



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



КАТЕДРА
„БОТАНИКА И МЕТОДИКА НА ОБУЧЕНИЕТО ПО БИОЛОГИЯ“

Красимир Тихомиров Тодоров

БИОСИСТЕМАТИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА РОД *CARDUUS* L. (ASTERACEAE) В
БЪЛГАРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна
степен „Доктор“

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**;
Професионално направление: **4.3. Биологически науки**;
Докторска програма: **Ботаника**

Научни ръководители:

Проф. д-р Иванка Жечева Димитрова-Дюлгерова

Проф. д-р Румен Димитров Младенов

Пловдив, 2018 г.



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА

„БОТАНИКА И МЕТОДИКА НА ОБУЧЕНИЕТО ПО БИОЛОГИЯ“

Красимир Тихомиров Тодоров

**БИОСИСТЕМАТИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА РОД *CARDUUS* L.
(ASTERACEAE) В БЪЛГАРИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна
степен „Доктор“

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и
информатика**; Професионално направление: **4.3. Биологически науки**;
Докторска програма: **Ботаника**

Научни ръководители:

Проф. д-р Иванка Жечева Димитрова-Дюлгерова

Проф. д-р Румен Димитров Младенов

Пловдив, 2018 г.

Данни за дисертацията: 157 страници, 17 таблици и 54 фигури. В литературата са цитирани 284 източника (17 на кирилица и 267 на латиница).

Дисертацията е изработена в Катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Ботаника и МОБ“ при Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“ (Протокол № 122 от 16.03.2018 г.)

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 18.05.2018 г. от 11 ч. в 15 аудитория на Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“ (гр. Пловдив, ул. Тодор Самодумов № 2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Научно жури:

Проф. дбн Илия Василев Чешмеджиев (рецензент)

Доц. д-р Цветанка Георгиева Райчева (рецензент)

Проф. дбн Димитър Асенов Иванов (становище)

Доц. д-р Детелина Стоянова Белкинова (становище)

Проф. д-р Иванка Жечева Димитрова-Дюлгерова (становище, председател)

Автор: Красимир Тихомиров Годоров

Тема: Биосистематично проучване на род *Carduus* L. (Asteraceae) в България

Съкращения, използвани в автореферата

Блс	Беласица планина
В	Витоша
Вт	Витошки район
Д	Декоративно растение
ДМ	Долината на р. Места
Др	Дунавска равнина
Згп	Западни гранични планини
Зн	Знеполски район
Кон	Конявска планина
Л	Лечебно растение
Лоз	Лозенска планина
Люл	Люлин планина
М	Медоносно растение
Осг	Осоговска планина
П	Плевелно растение
Пн	Пирин планина
Прб	Предбалкан
Рд	Родопи
Рл	Рила планина
Сг	Средна гора
СЕМ	Сканираща електронна микроскопия
Сж	Странджа
СиБ	Североизточна България
Слв	Славянка планина
СМ	Светлинна микроскопия
Сп	Стара планина
Стд	Струмска долина
Сф	Софийски район
Трн	Горнотракийска низина
Тхр	Тунджанска хълмиста равнина
Чм	Черноморско крайбрежие
IUCN	Международен съюз за защита на природата
⊗	Балкански ендемит
●	Български ендемит

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Представителите на род *Carduus* L. (Магарешки бодил) са известни като медоносни, хранителни, плевелни, но също и лечебни растения, намиращи приложение в народната медицина. Родът е представен с над 90 вида в световен мащаб, естествено разпространени и интродуцирани. От срещаните се представители във флората на България преобладават рудералните и широко разпространени видове, но присъстват също ендемични и консервационно значими видове.

В България липсват задълбочени таксономични проучвания на рода, а същевременно в наши дни се наблюдава засилен интерес към фитохимичния състав и медицинското приложение на видове магарешки бодил.

Допълването на знанията върху морфологичните, анатомичните и таксономично значимите белези при видовете на род *Carduus* неминуемо би улеснило тяхното по-лесно разграничаване и определяне.

През последните години се наблюдава тенденция към засилване значението на палиноморфоложките и молекулярно-генетичните изследвания. Резултатите от тези проучвания се прилагат успешно в ботаниката (в т. ч. и при видове на род *Carduus*) за определяне на родствени връзки между таксоните.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

2.1. Биосистематични проучвания на род *Carduus*

Род *Carduus* L. принадлежи към подсемейство Carduoideae, триб Cardueae, подтриб Carduinae и включва около 90 едногодишни и многогодишни представители, разпространени естествено в Евразия, Северна Африка, Западна Азия и интродуцирани в Австралия и Америка (TAMAMSCHIAN, 1963; DAVIS, 1975; KADEREIT & JEFFREY, 2007, AZIZI ET AL. 2013). Таксономията и разграничаването на видовете от род *Carduus* L. са трудна и проблематична задача (DOGAN ET AL., 2007), поради морфологичното разнообразие и появата на хибридизация между видовете (TUTIN ET AL., 1976; DESROCHERS ET AL., 1988A, B). В българската флора родът е представен с 14 вида. От тях 5 ендемични (4 балкански – *C. kernerii* Simonkai subsp. *austro-orientalis*, *C. candicans* Waldst. & Kit. subsp. *globifer* (Velen.) Kazmi, *C. armatus* Boiss. & Heldr., *C.*

thracicus (Velen.) Hayek и 1 български ендемит – *C. rhodopaeus* Velen. (*C. adpressus*) – TUTIN ET AL. 1976; ДЕЛИПАВЛОВ И ЧЕШМЕДЖИЕВ 2003, PETROVA & VLADIMIROV, 2010. Във “Флора на България” (т. II, 1967-СТОЯНОВ, СТЕФАНОВ И КИТАНОВ) и “Определител на висшите растения в България” (КОЖУХАРОВ, 1992), се посочва и още един вид (*C. uncinatus* Vieb.), но той се нуждае от потвърждение. Видовете *Carduus rhodopaeus* и *Carduus thracicus* са с конзервационен статус и са включени, както в ЧЕРВЕНА КНИГА НА РЪБЪЛГАРИЯ (2015) с категории съответно: "застрашен - endangered" за *C. rhodopaeus* (Родопски магарешки бодил) и "уязвим - vulnerable" за *C. thracicus* (Тракийски магарешки бодил), така и в ЗАКОНА ЗА БИОЛОГИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ (2002). Видът *C. thracicus* присъства също така и в Червен списък на висшите растения в България (PETROVA & VLADIMIROV, 2009) с категория "уязвим - vulnerable", и в IUCN RED LIST OF THREATENED PLANTS (1997) с категория „рядък“. Той е сходен по хабитус с *C. hamulosus*, от който се различава основно с по-малките си кошнички (TUTIN ET AL. 1976). В ЗАКОНА ЗА ЛЕЧЕБНИТЕ РАСТЕНИЯ (2000) е включен вида *C. acanthoides* (Обикновен магарешки бодил). *Carduus nutans* L. групата е трудна в таксономично отношение, като е разделена от европейските ботаници на поне на 8 вида и 14 подвида, включени във FLORA EUROPAEA (1964-1980). Към тази група в нашата страна спадат видовете *C. nutans* (*C. nutans* subsp. *nutans*) и *C. thoermeri* Wienm. (syn. *C. lejophyllus* Petrovic).

2.2. Палиноморфоложки проучвания

Морфологията на полена е надежден таксономичен маркер за изясняване на родствени връзки между растенията, при проследяването на филогенията и произхода на отделни растителни групи (AYTUG, 1959). Първите важни проучвания за морфологията на прашеца на семейство Asteraceae са от WODENHOUSE (1926, 1928, 1935). Род *Carduus* е отделен като самостоятелен поленов тип, включващ две поленови групи от PUNT & HOEN (2009), при изследването на 7 вида от рода: *C. acanthoides* L., *C. crispus* L., *C. defloratus* L., *C. nigrescens* Villars, *C. nutans* L., *C. personata* L. и *C. tenuiflorus* Curtis.

2.3. Молекулярно-генетични проучвания

При растенията по-голяма част от филогенетичните проучвания се основават на гени и спейсри от генома на пластида (CATALAN ET AL. 1997; CLEGG 1993; OLMSTEAD & PALMER 1994; OLMSTEAD & REEVES 1995, SOLTIS ET AL. 1998). Анализите на ДНК последователността от SUSANNA

ET AL. (1995), както и ядрените и хлоропластни анализи (GARCIA-JACAS ET AL., 2002), потвърждават монофилетичния характер на триб Cardueae. ITS 1/2 регионите са сред най-популярните маркери за изучаване на филогенетични връзки в растителните и животински организми след 1994 г. Някои по-ранни проучвания чрез този метод доказват неговата значимост за хибридизацията и полиплоидността (BALDWIN 1992, BALDWIN ET AL. 1995, KIM & JANSEN 1994, RIESEBERG ET AL. 1990, RIESEBERG & SOLTIS 1991, RIESEBERG & WENDEL 1993, WENDEL ET AL. 1995). Данните за секвенциите предоставят информация за биоразнообразието на тясно свързани видове, филогенетичната история, полиплоидността, генетични връзки и други еволюционни въпроси (ALVAREZ & WENDEL 2003, MÖLLER & CRONK 1997). SUSANNA ET AL. (2006) показват селективната сила на ITS 1/2 молекулни маркери при изучаването на систематиката на триба Cardueae, към която принадлежи род *Carduus*.

2.4. Анатомио-морфологични проучвания върху сем. Asteraceae, в т.ч. и върху представителите на род *Carduus*

METCALFE & CHALK (1950) дават описание на общата анатомия на видовете от семейство Asteraceae. По-късно отново METCALFE & CHALK (1979, 1989), съобщават основните анатомични характеристики, които могат да се наблюдават при семейство Сложноцветни, а именно: присъствие на различни видове покривни и жлезисти трихоми; наличие на папили по долния листен епидермис; аномоцитен, анизоцитен и рядко хелиоцитен тип устичен апарат; наличие на хидатоди и хиподерма; хомогенен или хетерогенен мезофил, както и проводящи снопчета с паренхимна обвивка, съставена от големи клетки. Според тях покривните трихоми са различни в морфологично отношение, докато жлезистите са повече или по-малко структурно еднакви. Таксономичната стойност на листният епидермис при представителите на семейство Сложноцветни е разгледана от редица автори (PALMER & GERBETH-JONES, 1986; JAYEOLA ET AL., 2001; ADEDEJI & ILLON, 2004). Епидермалните структури се оказват важен белег за определяне границите на таксони от различни растителни семейства (METCALFE & CHALK, 1950, 1979; URNOF, 1962; ARAMBARRI & COLARES, 1993; STENGLEIN ET AL., 2003). Броят на устицата на листния епидермис се използва като индикатор за настъпили промени в околната среда (НИНОВА И ДУШКОВА,

1977, 1978А, 1978 Б; НИНОВА И ДР., 1984 А; SALGARE & ACHARECAR, 1990; CASE, 1994).

2.5 Кариологични проучвания

Редица проучвания дават информация за хромозомния набор на някои видове от род *Carduus* и показват тяхното значение при разграничаването им (ARANO, 1957; KAZMI, 1964; MENRA ET AL., 1965; FAVARGER, 1965; BORGEN, 1974; VAN LOON & DE JONG, 1978; VAN LOON & SNELDERS, 1979; CORRIAS & VILLA, 1980; DEVESA, 1980; GREMAUD, 1981; GHAFFARI, 1989; LÖVKVIST & HULTGARD, 1999; GEDIK ET AL. 2014, 2016). В България първи данни върху кариологията на род *Carduus* са публикувани от KUZMANOV ET AL. (1981, 1986, 1991). В хромозомен атлас на българската флора (KUZMANOV, 1993 е включена информация за 10 вида от род *Carduus*.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящата работа е биосистематично проучване на род *Carduus* L. в България и оценка на статуса на дискуссионни в таксономично отношение видове, чрез прилагане на класически и съвременни биологични методи.

Във връзка с тази цел бяха поставени следните **задачи**:

1. Теренни проучвания и събиране на материали от видовете на род *Carduus*, разпространени в България;
2. Палиноморфоложко проучване на българските представители от род *Carduus*;
3. Молекулярно-генетично проучване на род *Carduus*;
4. Морфологичен анализ и установяване на таксономично значими белези при българските видове от род *Carduus*;
5. Анатомичен анализ на листен епидермис, листна пластинка и стъбло при дискуссионни в таксономично отношение видове от род *Carduus*;
6. Кариологично проучване на дискуссионни в таксономично отношение видове от род *Carduus*;
7. Обсъждане на въпроси и вземане на решения относно таксономичния статус на видовете от род *Carduus*, разпространени в България.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. МАТЕРИАЛИ

За настоящото проучване е използван растителен материал (стъбла, листа, цветни кошнички и семена) от 14 вида на род *Carduus* разпространени в България – собствени сборове и хербарни образци. Материалите са събрани и обработени от автора в периода 2010-2016 година от общо 15 флористични района на страната и наброяват 155 образци. Ботаническата и хорологична характеристика на видовете от рода е направена по данни от Стоянов, Стефанов и Китанов (1967), Кузманов (1985), Делипавлов и Чешмеджиев (2003). Прегледани са 337 хербарни образци на видове от род *Carduus*, съхранявани в хербариумите на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ (SO), Аграрен Университет, гр. Пловдив (SOA), ИБЕИ-БАН, гр. София (SOM) и Регионален природонаучен музей, гр. Пловдив (РПМП). Част от събраните растителни материали са депозирани в хербариума на Аграрен университет гр. Пловдив (SOA), а друга част се съхраняват в колекцията на катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“.

4.2. МЕТОДИ

4.2.1. Палиноморфоложки метод

Поленът е обработен по стандартният ацетолузен метод на Erdtman (1960), с последващо включване на материала в глицерин-желатинови препарати. Измервани са всички количествени и качествени характеристики на морфологичните белези поддаващи се на измерване и наблюдение (*екваториален диаметър, полярна ос, диаметър, височина и ширина на шипчетата, брой шипчета, дебелина на секзина и некзина, диаметър на апоколпиума и съотношението полярна ос/екваториален диаметър*).

4.2.2. Молекулярен ITS метод

За изолирането на ДНК е използван свеж листен материал. За всяка проба са проведени шест отделни PCR реакции в PCR апарат TC-512 Thermal Cycler (Techne). PCR продуктите са смесени с 6,5 μL буфер за нанасяне и разделени посредством 1% агарозен гел, съдържащ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ етидиев бромид, при напрежение 7 V/cm и визуализирани с UV светлина. Изолирането на PCR продуктите от агарозата е осъществено чрез QIAquick Gel Extraction кит на Qiagen. Получените нуклеотидни секвенции са сравнени с аотираните в базата данни NCBI, чрез

използване на nblast алгоритъм от ALTSCHUL ET AL. (1997). Множествените алайнменти на получените секвенции, филогенетичните и молекулярно-еволюционни анализи са проведени чрез използване на пакета MEGA 6.2 (TAMURA ET AL., 2013). Броя на хаплотипите, хаплотипното и нуклеотидно разнообразие са изчислени със софтуера DNA SP 5.10.01 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

4.2.3. Сравнително-морфологичен метод

Анализирани са морфологичните белези на българските представители на род *Carduus* L., с акцент върху таксономично значимите, играещи основна роля за разграничаване на отделните таксони, а именно: височина и овласяване на растението, ширина на крилата на стъблото, дължина на бодлите на крилата, брой и форма на листните дялове, дължина на бодлите на листата, диаметър на съцветието (кошничката), дължина и диаметър на дръжката на кошничката, ширина на средните обвивни (инволукрални) листчета на кошничката, дължина на бодила на средните инволукрални листчета, дължина на венчето и на хвърчилката.

4.2.4. Сравнително-анатомичен метод

Приложен е класическият метод на METCALFE & CHALK (1950) при анализа на листен епидермис, листна пластинка и стъбло от видовете *C. nutans* и *C. thoermeri*. Проследени са следните анатомични белези: брой и тип трихоми на видно поле, брой и тип устица на видно поле, дебелина на листна пластинка, дебелина на кутикула (горна и долна) и дебелина на палисадна тъкан.

4.2.5. Кариологичен метод

Приложена е методика за изготвяне на цитогенетични препарати (ИВАНОВА, СТАЙКОВА, ИРИКОВА, 2002), на която са направени някои модификации, за определяне на хромозомния набор на видовете *C. nutans* и *C. thoermeri*.

4.2.6 Микроскопски методи

Светлинно-микроскопските снимки (СМ) са направени с микроскоп *Magnit T*, снабден с фотодокументираща система *Si5000* при увеличение x100 до x1000 в катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. Сканинг-електронномикроскопският анализ (СЕМ) е осъществен с помощта на микроскоп *JEOL JSM 5510* при увеличение x50 до x10000 в лабораторията по „Електронно-микроскопски анализи”

към факултет „Химия и фармация“ на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

4.2.7. Статистически методи

Данните са обработени на програми за статистическа обработка SPSS (SPSS Inc., IBM SPSS Statistics), версия 20; Statistica (StatSoft Inc., 2007) версия 7.0 и Microsoft Office Excel 2010. Използваното критично ниво на значимост е $\alpha = 0.05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от α .

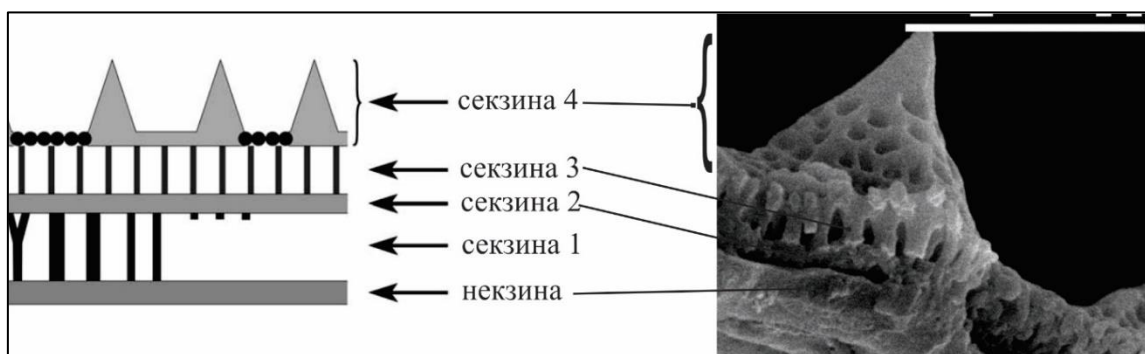
4.2.8. Хорологични данни и картиране

Хорологичните данни за изследваните видове са получени в резултат на преглед на литературни данни, собствени сборове и наблюдения, както и ревизирани хербарни образци. Данните са приведени в текста чрез цитиране на хербарни образци, както и отразени в картосхеми.

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Светлинно-микроскопски и сканинг-електронномикроскопски анализ на цветен прашец

При представителите на сем. Asteraceae (Сложноцветни), екзината е представена от две ясно разграничими части: некзина и секзина (Фигура 1). При изследваните видове от род *Carduus* секзина 1 не е представена.



Фигура 1. Строеж на екзината при сем. Asteraceae и нейната стратификация при проучените в настоящото изследване представители на род *Carduus* (по Punt & Hoен 2009, с допълнение; на снимката *C. thoermeri*).

Цветните прашецови зърна на сем. Asteraceae са сложни, съставени от ектоапелтура и ендоапелтура, като може да е представена и мезоапелтура.

Особеностите в морфологията на изследваните български представители на род *Carduus* показват, че вариациите в количествените параметри на наблюдаваните белези не позволяват отделянето на самостоятелни поленови типове и те принадлежат към един поленов тип – *Carduus crispus* тип, описан от PUNT & HOEN (2009). Различията между отделните видове позволяват тяхното групиране в няколко поленови групи в смисъла на понятието „pollen group” предложено от PUNT & HOEN (2009).

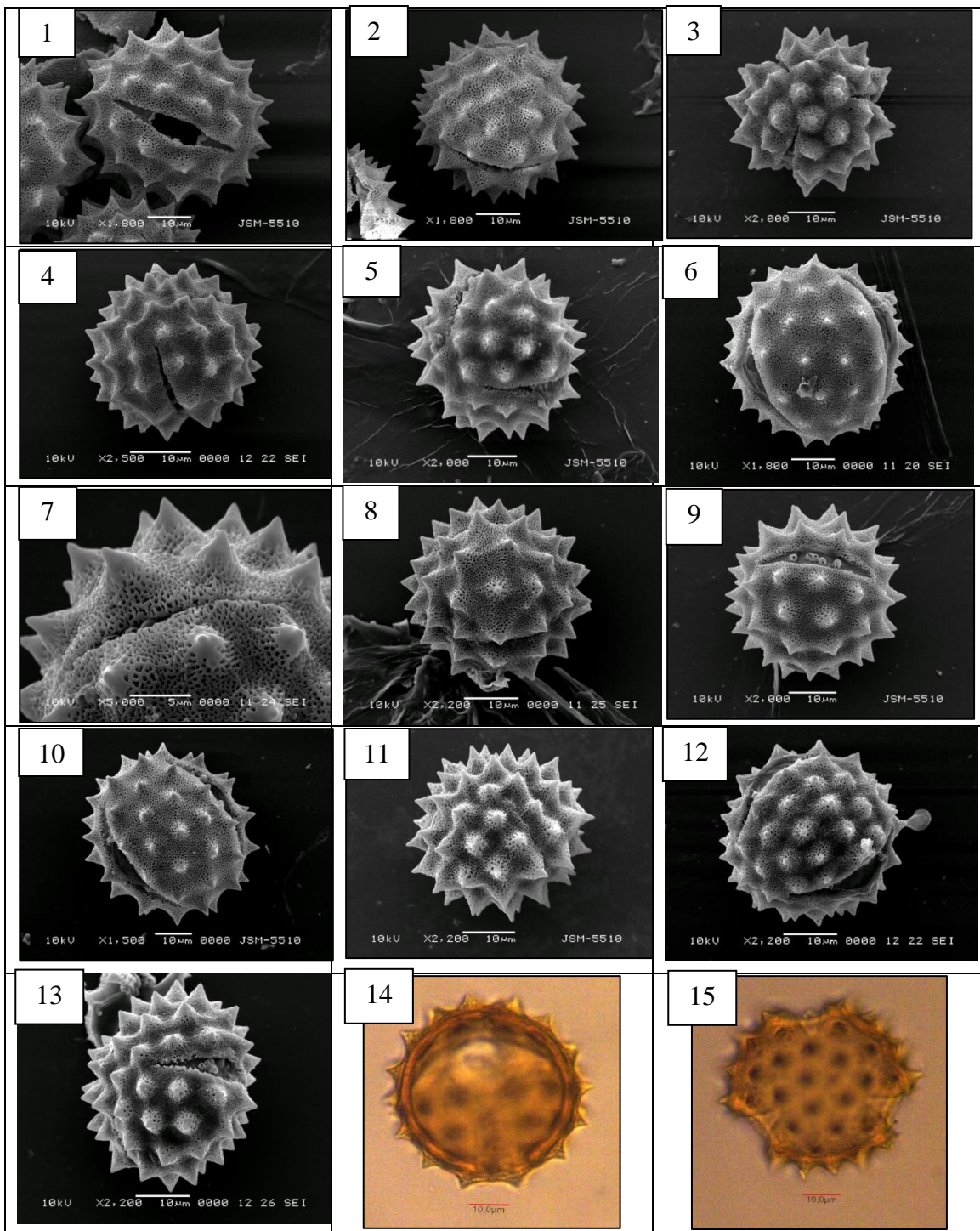
Въз основа на комплекса от морфометричните показатели и статистическите данни, в настоящото изследване са разграничени 3 поленови групи.

Поленова група *C. nutans* – Поленовите зърна са най-едри (с полярна ос и екваториален диаметър достигащи до 64 μm). Включва видовете – *C. nutans* и *C. thoermeri* (Фигура 2, 1-2).

Поленова група *C. personata* – Зърната са със средни размери, достигащи до около 36-38 μm . Включва видовете – *C. personata*, *C. ruscosephalus*, *C. kernerii*, *C. rhodopaeus*, *C. crispus*, *C. armatus*, *C. candicans* и *C. acicularis* (Фигура 2, 3-10).

Поленова група *C. hamulosus* – Поленовите зърна са най-дребни (с екваториален диаметър и полярна ос достигащи до 32-35 μm). Включва видовете – *C. hamulosus*, *C. carduelis*, *C. thracicus* и *C. acanthoides* (Фигура 2, 11-14).

По всички 8 измервани показатели е направен клъстерен анализ, въз основа на който се откриха белези с таксономична значимост за раграничаването на поленовите зърна, а именно: метричните стойности на екваториален диаметър, полярна ос, височина и ширина на шипчетата.

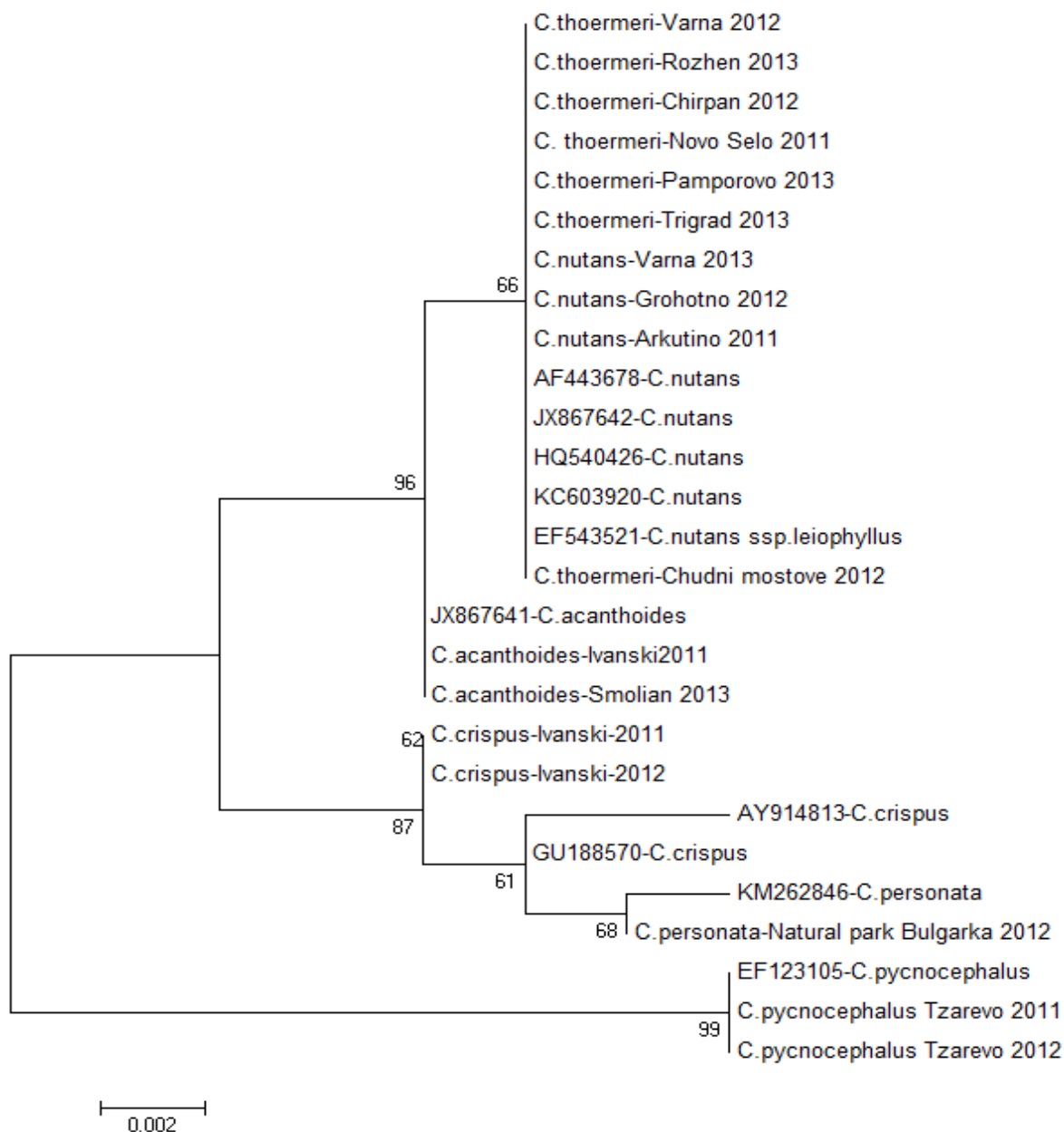


Фигура 2. Снимки на полен - СЕМ (1-13) и СМ (14-15).

Легенда: *C. thoerteri* (1), *C. nutans* (2), *C. personata* (3), *C. pycnocephalus* (4), *C. kernerii* (5), *C. rhodopaeus* (6), *C. crispus* (7), *C. armatus* (8), *C. candicans* (9), *C. acicularis* (10), *C. hamulosus* (11), *C. carduelis* (12), *C. acanthoides* (13) и *C. thracicus* (14, 15).

5.2. Молекулярно-генетичен анализ на българските представители от род *Carduus*

Изолираните ITS 1/2 секвенции от българските представители на род *Carduus* са подложени на анализ в NCBI база данни, използвайки nblast алгоритъм от ALTSCHUL ET AL. (1997), като резултатите са представени на **Фигура 3**.

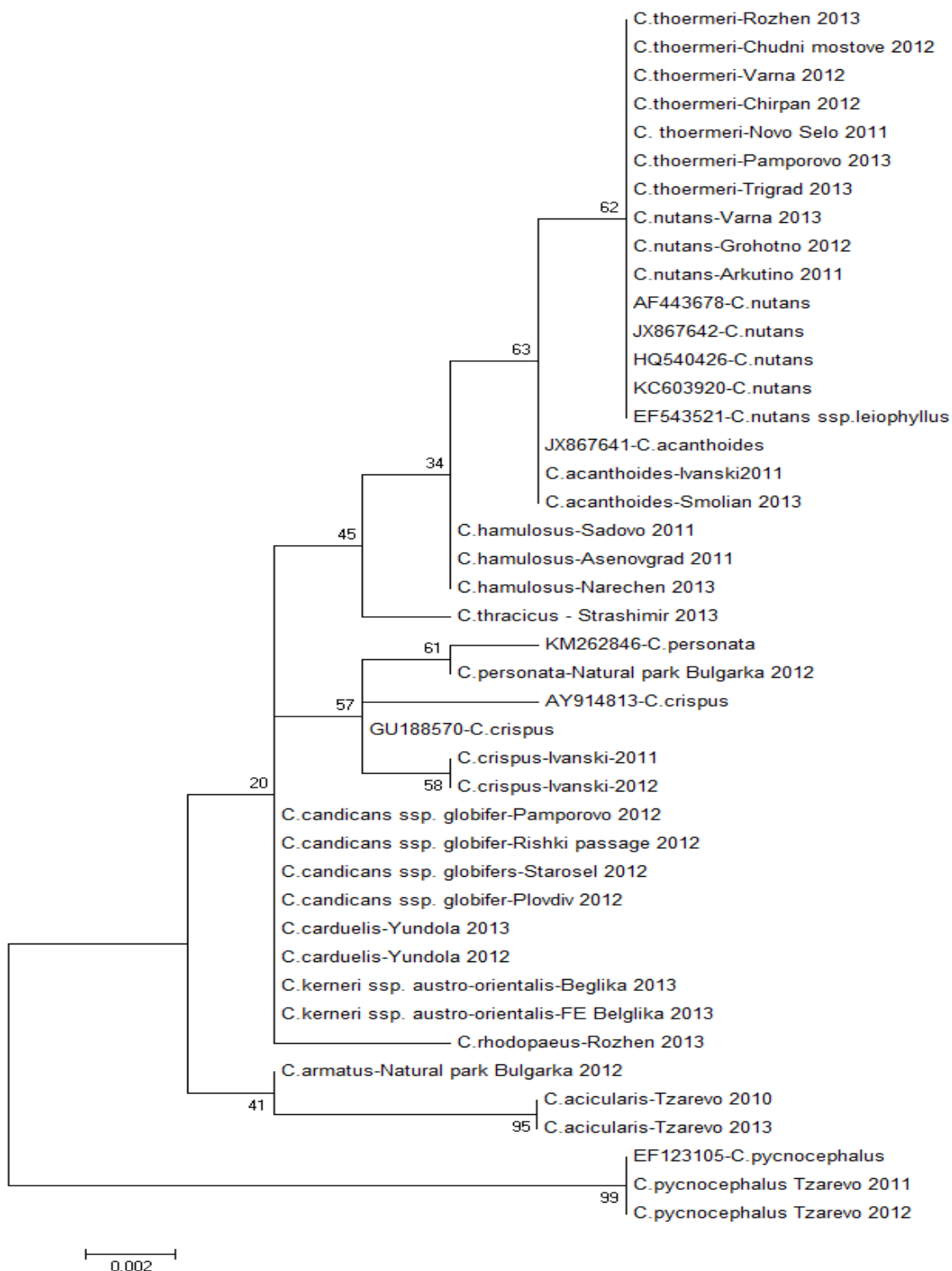


Фигура 3. Филогенетично дърво на видовете от род *Carduus*, основаващо се на ITS1/2 секвенциите, посочени в NCBI и тези, изолирани от българските представители на рода.

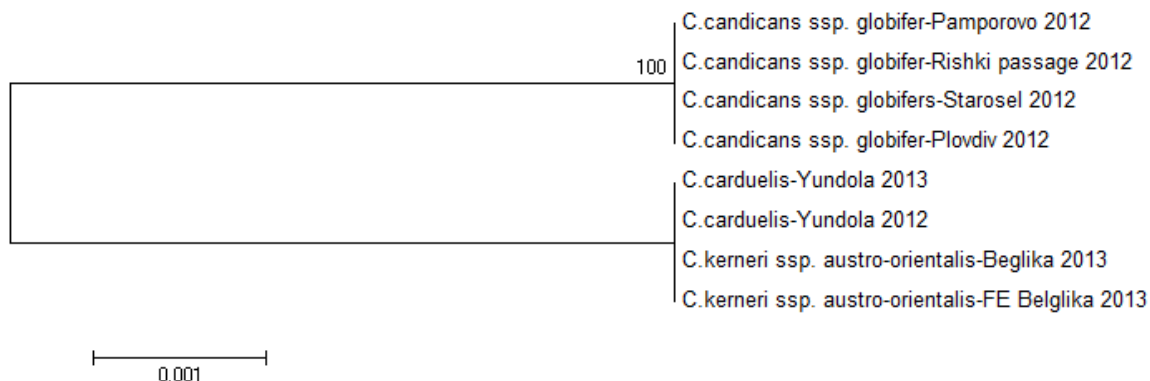
Анализът показва 98% сходство на българските видове *C. русноcephalus* и *C. personata* с тези от същите видове аотирани в NCBI под номера EF123105, AF319057, AF319111 (*C. русноcephalus*), и KM262846 (*C. personata*). ITS 1/2 секвенциите от българските видове *C. nutans* и *C. thoermeri* са 100% идентични с аотираниите в NCBI под номера AY780401, EF543521, KC603920, HQ540426, AF443678 и JX867642 (*C. nutans*). Сходството между българския вид *C. acanthoides* и EF123106, JX867641 (*C. acanthoides*) е значително по-ниско – 96%. Най-ниско сходство от 92% е установено между секвенциите на българския вид *C. crispus* и този от Мериленд, САЩ, аотирани под номер EF010530, докато изолатите от *C. crispus* от Северна Корея и Китай (GU188570, AY914813) показват сходство, съответно 98 и 96%.

Включването на другите осем вида, непосочени от други автори в NCBI, не предизвика значителни промени в клъстерите от **Фигура 3**, но доведе до образуването на нови клъстери и подклъстери, специфични за някои от българските представители на род *Carduus* (**Фигура 4**). На филогенетичното дърво се вижда, че секвенциите от *C. русноcephalus* образуват самостоятелен клъстер, отделен от останалите видове. Балканският ендемит *C. armatus* се групира с *C. acicularis*, но те формират добре различими клъстери. Другият балкански ендемит *C. thracicus* образува отделно разклонение от група клъстери, обединяващи тези на *C. hamulosus*, *C. acanthoides* и общият на *C. thoermeri*, и *C. nutans*. Видът *C. rhodopaeus* също формира отделно разклонение.

Интерес представляват *C. candicans*, *C. carduelis* и *C. kernerii*, които се групират в общ клъстер. При филогенетичният анализ само на тези видове (**Фигура 5**) се получи филогенетично дърво, което показва, че *C. candicans* всъщност образува отделен подклъстер, а секвенциите от *C. carduelis* и *C. kernerii* са 100% идентични, както тези на *C. thoermeri* и *C. nutans*.



Фигура 4. Филогенетично дърво на видовете от род *Carduus*, основаващо се на ITS1/2 секвенциите посочени в NCBI и тези, изолирани от всички представители на рода, срещани се в България.



Фигура 5. Филогенетично поддърво на три близкородствени вида от род *Carduus*, построено на базата на ITS1/2 изолираните секвенции.

От изследваните български представители на род *Carduus*, *C. acanthoides* показва най-голяма вариабилност на ITS регионите. Установени са осем единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) на позиции 38, 43, 79, 82, 116, 147, 169 и 158. Единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) се установяват и при *C. crispus* и *C. hamulosus* (Таблица 1).

Таблица 1. Списък на единичните нуклеотидни полиморфизми (SNPs) открити в различни популации на видове от род *Carduus*.

Вид	<i>C. acanthoides</i>		<i>C. crispus</i>		<i>C. hamulosus</i>		
	Ивански	Смолян	Ивански 2011	Ивански 2012	Садово	Асеновград	Наречен
Находище							
SNP позиция, тип	38 G(4)/T(2)	38 G(4)/T(2)	79 T(4)/C(2)	79 T(4)/C(2)	43 G(4)/T(2)	43 G(4)/T(2)	43 G
	43 G(3)/A(3)	43 G(3)/A(3)	136 C(5)/T(1)	136 C(5)/T(1)	149 A	149 T(3)/A(3)	149 T(4)/A(2)
	79 C(4)/T(2)	79 C(3)/T(3)	147 C(3)/T(3)	147 C(3)/T(3)	228 G(3)/C(3)	228 G(3)/C(3)	228 G(4)/C(2)
	82 T(3)/C(3)	82 T(3)/C(3)	149 A(3)/T(3)	149 A(3)/T(3)			
	116 A(3)/T(3)	116 A(4)/T(2)	198 T(4)/A(2)	198 T(4)/A(2)			
	147 T(3)/C(3)	147 T(3)/C(3)					
	149 T(4)/A(2)	149 T(3)/A(3)					
	198 A(3)/T(3)	198 A(3)/T(3)					

Тези резултати са доказателство за вътрепопулационно генетично разнообразие на видовете от род *Carduus*, стоящо в основата на

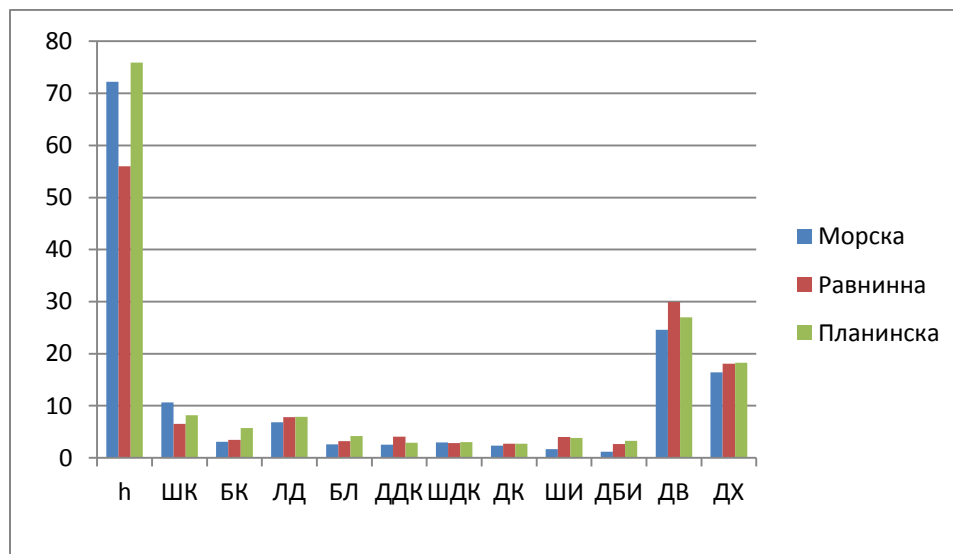
вътревидовата изменчивост и предоставящо възможност за появата на нови форми и подвидове. Групирането на *C. nutans* и *C. thoermeri* в една поленова група, както и идентичността на секвенциите им ни подтикнаха към по-детайлно морфологично и анатомично изследване.

5.3. Сравнително-морфологичен анализ

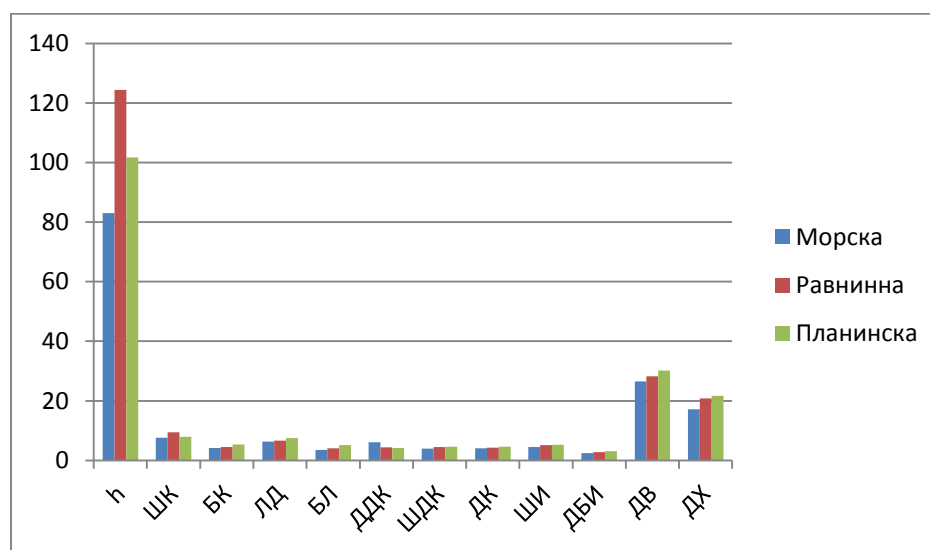
С цел проследяване ролята на условията на местообитание върху морфологичния облик на растенията и сравняемост на данните чрез прилагането на различни статистически методи за анализ, находищата от които са събрани видовете *C. nutans* и *C. thoermeri* са разделени на 3 групи според надморската височина, а именно: морска (до 100 м н.в.), равнинна (100-350 м н.в.) и планинска (над 350 м н.в.).

Сравнителният анализ на данните от различните находища за *C. nutans* показва, че растенията от морската група показват най-ниски стойности по повечето от изследваните морфологични белези, с изключение на белезите височина на растението (h), ширина на крилата на стъблото (ШК) и ширина (диаметър) на дръжката на кошничката (ШДК) (**Фигура 6**). При растенията от планинските находища се констатират най-високи средни стойности по 6 количествени морфологични белега – височина на растението (h), дължина на бодила на крилата (БК), брой листни дялове (ЛД), дължина на бодила на листата (БЛ), ширина (диаметър) на дръжката на кошничката (ШДК) и дължина на бодила на инволукралните листчета на кошничката (ДБИ). При равнинни условия растенията заемат междинно положение по отношение на повечето от изследваните белези, с изключение на белезите дължина на дръжката на кошничката и дължина на венчето, където са установени най-високи средни стойности.

При *C. thoermeri*, екземплярите от находищата с най-малка надморска височина показват най-ниски стойности по отношение на всички показатели, с изключение на белега дължина на дръжката на кошничката (ДДК) (**Фигура 7**).



Фигура 6. Средни стойности на проучваните морфологични белези при *C. nutans* от трите групи.

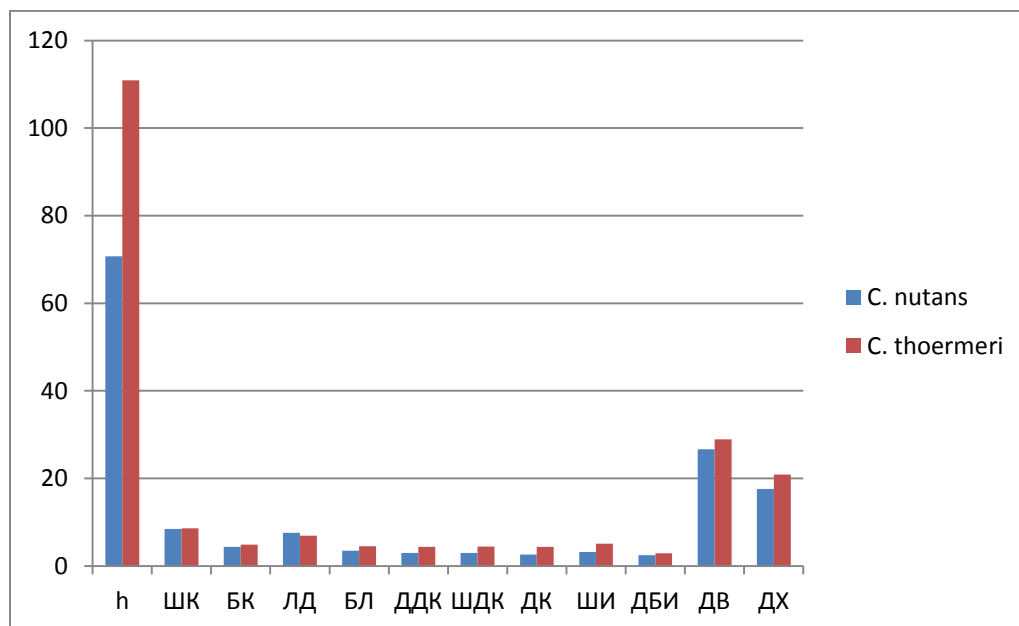


Фигура 7. Средни стойности на проучваните морфологични белези при *C. thoermeri* от трите групи.

Растенията от равнинната група на *C. thoermeri* имат най-високи средни стойности по отношение на белезите височина на стъблото (h) и ширина на крилата на стъблото (ШК). Най-дълги бодли на крилата (БК), листата (БЛ) и обвивните листчета на кошничката (ДБИ) показват екземплярите от планинската група. Те се характеризират също така и с най-голям брой листни дялове (ЛД), най-широка дръжка на кошничката (ШДК), най-голям диаметър на кошничката (ДК), най-широки обвивни листчета(ШИ) и най-дълги венче (ДВ) и хвърчилка (ДХ).

За да се направят изводи за съществуването на вътревидовата таксономична категория форма при двата вида са необходими допълнителни проучвания на екологичните фактори.

В резултат на направеният подробен анализ на морфологичните белези и статистическата им обработка (ANOVA, Т-тест на Стюдънт) се установи, че при видовете *C. nutans* и *C. thoermeri*, белезите форма на листните дялове, височина на растенията (h), ширина на средните инволукрални листчета над прищъпването (ШИ), диаметър на кошничката (ДК), дължина (ДДК) и диаметър (ШДК) на дръжката на кошничката, както и дължина на венчето (ДВ) и дължина на хвърчилката (ДХ), могат да бъдат използвани като стабилни белези за разграничаването на двата таксона (**Фигура 8**).

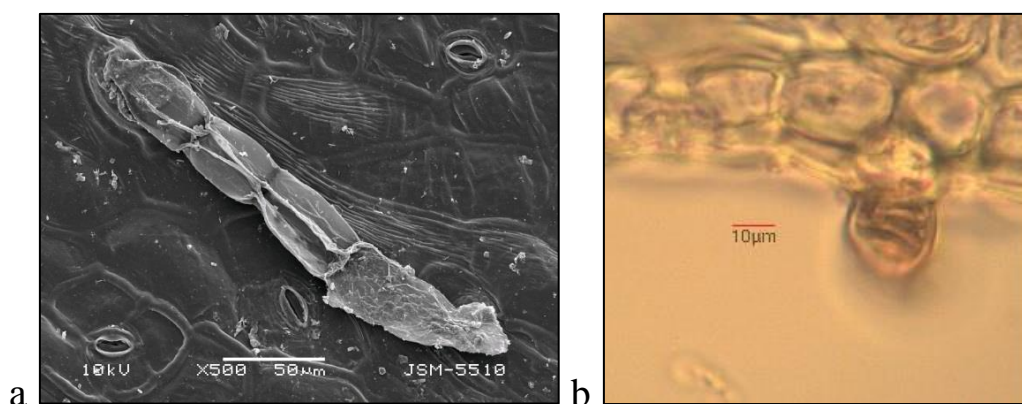


Фигура 8. Средни стойности на проучваните морфологични белези при *C. nutans* и *C. thoermeri*.

При морфологичното проучване на останалите видове от род *Carduus* са установени отклонения от посочените в литературата стойности на някои белези. За тях не е направен подробен статистически анализ поради недостатъчния брой проучени находища и консервационната значимост на някои видове.

5.4 Сравнително-анатомичен анализ при видовете *C. nutans* и *C. thoermeri*

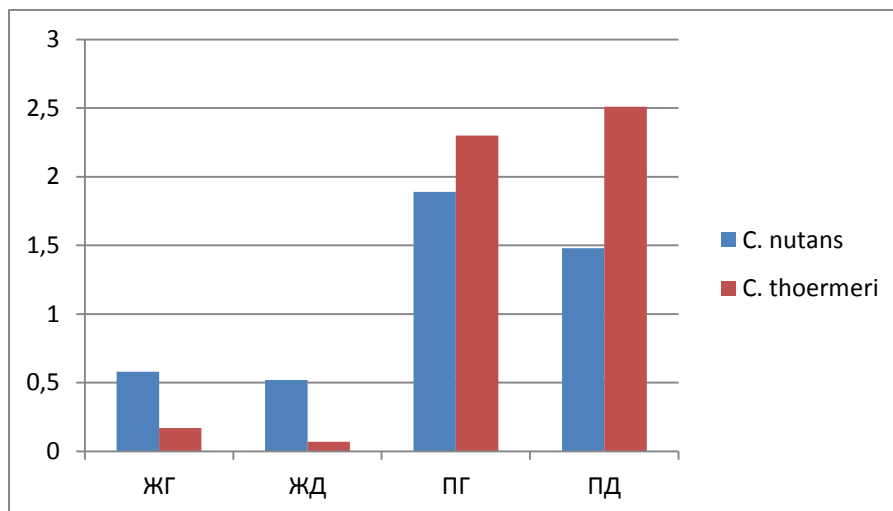
Листният епидермис при *C. nutans* и *C. thoermeri* е представен от 4 вида клетки: основни клетки на епидермиса, устични, околоустични и клетки на трихомите. И двата проучвани вида показват бифациална (двулицева) структура на листа, а наличието на устица и по двете му повърхности го определя като амфистоматичен. Листната повърхност е без трихоми (гола) или с рехаво разположени два типа трихоми (власинки) – многоклетъчни покривни неразклонени, изградени от 4 до 6 клетки и главести жлезисти, с една излъчваща клетка и едноклетъчна дръжка. (Фигура 9).



Фигура 9. Трихоми при *C. nutans* и *C. thoermeri*.

Легенда: а – СЕМ снимка на многоклетъчна покривна трихома при *C. nutans*;
б – СМ снимка на главеста жлезиста трихома при *C. thoermeri*.

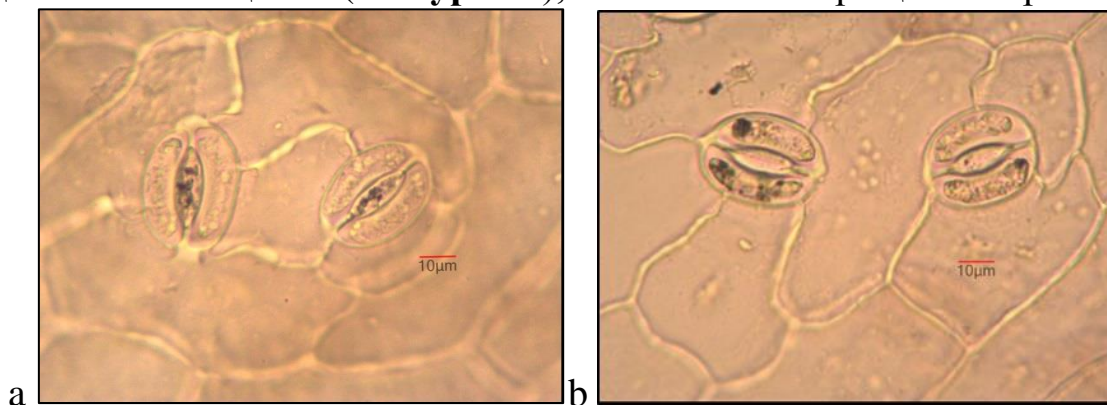
Направените измервания за брой трихоми по двете листни повърхности показаха, че и при двата вида те се влияят от екологичните условия на местообитание. Сравнявайки средните стойности на тези белези се установи, че *C. thoermeri* е по-силно овласен, докато при *C. nutans* се срещат повече жлезистите трихоми (Фигура 10).



Фигура 10. Брой трихоми по двете листни повърхности (средни стойности за 1 мм²).

Легенда: ЖГ- жлезисти трихоми горен епидермис; ЖД- жлезисти трихоми долен епидермис; ПГ-покривни трихоми горен епидермис; ПД- покривни трихоми долен епидермис.

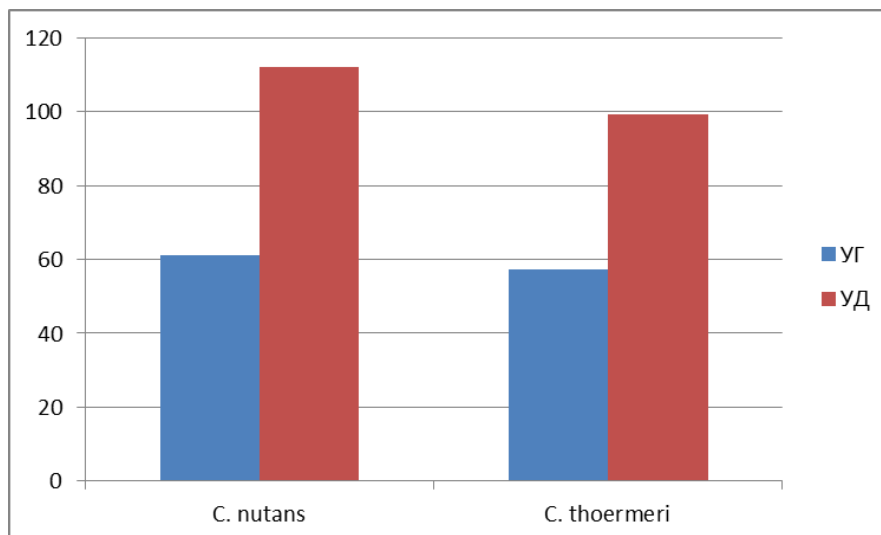
Устичният апарат по листния епидермис е смесен тип – анизоцитен и аномоцитен (**Фигура 11**), като по-често срещан е първия.



Фигура 11. Анизоцитен и аномоцитен тип устичен апарат.

Легенда: a- *C. nutans*; b – *C. thoermeri*.

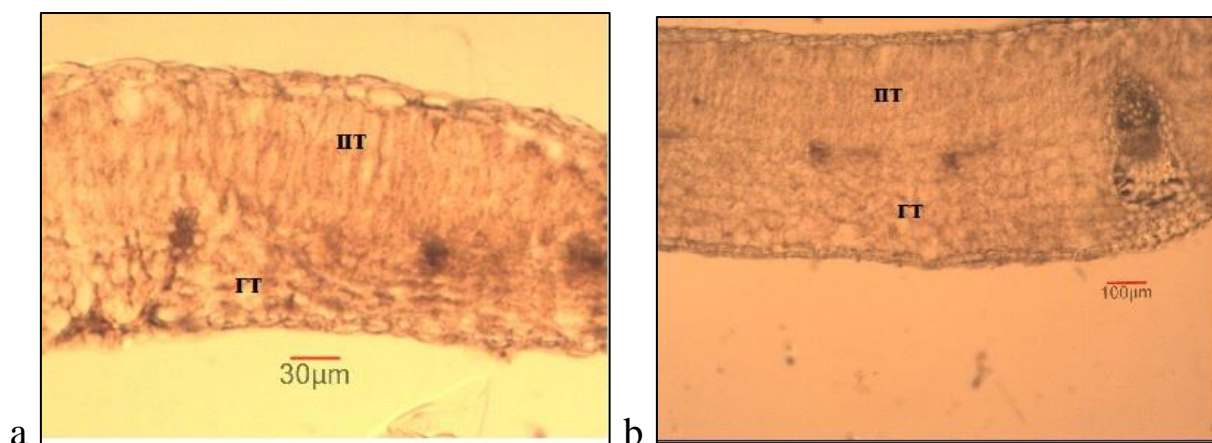
По отношение броя на устицата по двете листни повърхности при двата вида се наблюдава голямо вътревидово и междувидово вариране. При *C. nutans* се установява по-голям брой устица по двете листни повърхности отколкото при *C. thoermeri* (**Фигура 12**). В резултат на статистическата обработка на получените данни, достоверна разлика между двата вида съществува по отношение на броя на устицата по долния епидермис.



Фигура 12. Брой устица по двете листни повърхности (средни стойности за 1 мм²).

Легенда: УГ- устица горен епидермис; УД- устица долен епидермис.

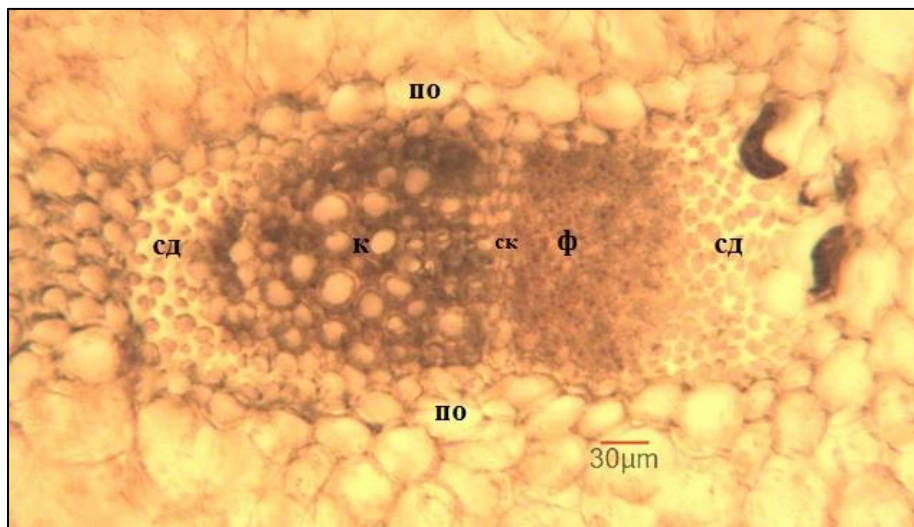
Напречният пререз на листната пластинка на видовете *C. nutans* и *C. thoermeri* показва бифациална структура, с мезофил диференциран на стълбчест (палисаден) и гъбчест паренхим. Стълбчестата тъкан е по-добре представена от 2-3 реда плътно допрени, цилиндрични клетки и заема пространството под горния епидермис. Гъбчестият паренхим се разполага към долната повърхност на листата (**Фигура 13**). Листата са покрити с еднослоен епидермис (горен и долен), с добре развита кутикула, чиято дебелина варира между 3 и 9 μm и при двата вида.



Фигура 13. Листна пластинка.

Легенда: а – *C. nutans*; б – *C. thoermeri*. пт – палисадна тъкан; гг – гъбчеста тъкан.

Жилките пронизват листата с проводящи снопчета, обвити със склеренхимни дъги и паренхимно влагалище (**Фигура 14**). Проводящите снопчета са затворени колатерални, като само разположените в средната жилка могат да бъдат отворени. Твърдението на METCALFE & CHALK (1950, 1979, 1989) за наличие на паренхимна обвивка около проводящите снопчета при представителите на семейство Asteraceae, изградена от големи клетки, се потвърди и в настоящото изследване. (**Фигура 14**).



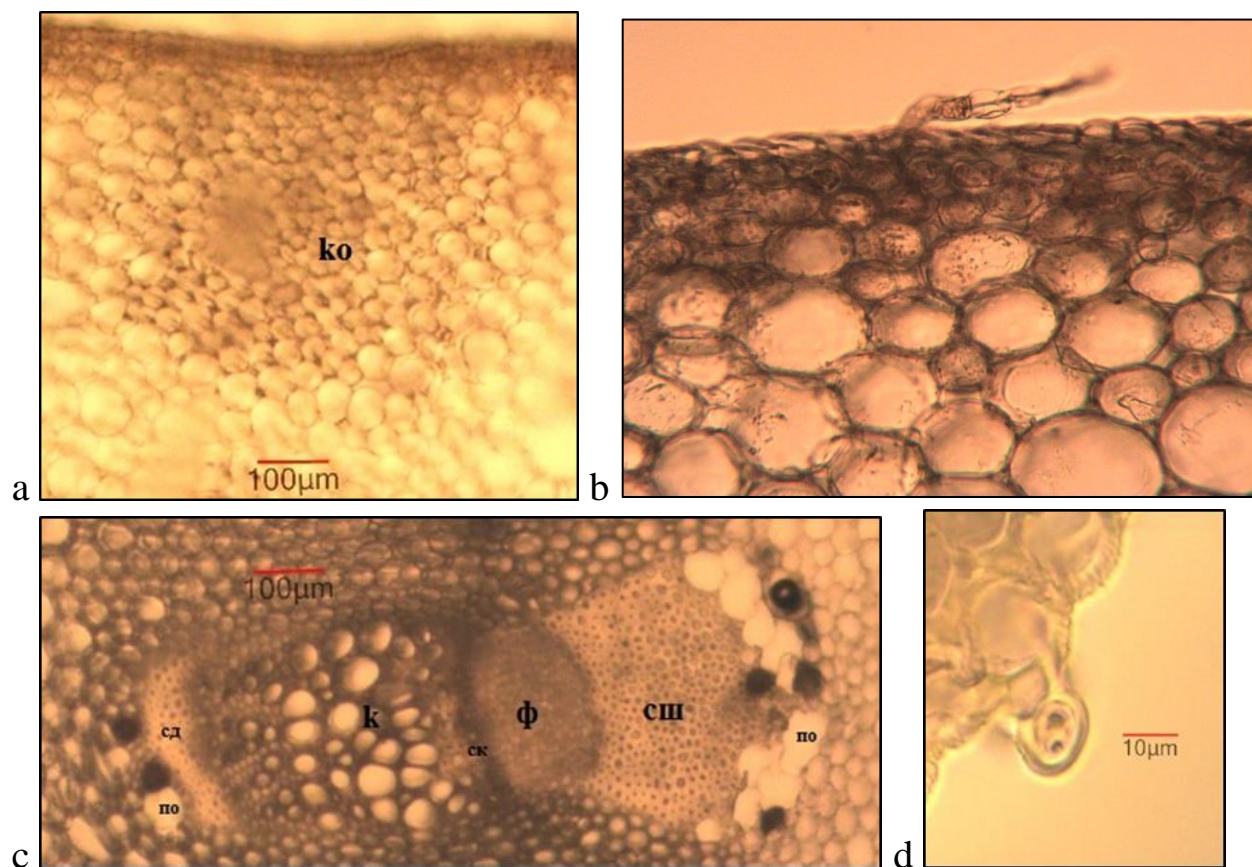
Фигура 14. Отворено колатерално проводящо снопче в лист от *C. nutans*.

Легенда: к – ксилем; ф – флоем; ск – снопчест камбий; сд – склеренхимна дъга; по – паренхимна обвивка.

Между измерваните количествени показатели на листната пластинка (дебелина на листна пластинка, кутикула, палисадна тъкан) между двата вида не се установява статистически достоверна разлика, поради което те не могат да бъдат използвани за разграничаване на двата таксона.

Стъблото е диференцирано на кора и централен цилиндър, с циклично разположени отворени колатерални проводящи снопчета. Епидермисът е изграден от един ред леко удължени клетки със задебелени клетъчни стени, покрити с кутикула. На места се наблюдават многоклетъчни покривни или едноклетъчни жлезисти трихоми (**Фигура 15 – b, d**). Под епидермиса се разполага хлоренхимна тъкан, която се редува с ъглест коленхим (**Фигура 15 – a**). Механичната тъкан е разположена главно в ръбовете на стъблото. Навътре следва паренхим, съставен от по-дребни клетки откъм хлоренхимния слой и по-едри към

центъра на стъблото. Сърцевината на стъблото и при двата изследвани вида е плътна, представена от паренхимна тъкан, сред която циклично се разполагат отворените колатерални проводящи снопчета (**Фигура 15 – с**). Снопчетата са покрити откъм горната страна със склеренхимна шапка, над която се наблюдават едри паренхимни клетки. При по-големите проводящи снопчета такива клетки има и от долната страна. Долната част на снопчето е обхваната от механична тъкан във вид на склеренхимна дъга.

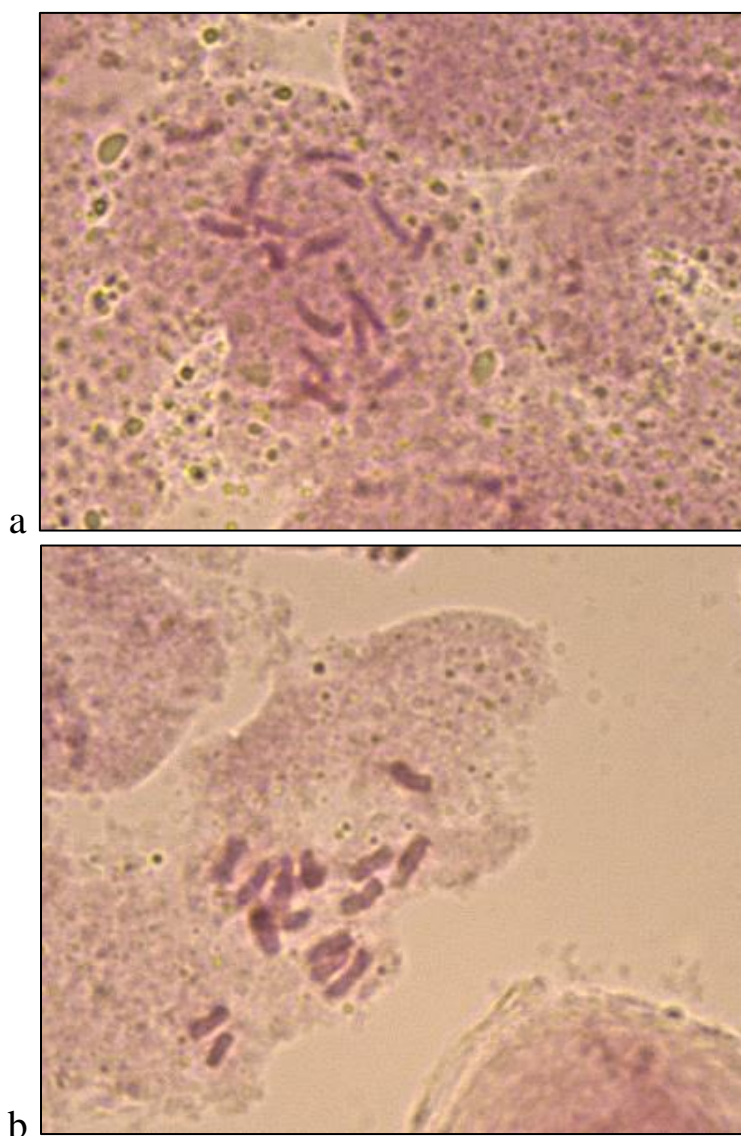


Фигура 15. Напречен пререз на стъбло.

Легенда: а – кора с ъглест коленхим при *C. nutans*; б – многоклетъчна покривна трихома при *C. thoermeri*; с – отворено колатерално проводящо снопче при *C. thoermeri*; д – жлезиста трихома при *C. thoermeri*. ко – ъглест коленхим; к – ксилем; ф – флоем; ск – снопчест камбий; сд – склеренхимна дъга; сш – склеренхимна шапка; по- паренхимна обвивка.

5.5. Кариологичен анализ при видовете *C. nutans* и *C. thoermeri*

В хода на микроскопския анализ в блокирани метафази от коренова меристема се установи, че диплоидният хромозомен набор на двата вида включва 16 хромозоми (*C. nutans* – $2n=16$ и *C. thoermeri* – $2n=16$) – **Фигура 16**. Същият брой хромозоми за *C. thoermeri* от България установяват KUZMANOV, GEORGIEVA, NIKOLOVA (1986, 1991). За *C. nutans* subsp. *falcato-incurvus* от Турция се съобщава $2n=16$ хромозомен набор (GEDİK ET AL., 2016). За детайлно анализиране на двата хромозомни набора по отношение на морфологичната и размерна характеристика на хромозомите са необходими по-нататъшни експерименти.



Фигура 16. Блокирани метафази.

Легенда: a – *C. nutans* ($2n=16$); b – *C. thoermeri* ($2n=16$) x1000.

5.6. Таксономично обсъждане

В резултат на направеното биосистематично проучване на българските представители на род *Carduus* L., приемаме таксономичната самостоятелност на 12 вида принадлежащи към рода, а именно: *C. acanthoides* L., *C. acicularis* Bertol, *C. armatus* Boiss. & Heldr., *C. candicans* Waldst. & Kit., *C. carduelis* (L.) Gren., *C. crispus* L., *C. hamulosus* Ehrh., *C. kernerii* Simonkai, *C. personata* (L.) Jacq., *C. ruscnocephalus* L., *C. rhodopaeus* Velen. и *C. thracicus* (Velen.) Hayek. Що се отнася до видовете *C. nutans* L. и *C. thoermeri* Wienm., възприемаме тезите на СТОЯНОВ И СТЕФАНОВ (1948) и DESROCHERS ET AL. (1988A), и считаме че таксономичния статус на двата вида трябва да бъде променен, но на ниво подвид, а именно: *C. nutans* subsp. *nutans* и *C. nutans* subsp. *lejophyllus* (Petr.) Stoj. & Stef. В резултат на направените теренни проучвания и прегледа на хербарни образци, видът *C. uncinatus* (Velen.) Vieb. не се потвърди за флората на България и в настоящото проучване.

Въз основа на получените данни и на наличните в литературата е актуализиран ключа за определяне на българските представители от род *Carduus*.

КЛЮЧ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИДОВЕТЕ ОТ РОД *CARDUUS* L.

1. Кошничките цилиндрични, по-дълги отколкото широки, лесно опадващи след цъфтеж. Цветовете правилни..... **2**
- + Кошничките не са цилиндрични, ± дълги колкото широки, обикновено неопадващи след цъфтеж. Цветовете неправилни/единият венечен дял по-дълбоко отделен от другите **3**
2. Стъблените крила до 4 мм широки, с бодли до 16 мм. Дяловете на листата с бодли до 8 мм. Средните обвивни листчета 2-4 мм широки. ☉ - ☉. 30-150 см. По пустеещи места, край пътища. V-VIII. Чм, СиБ, Стд, Рд (и), **Трн**, Тхр, Сж. (-0.3). (Д).....
.....**1. Дребноглав м. б. – *C. ruscnocephalus* L.**
- + Стъблените крила до 10 мм широки, с бодли до 3.5 мм. Дяловете на листата с бодли 1-5 мм. Средните обвивни листчета 0.7-1.2 мм широки. ☉. 20-60 (-70) см. По тревисти места. V-VIII. Чм, Стд, Трн,

- Тхр, Сж. (-0.8)2. **Тяснолюпест м. б.** – *C. acicularis* Bertol. [*C. argentatus* L. subsp. *acicularis* (Bertol.) Meikle]
3. Обвивните листчета прищъпнати в или под средата. Листните дялове 5-14 двойки.3. **Наведен м.б.** – *C. nutans* L.
- а. Долната част на стъблото паяжинестовлакнеста. Листните дялове обикновено дланевидни. Кошничките 1.5-3.5 см в диаметър. Обвивните листчета, еднакво широки над и под прищъпването. Венчето 20-34 мм дълго. ☉. 30-110 см. По рудерални места. VI-X. ЦБ. (-1.5) (М, Л, Х, П).....subsp. *nutans*
- + . Долната част на стъблото ± гола. Листните дялове обикновено широко триъгълни. Кошничките 2-8 см в диаметър. Обвивните листчета най-широки /2 - 8 мм/ над прищъпването. Венчето 21-50 мм дълго. ☉. 30-200 см. По рудерални места. VI-X. ЦБ. /-1.5/.....subsp. *lejophyllus* (Petr.) Stoj. & Stef. (*C. thoermeri*)
- + . Обвивните листчета неприщъпнати..... 4
4. Обвивните листчета на върха кукесто извити 5
- + . Обвивните листчета на върха не са кукесто извити /изправени или ± разперени 8
5. Стъблото бодливокрилато до върха. Листата меки, ситно бодливочетинести по ръба. Кошничките събрани по 2-4. ч. 60-120 см. В гори. VI-VIII. Прб (и), Сп (з, с), Зн. Вт, Блс, Пн, Рл, Рд (з, с). (-2.5)..... 4. **Мек м.б.** - *C. personata* (L.) Jacq.
- + . Стъблото не е бодливокрилато до върха. Листата корави, с твърди бодли по ръба. Кошничките единични, на дълги /до 10 см/ дръжки.....6
6. Стъблото бяловлакнесто, с крила до 7мм широки и бодил на върха до 5 мм. Листата отгоре гъсто, отдолу бяловлакнести, с 6-8 двойки листчета с връхен бодил до 3 мм. Хвърчилката на плода 10-13 мм. ☉ ☉. 50-70 см. По сухи варовити тревисти места. VII-IX. ?Чм, ?СиБ, ?Тхр. (-0.5).....5. **Вълнест м. б.** – *C. uncinatus* Vieb.
- + . Стъблото рядкопаяжинесто овласено, с крила до 5 мм широки и с бодил на върха до 2.5 мм. Листата отгоре голи или рядко паяжиновидно овласени, а отдолу гъсто паяжинестовлакнести с 8-10 двойки листчета и връхен бодил до 2 мм. Хвърчилката на плода 13-15 мм7

7. Кошничките 2.5-4 см в диаметър. ☉. 50-100 см. По пустеещи каменливи места. VI-IX. СиБ, Др, Сф, Згп, Сг, Рд (и, с), Трн, Сж. (0.5-1). (X).....**6. Дребнокукест м.б. – *C. hamulosus* Ehrh.**
- + Кошничките до 1.3 см в диаметър. ☉. 20-100 см. По скалисти пустеещи места. VI-VII. СиБ, Прб, Сп (и), Стд, Рд, Трн, Тхр , Сж. (0.7-1).....**7. ☉Тракийски м.б. – *C. thracicus* (Velen.) Hayek**
8. Кошничките по няколко, почти или приседнали. **9**
- + Кошничките единични, на къси / 2-5 см / или дълги /до 20 см/ дръжки..... **11**
9. Крилата на стъблото до 4 мм широки, с бодил на върха до 2 мм. Листата меки, с къси (до 2 мм) бодливи четинки по ръба, дълбоко назъбени до изрязани, горните двойки цели, отгоре тъмнозелени, почти голи, отдолу сивовлакнести. Обвивните листчета полуразперени, по-къси от цветовете. ч. 40-150 см. В планински гори. IV-VIII. Чм (с) СиБ, Др, ПрБ, В, Рл, Рд (и), Трн, Тхр. (1-2). (М, Л, X)..... **8. Къдрав м.б. – *C. crispus* L.**
- + Крилата на стъблото до 14 мм широки, с бодил на върха до 7 мм. Листата корави, с връхен бодил по-дълъг от 2 мм, отгоре голи, отдолу по средната жилка с многоклетъчни паяжиновидни власинки..... **10**
10. Крилата на стъблото 3-14 мм широки, с бодил до 7 мм. Кошничките, на къси дръжки или приседнали. Средните обвивни листчета с изпъкнала средна жилка само в горната част. ☉. 30-170 см. Рудерално растение. VI-IX. ЦБ. (-1.3). (М, Л, X)..... **9. Обикновен м. б. – *C. acanthoides* L.**
- + Крилата на стъблото 6-9 мм широки, с бодил до 5 мм. Връхните бодли по листата до 15 мм. Кошничките, формиращи гроздовидно или щитовидно съцветие. Средните обвивни листчета с изпъкнала средна жилка по цялата дължина. ч. 40-100 см. По тревисти места. VII-VIII. Сп (с), Зн, Слв, Рл, ?Рд (з), Осг. (1.5-2)..... **10.☉Бодлив м. б. – *C. armatus* Boiss. & Heldr. (*C. tmoleus* subsp.)**
11. Обвивните листчета дългнестолинейни, на върха късо подострени. Листата отгоре голи или почти голи, отдолу слабо овласени, с 6-13 двойки листчета с връхен бодил 1-2 мм. ☉ч. 50-100 см. По каменливи места. Слв, Рд (с, з), Трн. VI-IX. (0.8-2)..... **11.●Родопски м. б. – *C. rhodopaeus* Velen. (*C. adpressus* subsp.)**

- + Обвивните листчета шиловидни, постепенно стеснени в бодил **12**
12. Стъблото паяжиновидно овласено, с крила до 18 мм и бодил 1-7 мм. Листата, отдолу бяловълнести, дяловете с връхен бодил до 5 мм. Обвивните листчета с изпъкнала по цялата дължина средна жилка и бодил 0.5-1 мм, външните често отклонени навън. ☉². 25-125 см. По тревисти места. VI-VIII. ЦБ. (-1).....
- 12. ⊗ Бяловълнест м. б. – *C. candicans* Waldst. & Kit. subsp. *globifer* (Velen.) Kazmi**
- + Стъблото голо или слабо влакнесто, с крила до 4 мм и бодил до 2 мм. Листата отдолу зелени, голи или слабо паяжиновидно овласени, дяловете с бодил 1-3 мм..... **13**
13. Стъблото бодливокрилато в долната част. Листните дялове 8-10 двойки. Обвивните листчета изправени или слабо извити навън. ². 40-80 см. По тревисти места. VII-IX. Сп (з, с), В, Згп, Пн, Рл. (1.5-2.5).....
- 13. Изправенолюспест м. б. – *C. carduelis* (L.) Gren. (*C. alpestris*)**
- + Стъблото бодливокрилато почти до върха. Листните дялове 14-20 двойки. Обвивните листчета разперени. ². 45-100 см. По тревисти места. VI - IX. Сп (з, с), В, Пн, Рл, Рд (з), Осг. (1.5-2.8).....
- 14. ⊗ Кернеров м.б. – *C. kernerii* Simonkai subsp. *austro-orientalis* Franco (*C. scardicus*).**

Маркираните в черно флористични райони са новоустановени, а пред непотвърдените е поставен знака „?“.

6. ИЗВОДИ

1. Поленовият анализ показва, че при видовете от род *Carduus*, разпространени в България, се разграничават три поленови групи– *Carduus personata*-група, *Carduus hamulosus*-група и *Carduus nutans*-група, принадлежащи към *Carduus crispus*-тип.
2. С най-висока таксономична стойност за разграничаване на поленовите зърна в поленовите групи са количествените стойности на екваториалния диаметър, полярната ос, височината и ширината на шипчетата.
3. Молекулярно-генетичният анализ на българските представители на род *Carduus* потвърди родствените им връзки и установи 100 % идентичност на секвенциите при видовете *C. nutans* и *C. thoermeri*.
4. Морфологичният анализ доказва, че в планинските местообитания представителите и при двата вида *C. nutans* и *C. thoermeri* са пободливи и с по-голям брой листни дялове, а в морските райони растенията са с най-ниски стойности по повечето морфологични белези.
5. Статистическият анализ на морфологичните измервания доказва, че:
 - Видът *C. thoermeri* е с по-големи размери на стъблото, диаметър на кошничката, дължина и диаметър на дръжката на кошничката, ширина на средните инволукрални листчета над прищъпването, дължина на венчето и на хвърчилката.
 - Липсва разлика в минималните и максимални стойности при брой на листните дялове, дължина на бодлите на крилата, на листата и на средните инволукрални листчета.
6. Анатомичният анализ на качествените белези на листата и стъблата на видовете *C. nutans* и *C. thoermeri* показва идентичен тип структури: бифациален строеж на листата, снопчест строеж на стъблата, аномоцитен и анизоцитен тип устица, два типа трихоми – главести жлезисти и многоклетъчни покривни.
7. Доказва се силно вариране на количествените анатомични листни белези брой устица и брой трихоми между отделните находища на *C. nutans* и *C. thoermeri*, вероятно свързано с екологичната

адаптация, което ги прави белези с недостатъчна таксономична тежест.

8. Кариологичният анализ показва еднакъв диплоиден хромозомен набор при видовете *C. nutans* и *C. thoermeri* – $2n=16$.
9. Видът *C. uncinatus* не е потвърден за българската флора.
10. Предлагаме обединяването на видовете *C. nutans* L. и *C. thoermeri* Wienm. в един вид: *C. nutans* с два подвида – *C. nutans* L. subsp. *nutans* и *C. nutans* L. subsp. *lejophyllus* (*C. thoermeri*).
11. Като стабилни белези за разграничаване на двата подвида се предлагат:
 - Форма на листните дялове;
 - Височина на растенията;
 - Ширина на средните инволукрални листчета над прищъпването;
 - Диаметър на кошничката;
 - Дължина и диаметър на дръжката на кошничката;
 - Дължина на венчето и на хвърчилката.

7. ПРИНОСИ

I. Оригинални научни приноси

1. За първи път е направено светлинномикроскопско и електронномикроскопско изследване на полена на разпространените в българската флора видове от род *Carduus*.
2. За първи път е направено молекулярно-генетично проучване на българските представители от род *Carduus*.
3. За първи път в страната е направен сравнително-морфологичен анализ на всички видове от род *Carduus*.
4. За първи път е направено сравнително-анатомично изследване на листа и стъбла от *Carduus nutans* и *Carduus thoermeri*.
5. Актуализиран е ключа за определяне на българските представители от род *Carduus*.

II. Научни приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е становището на други автори, че полена на видовете от род *Carduus* се отнася към един поленов тип - *Carduus crispus* тип.
2. Потвърждава се наличието на паренхимна обвивка около проводящите снопчета при видовете от род *Carduus*.
3. Кариологичният анализ потвърди еднакъв диплоиден хромозомен набор за видовете *Carduus nutans* и *Carduus thoermeri* ($2n=16$).

III. Научни приноси с приложен характер

1. Оптимизирана е методиката за изготвяне на цитогенетични препарати.
2. Посочени са нови флористични райони на разпространение за 6 вида от род *Carduus*: *C. hamulosus* (Трн, Згп, Рд-с), *C. русноcephalus* (Трн), *C. crispus* (Чм -с, Рд -и, Трн), *C. armatus* (Слв, Рл, Осг), *C. carduelis* (В, Пн), *C. rhodopaeus* (Слв, Трн).
3. Установена е промяна в диапазона на разпространение по надморска височина на видовете *C. kernerii* и *C. hamulosus*.

8. ПУБЛИКАЦИИ

Todorov K., Ivanov D., Dimitrova-Dyulgerova I. 2014. Palynomorphological study of the Bulgarian representatives of genus *Carduus* (Asteraceae). *Phytol. Balcan.*, 20 (2–3): 233-245.

Todorov K., Stoyanov P., Mladenova Ts., Boyadzhiev D., Dimitrova-Dyulgerova I. 2017. Comparative anatomical leaf analyses of *Carduus nutans* L. and *Carduus thoermeri* Wienm. from Bulgaria. *Ecol. Balk.*, 9 (2): 29-40.

Denev I., **Todorov K.**, Kirilova I., Mladenov R., Stoyanov P., Dimitrova-Dyulgerova I. 2018. Genetic diversity of Bulgarian representatives of genus *Carduus* L. (Asteraceae) as revealed by variability in sequences of internal transcribed spacers region. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, (publ. online 9 nov. 2017, 1-10), 32 (2): 387-396. **IF (2016) – 1.059.**

9. УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ

Todorov K., Dimitrova-Dyulgerova I., Mladenov R. Comparative anatomical study on leaves and stems of two species from the genus *Carduus* L. (Asteraceae) in Bulgaria. National PhD Conference on Biology, 01 November 2016, Plovdiv, Bulgaria.

10. ЛИТЕРАТУРА, ЦИТИРАНА В АВТОРЕФЕРАТА

ДЕЛИПАВЛОВ Д., ЧЕШМЕДЖИЕВ И. (РЕД) 2003. Определител на растенията в България. *Академично издателство на АУ*, Пловдив, стр. 405-407.

ЗАКОН ЗА БИОЛОГИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ – Обн. ДВ. бр. 77/09.08.2002 г.

ЗАКОН ЗА ЛЕЧЕБНИТЕ РАСТЕНИЯ – Обн. ДВ. бр. 29/07.04 2000 г.

ИВАНОВА Е., СТАЙКОВА Т., ИРИКОВА Т. 2002. Ръководство за упражненията по генетика. *Пловдивско университетско издание*, стр. 63-64.

КОЖУХАРОВ СТ. (РЕД) 1992. Определител на висшите растения в България. Наука и изкуство, София, стр. 167-169.

НИНОВА Д., ДУШКОВА П. 1977. Структурно-функционални изследвания върху растения от промишлени райони. I. Епидермално-стоматографски анализ на храстови растения в района на КЦМ „Д. Благоев“. *Горскостоп. наука*, 14(6): 32-40.

НИНОВА Д., ДУШКОВА П. 1978 а. Структурно-функционални изследвания върху растения от промишлени райони. II. Епидермално-стоматографски анализ на дървесни растения в района на КЦМ „Д. Благоев“. *Горскостоп. наука*, 15 (1): 3-16.

НИНОВА Д., ДУШКОВА П. 1978 б. Структурно-функционални изследвания върху растения от промишлени райони. III. Сравнителен анализ на листната петура при храстови растения в района на КЦМ „Д. Благоев“. *Горскостоп. наука*, 15 (3): 3-8.

НИНОВА Д., ДУШКОВА П., ТОДОРОВА К., МИЛЧЕВА Т. 1984. Сравнителен анализ на морфологични, анатомични и физиологични изменения на експериментално отгледани дървесни и храстови видове в района на КЦМ „Д. Благоев“. *Съвр. теор. и приложни аспекти на растит. екология*, pp. 503-515.

СТОЯНОВ Н., СТЕФАНОВ Б., КИТАНОВ Б. (РЕД) 1967. Флора на България, т. II. Четвърто преработено издание, изд. *Наука и изкуство*, София, стр. 1120-1123.

СТОЯНОВ Н., СТЕФАНОВ Б. 1948. Флора на България. Трето преработено и допълнено издание. *Изд. Унив. Печ.*, София.

ЧЕРВЕНА КНИГА НА РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ 2015. Растения и гъби. Том 1. БАН и МОСВ, стр. 431, 666.

ADEDEJI O., ILLOH H. C. 2004. Comparative foliar anatomy of ten species in the genus *Hibiscus* Linn. in Nigeria. *New Botanist*, 31: 147-180.

ALVAREZ I, WENDEL J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol.*, 29: 417-434.

ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHÄFFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.

ARAMBARRI A. M., COLARES M. N. 1993. *Lotus corniculatus* L. and *L. tenuis* Waldst. et Kit. (Leguminosae). Anatomy of the leaf. USDA/Agricultural Research Service. *Lotus Newsl.*, 24: 38-40.

ARANO H. 1957. The karyotype analysis and its karyotaxonomic consideration in some genera of subtribe Carduinae. *Jpn J Genet.*, 32(11/12): 323-332.

AZIZI H., SHEIDAI M., NOUROOZI M. 2013. Cytological studies into some species and populations of *Carduus* (Asteraceae) in Iran. *Phytol Balc.*, 19(2): 215-224

BALDWIN B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol Phylogenet Evol.*, 1: 3-16.

BALDWIN B. G., SANDERSON M. J., PORTER J. M., WOJCIECHOWSKI M. F., CAMPBELL C. S., DONOGHUE M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard.*, 82: 247-277.

BORGEN L. 1974. Chromosome numbers of Macaronesian flowering plants. II. *Norweg J Bot.*, 21: 195-210.

CASE S. 1994. Leaf stomata as bio indicators of environmental change. Access Excellence Activities Exchange: *Fellows' Collection*.

CATALAN P., KELLOGG E. A., OLMSTEAD R.G. 1997. Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Mol Phylogenet Evol.*, 8: 150-166.

CLEGG M. T. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proc Natl Acad Sci.*, 90: 363-367.

CORRIAS S. D., VILLA R. 1980. Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 708-713. *Inform Bot Ital.*, 12(2): 131-135.

DAVIS P. H. 1975. *Carduus* L. In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, edited by P. H. Davis. *Edinburgh: Edinburgh University Press*, vol. 5, 420-438.

DESROCHERS A. M., BAIN J. F., WARWICK S. I. 1988A. A biosystematic study of the *Carduus nutans* complex in Canada. *Can J Bot.*, 66: 1621-1631.

DESROCHERS A. M., BAIN J. F., WARWICK S. I. 1988B. The biology of Canadian weeds. 89. *Carduus nutans* L. and *Carduus acanthoides* L. *Can J Pl Sci.*, 68: 1053-1068.

DEVESA J. A. 1980. Numeros cromosomicos para flora espanola: 121-182. *Lagasalia*, 9(2): 249-284.

DOGAN B., DURAN A., HAKKI E. E. 2007. Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. *Ann Bot Fennici*, 44: 353-358.

FAVARGER C. 1965. Notes de caryologie alpine. V. *Bull Soc Neuchatel Sci Nat.*, 92: 13-30.

GARCIA-JACAS N., GARNATJE T., SUSANNA A., VILATERSAMA R. 2002. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Mol Phylogenet Evol.*, 22: 51-64.

GEDIK O., KIRAN Y., ARABACI T., KÖSTEKCI S. 2014. Karyological studies on the annual members of the genus *Carduus* L. (Asteraceae, Cardueae) from Turkey. *Caryologia*, 67(2): 135-139.

GEDIK O., KIRAN Y., ARABACI T., KÖSTEKCI S. 2016. Karyological studies of eight *Carduus* L. (Asteraceae, Cardueae) taxa from Turkey. *Caryologia*, 69(2): 121-127.

GHAFFARI S. M. 1989. Chromosome studies in Iranian Compositae. *Iran J Bot.*, 4(2): 189-196.

GREMAUD M. 1981. Recherches de taxonomie experimentale sur le *Carduus defloratus* L. s. l. (Compositae). I. Donnees taxonomiques. Variation Caryologique. *Rev Cytol Biol Veg Bot.*, 4(1): 1-75.

JAYEOLA A. A., THORPE J. R., ADENEGAN J. A. 2001. Macromorphological and micromorphological studies of the West African *Rhizophora* L. *Feddes Repert.*, 112: 349-356.

KADEREIT J. W., JEFFREY C. (EDS.) 2007. Flowering Plants. Eudicots: Asterales. In Kubitzki K. (Ed.) *The Families and Genera of Vascular Plants*. *Springer*, 8: 132, Berlin.

KAZMI S. M. A. 1964. Revision der Gattung *Carduus* (Compositae). Teil II. *Mitt Bot Staatssaml München*, 5: 279-550.

KIM K. J., JANSEN R. K. 1994. Comparisons of phylogenetic hypothesis among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst Evol.*, 190: 157-185.

KUZMANOV B., GEORGIEVA S., NIKOLOVA M., PENCEVA I. 1981. In Chromosome numbers reports LXXII. *Taxon*, 30: 701-702.

KUZMANOV B., GEORGIEVA S., NIKOLOVA M. 1986. Hromoxomni cisla na balgarski cvetni rastenija. Asteraceae. *Fitologija*, 31: 71-74.

KUZMANOV B., GEORGIEVA S., NIKOLOVA V. 1991. Karyological study of Bulgarian plants from the family Compositae. IV. Tribus Cardueae Cass. *Fitologia*, 39: 3-22.

KUZMANOV B. 1993. Chromosome numbers of bulgarian angiosperms: An introduction to a chromosome atlas of the Bulgarian flora. *Flora Mediterranea*, 3: 19-163.

LIBRADO P., ROZAS J. 2009. DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

LÖVKVIST B., HULTGARD U. M. 1999. Chromosome numbers in southern Swedish vascular plants. *Opera Bot.*, 137: 1-42.

MEHRA P. N., GILL B. S., MEHTA J. K., SIDHU S. S. 1965. Cytological investigations on the Indian Compositae. I. North-Indian taxa. *Caryologia*, 18(1): 35-68.

METCALFE C. R., CHALK L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2. *Clarendon Press*, Oxford.

METCALFE C. R., CHALK L. 1979. Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. v.1. 2nd ed. *Clarendon Press*, Oxford.

METCALFE C. R., CHALK L. 1989. Anatomy of the Dicotyledons. v.2. 2nd ed. *Clarendon Press*, Oxford.

MÖLLER M., CRONK Q. C. B. 1997. Origin and relationships of *Saintpaulia* (Gesneriaceae) based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Am J Bot.*, 84: 956-965.

OLMSTEAD R. G., PALMER J. D. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *Am J Bot.*, 81: 1205-1224.

OLMSTEAD R.G., REEVES P.A. 1995. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Ann Missouri Bot Gard.*, 82:176-193.

PALMER P. G., GERBETH-JONES S. 1986. A scanning electron microscope survey of the epidermis of East African grasses, IV. *Smithson Contr Bot.*, 62: 1-120.

PETROVA A., VLADIMIROV V. 2009. Red list of Bulgarian vascular plants. *Phytol Balc*, 15:63-94.

PETROVA A., VLADIMIROV V. 2010. Balkan endemic in the Bulgarian flora. *Phytol Balc.*, 16(2): 293-311.

PUNT W., HOEN P. P. 2009. The Northwest European Pollen Flora, 70: Asteraceae-Asteroideae. *Rev Palaeobot Palynol.*, 157: 22-183.

RIESEBERG L. H., BECKSTROM-STERMBERG S., DOAN K. 1990. *Helianthus annuus* ssp. *texanus* has chloroplast DNA and nuclear ribosomal RNA genes of *Helianthus debilis* ssp. *cucumerifolius*. *Proc Natl Acad Sci.*, 87: 593-597.

RIESEBERG L.H., SOLTIS D.E. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol Trends Plant.*, 5: 65-84.

RIESEBERG L.H., WENDEL J. F. 1993. Introgression and its consequences in plants. In: Harrison, R. (Ed.), *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford, pp. 70-109.

SALGARE S., ACHARECAR C. 1990. Effect of industrial air pollution from chembur India on the micromorphology of some wild plant. *Adv plant Sci.*, 3(1): 1-7.

SOLTIS D. E., SOLTIS P. S., DOYLE J. J. (EDS.) 1998. Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. *Kluwer Academic*, Boston.

STENGLEIN S. A., COLARES M. N., ARAMBARRI A. M., NOVOA M. C., VIZCAINO C. E., KATINAS L. 2003. Leaf epidermal microcharacters of the Old World species of *Lotus* (Leguminosae: Loteae) and their systematic significance. *Aust J Bot.*, 51: 459-469.

SUSANNA A., GARCIA-JACAS N., SOLTIS D. E., SOLTIS P. S. 1995. Phylogenetic relationships in the tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *Am J Bot.*, 82: 1056-1068.

SUSANNA A., GARCIA-JACAS N., HIDALGO O., VILATERSANA R., GARNATJE T. 2006. The Cardueae (Compositae) Revisited: Insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* Nuclear and Chloroplast DNA Analysis . *Ann Missouri Bot Gard.*, 93(1): 150-171.

TAMAMSCHIAN S. G. 1963. *Carduus* L. In *Flora of the USSR*, edited by Bobrov E. G. and Cherepanov S. K., 28: 4-39. Moscow/Leningrad: *Izdatel'stvo Akademii Nauk, SSSR*.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. 2013. MEGA6: MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS VERSION 6.0. *MOL BIOL EVOL.*, 30: 2725-2729.

TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A., MOORE D. M., VALENTINE D. H., WALTERS S. M., WEBB D. A. 1976 (ED.). *Flora Europaea*. Vol. 4: Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge (UK). *Cambridge University Press*, pp. 220-232.

UPHOF J. C. TH. 1962. Plant Hairs. In: Linsbauer K. (ed.), *Handbuch der Pflanzenanatomie*, pp. 206, Gebrüder Borntraeger, Berlin.

VAN LOON J. C., DE JONG H. 1978. In: Love A, editor. IOPB chromosome number reports. LIX. *Taxon*, 27(1): 56-60.

VAN LOON J. C., SNELDERS H.C.M. 1979. Reports in: Löve Á. (ed.), IOPB Chromosome number reports LXV. *Taxon*, 28: 632-634.

WENDEL J.F., SCHNABEL A., SEELANAN T. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci.*, 92: 280-284.

WODEHOUSE R. P. 1926. Morphology of pollen grain in relation to plant classification. *N Y Bot Gard.*, 27: 145-154.

WODEHOUSE R. P. 1928. The phylogenetic value of pollen-grain characters. *Ann Bot.*, 42: 891-934.

WODEHOUSE R. P. 1935. Pollen grains, their structure, identification and significance in science and medicine: New York, *McGraw-Hill Book Company*, p. 574 (Reprinted, New York, Hafner Publishing, 1959).

Biosystematical study on the genus *Carduus* L. (Asteraceae) in Bulgaria

Krasimir Tihomirov Todorov

Summary

The purpose of the present research work is to study bio-systematically the genus *Carduus* L. in Bulgaria; and also to assess the status of some species, which are a matter of discussion in the terms of taxonomy, by applying traditional and modern biological methods. Subjects of the present work are 14 species from the genus *Carduus* that can be found in Bulgaria. The plants were collected from 15 floristic regions in Bulgaria during the time period of the years 2010-2015. This is the first time of palynomorphological, molecular-genetic and comparative-morphological investigations done with all the species occurring in the country from the genus *Carduus*. The morphology of pollen grains has been described, as they have been divided into pollen groups, basing on the statistical processing of the data received. The highest taxonomic significance for distinguishing the pollen grains in the pollen groups had the quantitative values of equatorial diameter, polar axis, height and width of the spines. The genetic relationship of the species from this genus has been confirmed, and 100% identity of the sequences was found for *C. nutans* L. and *C. thoermeri* Wienm. The analysis of the qualitative anatomical features of leaves and stems in *C. nutans* and *C. thoermeri* showed the same type of structures. There were strong variations in the values of quantitative anatomical leaf features – the number of stomata and the number of trichomes, possibly due to the environmental adaptation. The caryological analysis in *C. nutans* and *C. thoermeri* showed an identical diploid chromosomal set ($2n=16$). On the basis of the results obtained and the review of scientific literary sources, the determination key for the Bulgarian representatives of the genus *Carduus* was updated. We suggest that the species *C. nutans* and *C. thoermeri* should become one species: *C. nutans* with two subspecies – *C. nutans* L. subsp. *nutans* and *C. nutans* L. subsp. *lejobhyllus* (syn. *C. thoermeri*). The strong morphological features that can be used for differentiating the two subspecies are: the height of plants, shape of leaf-lobes, width of the middle involucral bract above the claw, diameter of the capitula, width and diameter of the peduncle, lengths of the corolla and pappus.