проект ИФС-Б-606.

ЛИТЕРАТУРА

- ВЪЛЕВ СТ. 1966. Род *Rumex* L.- В: Йорданов, Д. (ред.) – Флора на НР България, том. 3, София, с. 188-216.
- ДЕЛИПАВЛОВ Д. 2003. *Rumex* L. – В: Делипавлов, Д., Чешмеджиев, Ил. (ред.), М. Попова, Д. Терзийски & И. Ковачев. Определител на растенията в България, София, с. 150-152.
- СТОЯНОВ Н., Б. СТЕФАНОВ. 1924. *Rumex* L. – В: Флора на България, София, том. 1, с. 335-337.
- СТОЯНОВ Н., Б. СТЕФАНОВ. 1933. *Rumex* L. – В: Флора на България, София, том. 2, с. 315-318.
- СТОЯНОВ Н., Б. СТЕФАНОВ. 1948. *Rumex* L. – В: Флора на България, София, том. 3, с. 344-350.
- СТОЯНОВ Н., Б. СТЕФАНОВ, Б. КИТАНОВ. 1966. *Rumex* L. – В: Флора на България, София, том. 4: 311-315.
- AKERROYD J., K. RECHINGER. 1993. *Rumex* L. – In: Tutin *et al.* (eds.), *Flora Europaea*, Cambridge Univ. Press. Vol. 1, ed. 2: 99-107.
- BORNET B., M. BRANCHARD. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 209-215.
- CULLEN J. 1967. *Rumex* L. – In: Davis, P.H. (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, Vol. 2: 281-293.
- HAMMER O., D. HARPER, P. RYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontologia electronica*. 4(1): 9.
- HAYEK A. 1924. *Rumex* L. – In: *Prodromus Florae Peninsulae Balcanicae.*, 1: 102 – 109.
- NAGAOKA T., Y. OGIHARA. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and applied genetics*, 94: 597-602.
- RAYCHEVA TZ., E. TEMSCH, D. DIMITROVA. 2007. *Rumex pulcher* s. l. in Bulgarian flora – distribution, morphology, and karyology. – *Phytol. Balcan.*, 13(3): 321-330.
- RECHINGER K. 1932. Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Rumex*. I. – *Beih. Bot. Centralbl.*, Abt. 2, 49(1): 1-132.
- TSUMURA Y., K. OHBA, S. STRATUS. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). – *Theoretical and applied genetics*, 92:40-45.
- ZIETKIEWICZ E., A. RAFALSKI, D. LABUDA. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. – *Genomics*, 20: 176-183.

**MOLECULAR–TAXONOMIC STUDY OF THE INTRASPECIFIC
MUTABILITY OF *R. pulcher* L. (*Rumex* L., *Polygonaceae* Juss.)
IN BULGARIA**

*Tsvetanka G. Raycheva*¹, *Iliia D. Denev*²,
*Desislava Dimitrova*³, *Kiril H. Stoyanov*¹

¹ *Agricultural university – Plovdiv, E-mails: raicheva@abv.bg; orobanche@abv.bg*

² *University of Plovdiv “St. P. Hilendarski”, E-mail: iliden@uni-plovdiv.bg*

³ *Institute of Botany – BAN, E-mail: desco@bio.bas.bg*

(Summary)

Four subspecies of *Rumex pulcher* occur in Bulgaria are studied – subsp. *pulcher*, *woodsii*, *raulinii*, *anodontus*. *Rumex pulcher* subsp. *anodontus* is new, recently recorded subspecies for the Bulgarian flora. We applied a combination of morphological and molecular taxonomy (ISSR) methods. The amplified as a result of PCR-ISSR reaction unambiguous bands are scored by molecular weights and redistributed in classes to compile a presence/absence matrix. The dendrograms are based on the results obtained by each primer used. They displayed a specific grouping in subspecies and populations. Because the method is free of environment influence this approach could be used for better understanding of taxonomic position of taxa and relationships in genus *Rumex* s. str.