



ТЕСТВАНЕ НА ISSR МАРКЕРИ ПРИ *RUMEX ACETOSELLA* COMPLEX В БЪЛГАРИЯ

ЦВЕТАНКА РАЙЧЕВА, ИЛИЯ ДЕНЕВ

TESTING OF ISSR MARKERS IN *RUMEX ACETOSELLA* COMPLEX IN BULGARIA

TSVETANKA RAYCHEVA, ILIYA DENEV

Abstract

Nine samples of *Rumex acetosella* complex in Bulgaria were studied using ISSR markers. The taxa were defined on the basis of their specific morphological features. Total genomic DNA was extracted from fresh leaves and used as template for ISSR – PCR. Six ISSR primers from the collection of the University of British Columbia (Nucleic Acid-Protein Service Unit, UBC Primer Set #9) were used to amplify polymorphic microsatellite loci. The PCR reactions were carried out in Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). To obtain uniformity in PCR reactions we used PCR master mix (Fermentas, Cat No K0171). The amplified unambiguous bands were scored by molecular weights and redistributed in classes to compile a presence/absence matrix. The dendrograms were based on the results obtained by each of primers used. Cluster and principle analysis showed that the population can not be separated significantly. There is not relationship between morphological and genetic distance of *R. tenuifolius* and *R. acetosella*. We suggest the distribution and relationship between members of this group require further study and reassessment of the taxonomic status.

Key words: *Rumex acetosella* complex, ISSR markers, morphological features, taxonomy

ВЪВЕДЕНИЕ

Rumex acetosella s. l. включва двудомни таксони със специфични механизми за определяне на пола. Групата е изключително разнообразен и сложен полиплоиден комплекс, който представлява предизвикателство като таксономичен казус пред таксономи и изследователи. Таксоните в агрегатния комплекс са възприемани с ранг вид, подвид, разновидност или форма и до днес са обект на непрекъснати таксономични ревизии. Притежават близки морфологични характеристики и различни нива на пloidност - диплоидно, тетраплоидно, хексаплоидно и октоплоидно. Löve (1943) предполага, че всяко пloidно ниво представлява самостоятелен вид, свързан с определена

морфология. База за разграничаването на таксоните в световната таксономична литература са вегетативните характеристики на листата и разклоняването на метлицата. Изследванията на Nijs (1984, 1985) предполагат развитието на две големи еволюционни линии в този полиплоиден комплекс – първичен в Западно Средиземноморие и вторичен в Източно Средиземноморие. Според тази хипотеза полиплоидните раси са възникнали спонтанно (и все още се появяват) и независимо от различни древни прародителски популации. Този комплекс, с изключение на по-далечен роднина от Арктика - *R. graminifolius*, вероятно произхожда и се развива най-вече в Южна Европа и Югозападна Азия. Някои раси на *R. acetosella* са разпространени почти в целия свят, често напълно натурализирани.

В екологичен план групата включва пластични синантропни космополити, в много райони на света са включени в списъка на инвазивните и плевелни видове. Таксоните от групата се срещат при изключително разнообразни екологични условия, но най-често по места където естествената флора е обеднена в резултат на антропогенно въздействие.

В българската флора са разпространени *R. tenuifolius* (Walr.) Å. Löve и агрегатната група *R. acetosella* L., която включва 4 разновидности (Вълев 1966).

Целта на изследването е да се тестват ISSR маркери, позволяващи изясняване на взаимоотношенията между таксоните от *R. acetosella* complex в България, както и оценка на използваните в определителните ключове белези за таксономично групиране.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани са 9 образци, принадлежащи към *R. acetosella* s. l., събрани от естествени находища през 2010 г., от различни райони в Южна България. Материалите са определени по диагностични описания и определителни ключове във Флора на Р България и съвременни европейски издания (Вълев 1966; Rechinger & Akeroyd 1993 и Snogerup 2000). Ваучерни хербарни образци са депозиранни в Хербариума към Аграрен университет – Пловдив - SOA (Таблица 1).

Свежи листа от образците бяха замръзени и стрити на прах с течен азот. За изолиране на ДНК са използвани по 100 мг от образец. Екстракция беше проведена с DNAesy Plant Mini кит на Qiagen следвайки оригиналния протокол към кита. Използвани са ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) праймери. След предварително изследване са подбрани за амплификации 6 подходящи олигонуклеотидни праймера, с обща формула $(MY)_6RR$ (с по два арбитрарни пуринови нуклеотида в 3'-края). За оптимизиране на условията са тествани няколко PCR параметъра, включително концентрациите на тоталната ДНК (50-250 ng / реакция) и праймера (10-100 pmol / реакция) и брой цикли (25-40). При оптимално определени условия са проведени амплификации в 250 µl PCR епруветки съдържащи 2 µl (150 ng) ДНК матрица; 1 µl праймер (100 nmol.l⁻¹ концентрация); 25 µl PCR мастър микс (Fermentas, Cat No K0171) и 22 µl свободна от ДНК-ази вода (доставена с кита). PCR-реакциите са провеждани в

PCR апарат Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) при използване на следната програма: начална денатурация на ДНК при 94° C – 5 min; 35 цикъла при 94° C – 1 min; 50° C – 1 min и 30 s; 72° C – 3 min и финално удължаване при 72° C за 2 min. PCR продуктите са смесени с 5 µl буфер за нанасяне (Fermentas #R0611) и разделяни посредством 1.5% агарозен гел, съдържащ 0.5 µg/ml етидиев бромид (крайна концентрация). Използван е 1X TAE буфер и електрическо напрежение 3.5 V/cm. Размерът на продуктите е определен чрез сравняване с 1 kb ДНК маркер (Fermentas GeneRuler#SM0311). Цифровите снимки са 4 Mpix, фотографирани на UV-светлина. Молекулните маси на фрагментите са изчислени с програмата GelPro и са преразпределени в класове, в които липсата (0) и наличието (1) на характерни бандове са маркирани като булеви матрици. За оценяване на резултатите от всеки маркер са построени дендрограми с програмата PAST (Hammer & al. 2001).

Таблица 1. Ваучерни образци на изследваните проби от *Rumex acetosella* complex и морфологични белези на листата

Таксон, морфология на листата	№, флористичен район, УТМ координати, надм. височина, локалитет, ваучерен номер
<i>Rumex acetosella</i> L. var. <i>multifidus</i> (L.) DC. Копиевидни петури с над 4-5 разперени дяла	ASL09 (18) 35TKG68, 75 м, Между Септември и с. Бошуля, 30.05.2010 г., SOA s.n.
	ASL33 (17.3) 35TMG00, 142 м, Преди Маджарово, з. м. Кован кая, 08.6.2010, SOA s.n.
<i>Rumex acetosella</i> L. var. <i>acetosella</i> Копиевидни петури с 1 до 2 дяла	ASL32 (17.3) 35TLG33, 385 м, Преди с. Новаково, 07.6.2010, SOA s.n.
	ASL34 (17.2) 35TLG02, 1070 м, Скали край Чепеларе, 04.7.2010, SOA s.n.
	ASL35 (17.2) 35TLG02, 1237 м, Скали преди с. Зорница, 04.7.2010, SOA s.n.
	ASL36 (17.2) 35TLG13, 1636 м, Тревисти места около х. Пашалийца, 04.7.2010, SOA s.n.
	ASL37 (17.1) 35TKG64, 1084 м, Над Батак, 03.7.2010, SOA s.n.
<i>Rumex acetosella</i> L. var. <i>integrifolius</i> Wallr. Тънки, нишковидни петури, с цял дял	ASL38 (5.2) 35TKH63, 1254 м, Златишки проход, над с. Църквище, 08.7.2010, SOA s.n.
<i>Rumex tenuifolius</i> (Walr.) Á. Löve Нишковидни петури, без приосновни дялове	ASL39 (16.1) 35TKH71, 915 м, Панагюрски колонии, 08.7.2010, SOA s.n.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Таксоните от изследваната агрегатна група принадлежат към подрод *Acetosella* (Meissn.) Fourr., възприеман от някои автори като самостоятелен

род. Групата включва таксони изравнени в морфологично отношение, редица автори предлагат алтернативни определителни ключове, но до сега разграничаването на видовете в различните таксономични източници и класификационни схеми не се основава на еднозначни критерии (според едни автори определящ е хромозомния брой и нивото на пloidност Löve (1983), а според други морфологията и географското разпространение (Nijs 1985; Rechinger & Akeroyd 1993). Високата изменчивост във формата на листата и метлицата (Harris 1973) са причина опростените определителни ключове, основани на тези белези да се приемат като недостатъчно надеждни. Разграничаването на разновидностите на *R. acetosella* - var. *acetosella*, var. *integrifolius* Wallr. и var. *multifidus* (L.) DC. се базира на броя на страничните дялове на приосновните листа. Разделянето на ДНК фрагменти чрез ISSR маркери позволява групиране по видове, подвидове и популации.

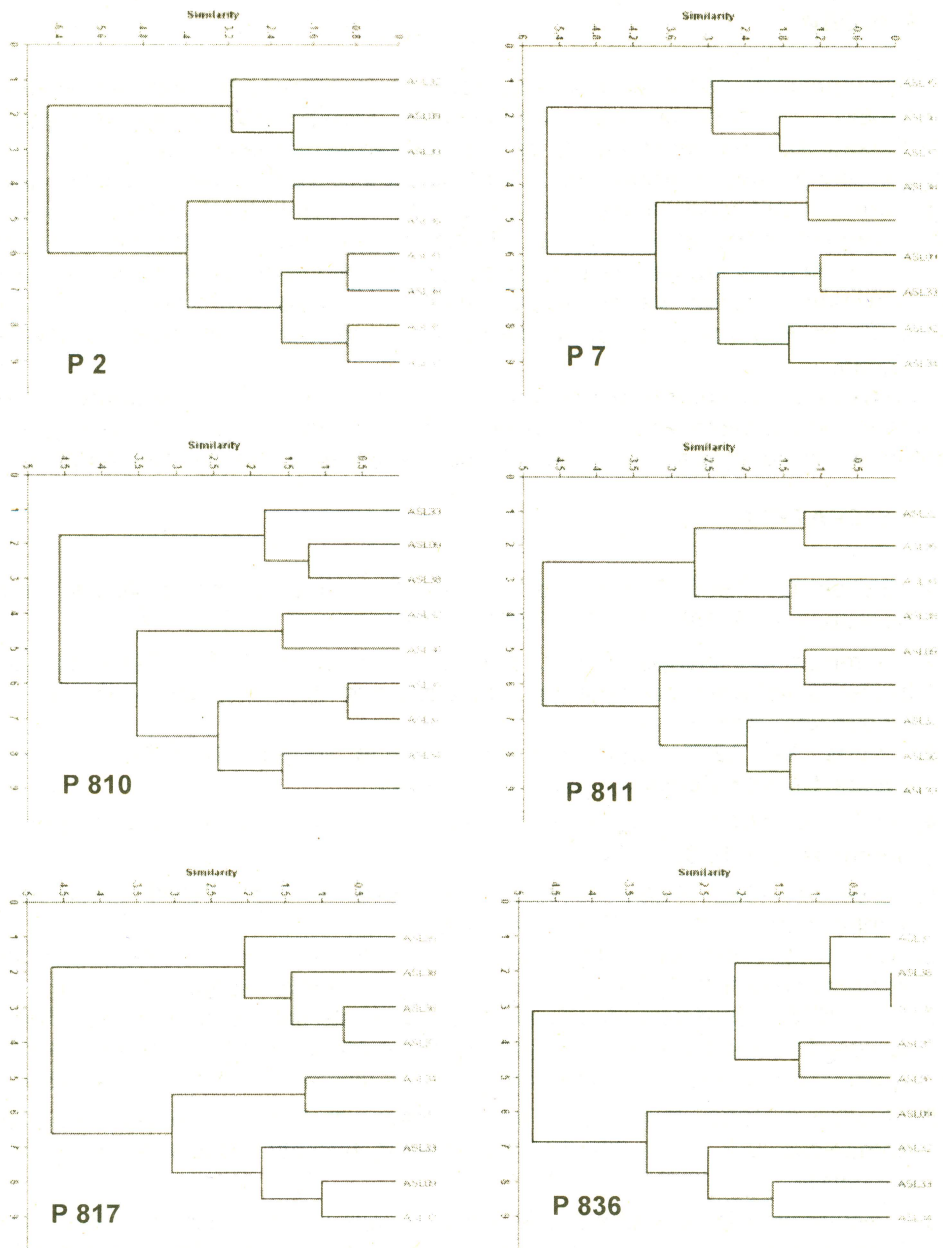
Анализът на разпределението на полиморфните ивици на ДНК-продукти, получени чрез ISSR показват високи нива на полиморфизъм и при шесте използвани праймера (фиг. 1). В съответствие с морфологичните резултати най-добро разделяне се наблюдава при продуктите от праймер 810 - изследваните образци се групират в два клада, единият ясно разграничава типичната разновидност на *R. acetosella* (№ 32, 34, 35, 36, 37), в същата група макар и с по-голямо евклидово разстояние се включва и *R. tenuifolius* (№ 39). Въпреки тясната връзка между тях, няма подкрепа основана на морфологични особености. Образците с наделени дялове на приосновните листа, определяни от автори като *multifida* (№ 09, 33) с ранг подвид, разновидност или форма се групират в общ кластер с продукти на образци без изрязани дялове на листата (var. *integrifolius* № 38). Резултатите показват, че пробите с ланцетни цели листа (възприемани като вид *R. tenuifolius*) имат по-голямо сходство с таксоните с копиевидни петури (определяни като типична разновидност *R. acetosella* var. *acetosella*).

Нашето изследване не е в състояние да изясни таксономичната позиция на членовете, поради недостатъчен брой тествани проби. Но идентифицира необходимостта от ревизиране на таксономичния ранг в *R. acetosella* aggr., който при нашите видове не е преразглеждан от 1966 г.

Методът дава полезна, алтернативна информация за проверка и сравнение с класификацията, основана на морфологични белези.

Приликите между диворастващите популации на комплекса, открити с ISSR, показват, че таксоните притежават близко родство, но все още с ниска степен на генетична дивергенция, в сравнение с интрепретацията на класическата морфологична таксономия. Основание за това твърдение ни дава липсата на положителна връзка между обособеността на популациите и пространствената изолация, което се доказва от нееднозначно групиране на изследваните популации при шесте използвани праймера (Фиг. 1).

Предвид широкия спектър от екологични условия (ксерофитни, мезофитни и сциофитни) може да се предположат процеси на локална адаптация на различни генотипове като предпоставка за протичане на съвременно видообразуване.



Фиг. 1. Кластер анализ на резултатите от PCR-реакции с използваните 6 праймера (P).

ИЗВОДИ

Изследваните таксони от *R. acetosella* показват високи нива на генетична изменчивост и сложни взаимоотношения. Морфологията на листата и разклоняването на метлицата са конвергентни белези, което ги прави ненадеждни за таксономията на *R. acetosella* s. l. Трябва да се търсят други признаци за детерминиране на таксономични единици в тази сложна в таксономично отношение група. Разпространението и връзките между членовете на агрегата се нуждаят от допълнително проучване и преоценка на таксономичния статус. Не се потвърждава генотипната отдалеченост на *R. acetosella* от *R. tenuifolius*, което поставя под съмнение видовият статус на последния.

Резултатът от нашето изследване показва групиране на таксоните, което подкрепя класификационната схема на Prodan (1952), според която изменчивостта в агрегатната група *R. acetosella* е възприета с ранг форма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вълев, Ст. 1966. Род *Rumex* L. – В: Йорданов, Д. (ред.), Флора на НР България, Т. 3: 188-216. Изд. БАН, София.
2. Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontol. Electronica*, 4(1): 9
3. Harris, W. 1973. Leaf form and panicle height variability in *Rumex acetosella*. *New Zealand J. Bot.*, 11: 115-144.
4. Löve, Å. 1943. Cytogenetic studies on *Rumex*, subgenus *Acetosella*. – *Hereditas* (Lund), 30: 1-136.
5. Löve, Å. 1983. *Polygonaceae*. – In: Löve, Å. (ed.), IOPB chromosome number reports LXXX. – *Taxon*, 32(3): 511.
6. Nijs JCM. 1984. Biosystematic studies of the *Rumex acetosella* complex, Polygonaceae VIII. A taxonomic revision. *Feddes Repertorium* 25, 43-66.
7. Nijs JCM, Sorgdrager K, Stoop. 1985. Biosystematic studies of the *Rumex acetosella* complex IX. Cytogeography of the complex in the Iberian peninsula Spain Portugal and taxonomic discussion. *Botanica Helvetica*, 95: 141-156.
8. Prodan, I. 1952. *Rumex* L. – In: Săvulescu, T. (ed.), Fl. Reipubl. Popularis Romanicae. Vol. 1, pp. 380-434. Editio Acad. Reipubl. Popularias Romanicae, Bucharest.
9. 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.
10. Snogerup, S. 2000. Genus *Rumex* L. – In: Jonsell, B. (ed.), *Flora Nordica*. Vol. 1: 281-329. Bergius Foundation, Stockholm.