

УДК 575.174.015.3:582.734.2

Т.А. Полякова, А.В. Шатохина, М.В. Ширманов, Г.Н. Бондаренко

T.A. Polyakova, A.V. Shatokhina, M.V. Shirmanov, G.N. Bondarenko

ОЦЕНКА ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ У СИБИРСКИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕКЦИИ *CHAMAEDRYON* SER. РОДА *SPIRAEA* L. (ROSACEAE JUSS.) НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ITS-РЕГИОНА

TAXONOMY RELATIONSHIPS EVALUATION OF THE SIBERIAN REPRESENTATIVES OF *SPIRAEA* L. (SECTION *CHAMAEDRYON* SER., ROSACEAE JUSS.) BASED ON THE ITS SEQUENCES POLYMORPHISM

Анализ нуклеотидного полиморфизма ITS региона 9 видов рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) выявил таксоно- и видоспецифические генетические различия (инсерции/делеции, однонуклеотидные замены).

Виды рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) высоко декоративны, имеют множество форм и сортов, медоносы, являются источниками биологически активных веществ. Спиреи произрастают в умеренных зонах Северного полушария, род насчитывает более 100 таксонов в мировой флоре и около 25 таксонов на территории России. Наблюдаемая внутривидовая изменчивость морфологических признаков в роде *Spiraea* (Полякова, 2004), способность близкородственных таксонов к образованию спонтанных гибридов в местах симпатрии из-за отсутствия барьеров для скрещивания обуславливают возникающие неоднозначности и частые ошибки в идентификации таксонов *Spiraea* (Полякова, Шатохина, 2015). Секция *Chamaedryon* Ser. включает в себя наибольшее число видов рода, в том числе неясного таксономического статуса, и гибридов. В Сибири встречаются гибриды *S. aquilegifolia* × *S. media*, реже *S. aquilegifolia* × *S. alpina* (Поляркова, 1939), в Красноярском крае отмечены гибриды *S. hypericifolia* × *S. media* (Положий, 1988). Изредка встречаются особи с промежуточными признаками *S. sericea* × *S. media* (Поляркова, 1939).

Изучение генетической изменчивости и филогении рода *Spiraea* с привлечением ITS в качестве молекулярного маркера активно ведется в течение последнего десятилетия (Zhang et al., 2006; Potter et al., 2007; Huh et al., 2008; Huh, 2012). Но в исследования включены исключительно китайские, североамериканские и корейские виды и, преимущественно, обсуждаются вопросы их филогении. Попытка корейских ученых решить таксономические вопросы в роде *Spiraea* с помощью ITS привела к однозначным результатам (Huh et al., 2008), однако последующее исследование этих же видов показало отсутствие согласованности многих таксонов с морфологией и географическим распространением (Huh, 2012).

Ядерные последовательности ITS зарекомендовали себя как наиболее востребованные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений (Baldwin et al., 1995; Рыжова и др., 2007) благодаря ряду преимуществ, среди которых высокая вариабельность, консервативная протяженность, высокая копияность, двуродительское наследование (Матвеева и др., 2011). Высокая копияность позволяет легко амплифицировать фрагмент ITS из гербарного материала при низком качестве ДНК. А двуродительское наследование обеспечивает идентификацию недавно возникших гибридов (Alvarez et al., 2003).

Целью настоящего исследования является изучение нуклеотидного полиморфизма ITS региона у видов *Spiraea* и оценка его таксономической значимости.

Для анализа были отобраны 17 образцов, составляющих 9 видов *Spiraea*. Кроме того, в исследование включены образцы из Восточно-Казахстанской области и Дальнего Востока, а также виды из секции *Spiraria* Ser. для лучшего понимания таксономических различий на молекулярном уровне.

Точки сбора образцов. *Spiraea chamaedryfolia*: Республика Алтай, Турочакский р-н; окр. г. Новосибирска; *S. flexuosa*: Республика Бурятия, окр. г. Улан-Удэ; *S. trilobata*: Республика Алтай, Турочакский р-н; Республика Алтай, Чемальский р-н; *S. sericea*: Забайкальский край, Могочинский р-н; Ингодинский р-н; Якутия, Олекминский р-н; Хангаласский р-н; *S. salicifolia*: Якутия, Олекминский р-н; Приморский край, Анучинский р-н; *S. hypericifolia*: Восточно-Казахстанская область, Курчумский р-н; *S. elegans*: Амурская область, окр. г. Ерофей Павлович; *S. media*: Амурская область, Благовещенский р-н; *S. humilis*: Хабаровский край, Комсомольский р-н.

Геномная ДНК выделена с использованием модифицированного СТАВ протокола. Для ПЦР использовали наборы GenePak® PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген»). Для амплификации фрагмента ITS оперона использовали праймеры ITS6 и ITS9, разработанные для восточноазиатских видов трибы *Spiraeae* (Potter et al., 2007) и успешно протестированные нами (Polyakova, 2014). Цикл амплификации включал: денатурацию при 94° С в течение 1 минуты, отжиг праймеров при 58° С в течение 50 секунд и элонгацию при 72° С в течение 1 минуты с числом циклов – 30. Полученные пцр-фрагменты были очищены набором реагентов для быстрой элюции ДНК из агарозных гелей Diatom DNA Elution (ООО «Лаборатория Изоген»). Секвенирование ITS фрагментов проводили в ЗАО «Евроген» в обоих направлениях. Сиквенсы были попарно выравнены в программе BioEdit, множественное выравнивание выполнено в программе ClustalW2 с последующей визуальной проверкой спорных позиций на хроматограммах. Эволюционные дистанции анализируемых видов *Spiraea* получены методом максимального правдоподобия с использованием модели Тамура-Нея (Tamura, Nei, 1993). Консенсусное дерево построено с бутстреп-поддержкой в 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Ветви, которые воспроизводились в менее чем 50 % начальной загрузке реплик, были свернуты. Процент реплик деревьев показан рядом с ветвями (Felsenstein, 1985). Все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные, были устранены. Эволюционные исследования выполнены в программе MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Всего в анализе была охвачена 31 нуклеотидная последовательность. Также были привлечены нуклеотидные последовательности близкородственных североамериканских и азиатских видов из международной базы генетических данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). В качестве внешней группы взяты образцы *Physocarpus opulifolia* (L.) Maxim. и *Sorbaria sorbifolia* (L.) A. Braun из подсемейства Spiraeoideae Agardh.

В качестве маркера для оценки таксономических отношений выбран регион ITS, включающий межгенные спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5.8S ядерной рибосомальной ДНК. В результате амплификации для каждого образца были получены фрагменты длиной около 750 п.н., включавшие полноразмерный регион ITS 1-5.8s-ITS 2. После выравнивания длина анализируемого фрагмента ITS насчитывала в целом 663 позиции, из них 577 позиций были консервативными, 79 – переменными, но не информативными, и 66 позиций явились филогенетически-информативными. При этом длины этого фрагмента от вида к виду варьируют от 639 до 648 п.н. (табл. 1). Последовательности изученных образцов разного происхождения, принадлежащих к одному виду, оказались полностью идентичны.

Таблица 1

Протяженность ITS-фрагментов у различных видов *Spiraea*, п.н.

Вид	ITS 1	5.8 s	ITS 2	Общая длина
<i>S. salicifolia</i>	252	167	222	641
<i>S. humilis</i>	252	167	222	641
<i>S. media</i>	253	167	218	639
<i>S. sericea</i>	254	167	218	639
<i>S. chamaedryfolia</i>	254	167	218	639
<i>S. hypericifolia</i>	254	167	227	648
<i>S. trilobata</i>	253	167	225	645
<i>S. flexuosa</i>	254	167	218	639
<i>S. elegans</i>	254	167	218	639

Спейсеры ITS 1 и ITS 2 по протяженности, а также по числу константных, переменных и филогенетически информативных сайтов отличаются незначительно, но у ITS 1 все показатели выше. Для области гена 5.8s характерна ожидаемая консервативность, его длина составила 167 п.н. у всех исследуемых образцов, обнаружено всего 3 переменных сайта. Уровень GC-состава высокий, более 60 % (табл. 2).

Сравнительное изучение фрагментов у изученных видов показало наличие как инделей, так и генных точечных мутаций – трансверсий и транзиций. Инсерции/делеции наблюдались как в области ITS 1, так и ITS 2 (рис. 1, 2). Вставка в три нуклеотида –GCT- в позиции 108–110 обнаружена у видов секции *Spiraria* и полностью отсутствует в секции *Chamaedryon*. Инсерция -TT- в позиции 251–252 наблюдается только у

Таблица 2

Характеристики ITS 1-5.8s-ITS 2 – района рДНК у изученных видов рода *Spiraea*

	ITS 1	5.8s	ITS 2
Выровненная длина, п.н.	252-254	167	218-227
GC состав, %	64,7	56,6	70,3
Число константных сайтов	216	164	197
Число переменных сайтов	43	3	33
Число парсимони-информативных сайтов	35	2	29

близких видов родства *S. chamaedryfolia* s.l., относящихся к секции *Chamaedryon* (ряд 1 – *Chamaedryfoliae* A. Pojark. и ряд 2 – *Elegantes* A. Pojark.) (рис. 1).

Для ITS 2 также характерны 2 инсерции/делеции. В позиции 435–442 обнаружены две видоспецифические инсерции: для всех образцов *S. trilobata* – -CCCCGCG- и для *S. hypericifolia* – -ACCCCGCG-. В позиции 638–642 вставка -TTATG- наблюдается только у видов *S. salicifolia* и *S. humilis*, принадлежащих к секции *Spiraria* (рис. 2). Однонуклеотидные делеции также таксонспецифичны (см. позиции 454 и 477, рис. 2).

Предварительный анализ нуклеотидного полиморфизма ITS региона позволил выявить видоспецифические (аутапоморфные) нуклеотидные замены, или точечные мутации. Так, виды *S. media* и *S. sericea* отличаются 5-ю заменами-трансверсиями. *S. chamaedryfolia* и *S. elegans* имеют по 7 замен – трансверсий и транзиций. *S. flexuosa* отличается от *S. elegans* на 6 позиций, а от трудноотличимого вида – *S. chamaedryfolia* – всего на одну. *S. sericea* можно отличить от *S. media* по 5 заменам, а виды *S. salicifolia* и *S. humilis* дискриминируются по 6 трансверсиям.

По полученным последовательностям ITS был проведен филогенетический анализ, куда в конечном наборе данных были включены 530 позиций. Предварительные данные показали, что в целом молекулярные и морфологические данные согласуются между собой. Виды распределились на филогенетическом дереве (рис. 3) согласно делению на секции, циклы и ряды, описанные Поярковой (1939). Близкородственные таксоны ожидаемо оказались в сестринских субкладах. Так, виды секции *Chamaedryon* Ser. – *S. chamaedryfolia* L., *S. elegans* Pojark., *S. flexuosa* Fisch. ex Cambess. – попали в одну кладу.

	110	120
<i>sal</i> YAK	CGGGACTGCT TGCTGCGCGC	C GACTTCATT --ACTATGTC
<i>sal</i> PRIM	CGGGACTGCT TGCTGCGCGC	C GACTTCATT --ACTATGTC
<i>hum</i> KHAB	CGGGACTGCT CGCTGCGCGC	C GACTTCATT --ACTATGTC
<i>ser</i> YAK1	CGGGACT--- TGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>med</i> AMUR	CGGGACT--- CGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>ser</i> ZAB 1	CGGGACT--- TGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>ser</i> YAK 2	CGGGACT--- CGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>ser</i> ZAB 2	CGGGACT--- TGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>cham</i> ALT 1	CGGGACT--- AGCTGCGCGC	C CAATTCATT T TACTATGTC
<i>cham</i> ALT 2	CGGGACT--- AGCTGCGCGC	C CAATTCATT T TACTATGTC
<i>cham</i> NOV	CGGGACT--- AGCTGCGCGC	C CAATTCATT T TACTATGTC
<i>hyp</i> KAZ	CGGGACT--- CGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>tril</i> ALT 1	CGGGACT--- CGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>tril</i> ALT 2	CGGGACT--- CGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>tril</i> ALT 3	CGGGACT--- CGCTGCGCGC	C GAATTCATT --ACTATGTC
<i>eleg</i> AMUR	CGGGACT--- AGCTGCGCGC	C CAATTCATT T TACTATGTC
<i>flex</i> BUR	CGGGACT--- AGCTGCGCGC	C CAATTCATT T TACTATGTC

Рис. 1. Фрагменты последовательностей спейсера ITS 1 после множественного выравнивания у различных видов *Spiraea*.

		430	440	450	460	470	480
<i>sal</i> YAK	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCTC	CCT-CCTTCC	GAGAGCGGCC	GCGGGG-GGA	
<i>sal</i> PRIM	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCTC	CCT-CCTTCC	GAGAGCGGCC	GCGGGG-GGA	
<i>hum</i> KHAB	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCTC	CCT-CCTTCC	GAGAGCGGCC	GCGGGG-GGA	
<i>ser</i> YAK1	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAC	CCT-CTCTTT	GGGAGTGA CT	GCGGGGCGGG	
<i>med</i> AMUR	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAC	CCT-CTCTTT	GGGAGTGA CT	GCGGGGCGGG	
<i>ser</i> ZAB 1	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAC	CCT-CTCTTT	GGGAGTGA CT	GCGGGGCGGG	
<i>ser</i> YAK 2	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAC	CCT-CTCTTT	GGGAGTGA CT	GCGGGGCGGG	
<i>ser</i> ZAB 2	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAC	CCT-CTCTTT	GGGAGTGA CT	GCGGGGCGGG	
<i>cham</i> ALT 1	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAT	CCCTCTCTCTC	GAGAGCGGATC	GCGGGG-GGA	
<i>cham</i> ALT 2	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAT	CCCTCTCTCTC	GAGAGCGGATC	GCGGGG-GGA	
<i>cham</i> NOV	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAT	CCCTCTCTCTC	GAGAGCGGATC	GCGGGG-GGA	
<i>hyp</i> KAZ	ACACGCCGTT	GCCCACCCCG	CGCCCCGCAC	CCA ACTCTTT	GGGAGCGGCC	GCGGGGCGGG	
<i>tril</i> ALT 1	ACACGCCGTT	GCCC-CCCCG	CGCCCCGCCTC	CCT-CTTGTT	GGGAGCGAAC	GCGGGGCGGG	
<i>tril</i> ALT 2	ACACGCCGTT	GCCC-CCCCG	CGCCCCGCCTC	CCT-CTTGTT	GGGAGCGAAC	GCGGGGCGGG	
<i>tril</i> ALT 3	ACACGCCGTT	GCCC-CCCCG	CGCCCCGCCTC	CCT-CTTGTT	GGGAGCGAAC	GCGGGGCGGG	
<i>eleg</i> AMUR	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAT	CCCTCTCTCTC	GAGAGCGACC	GCGGGG-GGA	
<i>flex</i> BUR	ACACGCCGTT	GCCC-----	--CCCCGCAT	CCCTCTCTCTC	GAGAGCGATC	GCGGGG-GGA	

		640	650				
<i>sal</i> YAK	CGCGCCCTTA	TGGGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>sal</i> PRIM	CGCGCCCTTA	TGGGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>hum</i> KHAB	CGTGCCCTTA	TGGGCGAGGA	GCTTTC AAC				
<i>ser</i> YAK1	TGCACCT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>med</i> AMUR	TGCACCT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>ser</i> ZAB 1	TGCACCT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>ser</i> YAK 2	TGCACCT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>ser</i> ZAB 2	TGCACCT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>cham</i> ALT 1	CGCACAT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>cham</i> ALT 2	CGCACAT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>cham</i> NOV	CGCACAT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>hyp</i> KAZ	CGCACCC---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>tril</i> ALT 1	CGCACAC---	--AGTGCGGA	GCCTTCAAC				
<i>tril</i> ALT 2	CGCACAC---	--AGTGCGGA	GCCTTCAAC				
<i>tril</i> ALT 3	CGCACAC---	--AGTGCGGA	GCCTTCAAC				
<i>eleg</i> AMUR	CGCACAT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				
<i>flex</i> BUR	CGCACAT---	--AGTGCGGA	GCTTTC AAC				

Рис. 2. Фрагменты последовательностей спейсера ITS 2 после множественного выравнивания у различных видов *Spiraea*.

Таким образом, в ITS регионе у видов *Spiraea* обнаружены видоспецифические однонуклеотидные замены, 4 инсерции/делеции длиной в 2–8 нуклеотидов, а также однонуклеотидные делеции, имеющие таксономическое значение на уровне секций, циклов и рядов. Число полиморфных сайтов, равное 5–6, подтверждает видовую принадлежность. Выявленная степень генетических различий в ITS регионе у разных видов демонстрирует пригодность ITS-маркера для описания внутривидового полиморфизма и видоидентификации *Spiraea*. В дальнейшей работе необходимо расширить выборку с целью выявления гибридных особей и уточнения таксономического статуса отдельных образцов.

Авторы благодарны за помощь в сборе материала своим коллегам Д.В. Политову, зав. лабораторией популяционной генетики ИОГен РАН, Е.А. Мудрик, с.н.с. лаборатории популяционной генетики ИОГен РАН, Е.В. Банаеву, зам. директора по науке ЦСБС СО РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№15-04-03093 и 15-44-05103), а также Программы Президиума РАН «Биоразнообразие природных систем», Подпрограмма «Генофонды живой природы и их сохранение».

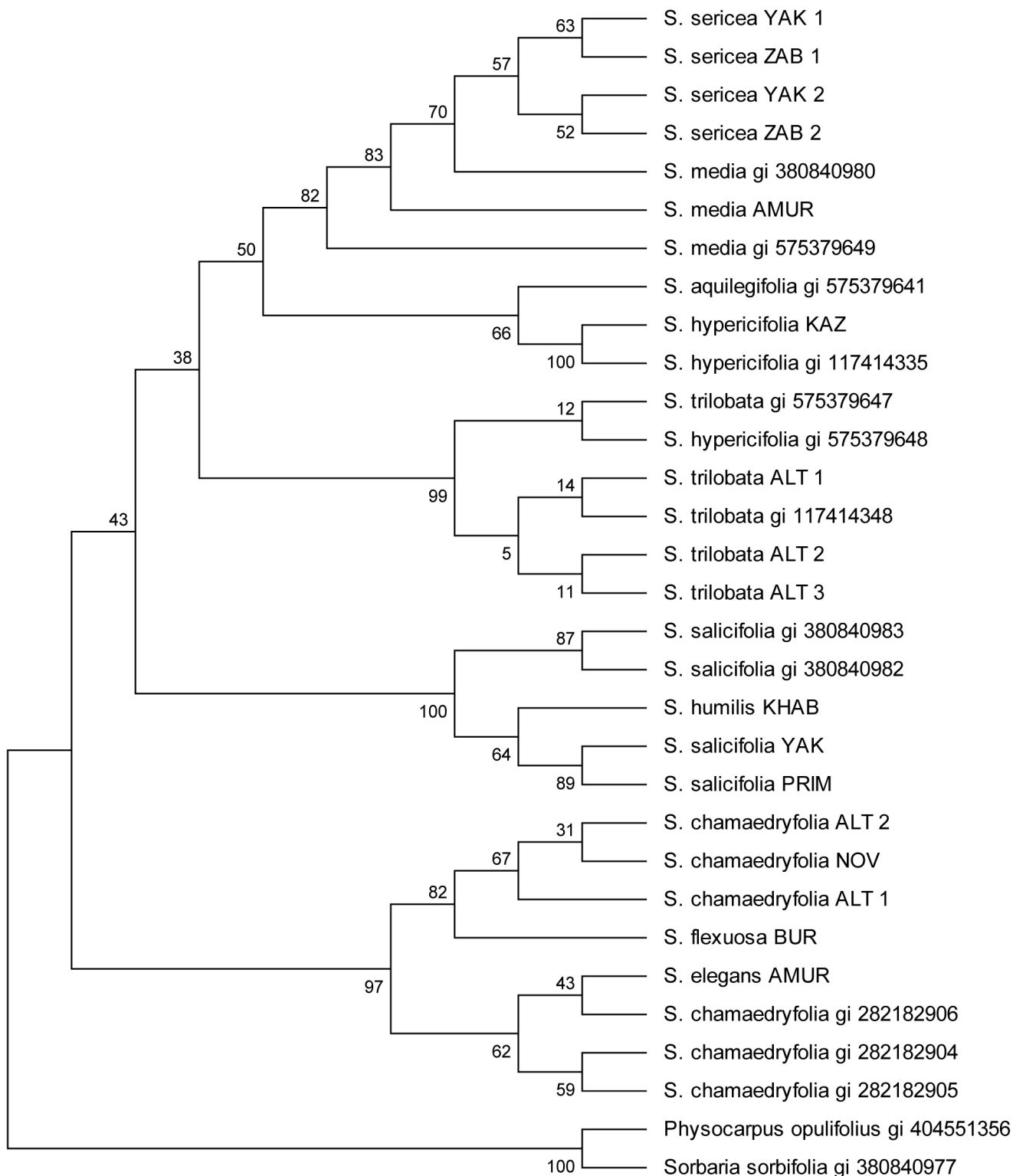


Рис. 3. Филогенетическое дерево видов рода *Spiraea*, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей региона ITS с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood).

ЛИТЕРАТУРА

- Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А.** Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика, 2011. – Т. IX, №1. – С. 32–43.
- Положий А.В.** *Spiraea* L. – Таволга / Флора Сибири. Т. 8: Rosaceae. – Новосибирск: Наука, 1988. – С. 10–20.
- Полякова Т.А.** Внутривидовая изменчивость дальневосточных и сибирских видов рода *Spiraea* L. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2004.

Полякова Т.А., Шатохина А.В. Филогенетические взаимоотношения российских видов рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) по морфологическим и молекулярным данным // 50 лет без К.И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений: Материалы международной конференции (2–6 февраля 2015 г., Москва) / Ред. Тимонин А.К. – М.: МАКС Пресс, 2015. – С. 263–265.

Поляркова А.И. Подсемейство Spiraeoideae Agardh // Флора СССР. Т. 9 / Под. ред. В.Л. Комарова. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1939. – С. 279–318.

Рыжова Н.Н., Бурляева М.О., Кочиева Е.А., Вишнякова М.А. Использование ITS-последовательностей для оценки таксономических отношений у представителей трибы *Viciae* (Adans.) Bronn сем. Fabaceae Lindl. // Экологическая генетика, 2007. – Т. V, №3. – С. 5–14.

Alvarez I.A. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference / Alvarez I.A., Wendel J.F. // Molec. Phyl. Evol., 2003. – Vol. 29, No. 3. – P. 417–434.

Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Missouri Bot. Gard., 1995. – Vol. 82. – P. 247–277.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.

Huh M.K., Huh H.W., Lee S.Y. A Taxonomic Study of the Genus *Spiraea* in Korea Using Sequences of ITS // Journal of Life Science, 2008. – Vol. 18, No. 5. – P. 694–700.

Huh M.K. Analysis of the Phylogenetic Relationships in the Genus *Spiraea* based on the Nuclear Ribosomal DNA ITS Region // Journal of Life Science, 2012. – Vol. 22, No. 3. – P. 285–292.

Polyakova T.A. Nuclear ribosomal DNA ITS region variability in the genus *Spiraea* from Asian Russia // Molecular Phylogenetics: Contributions to the 4th Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics» (Moscow, Russia, September 23–26, 2014). – Moscow: TORUS PRESS, 2014. – P. 58.

Potter D., Still S.M., Grebenc T., Ballian D., Božič G., Franjic J., Kraigher H. Phylogenetic relationships in tribe *Spiraeae* (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data // Pl. Syst. Evol., 2007. – Vol. 266. – P. 105–118.

Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution, 1993. – Vol. 10. – P. 512–526.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Molecular Biology and Evolution, 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.

Zhang Zh., Fan L., Yang J., Hao X., Gu Zh. Alkaloid polymorphism and ITS sequence variation in the *Spiraea japonica* complex (Rosaceae) in China: traces of the biological effects of the Himalaya-Tibet Plateau uplift // American Journal of Botany, 2006. – Vol. 93, No. 5. – P. 762–769.

SUMMARY

Analysis of nucleotide polymorphism in ITS region of 9 *Spiraea* species (Rosaceae) has revealed taxon- and species-specific genetic differences (insertions / deletions, single nucleotide substitutions).