

УДК 582.929.4:581.4:581.165.51

Генетические и морфологические особенности южно-сибирских популяций *Mentha arvensis* L.

Genetic and morphological traits of South-Siberian populations *Mentha arvensis* L.

О. В. Шелепова^{1, 2}, М. В. Семенова², И. А. Шанцер², Н. Ю. Степанова²

O. V. Shelepova, M. V. Semenova, I. A. Schanzer, N. U. Stenanova

¹НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. М. В. Сусина Минздрава России, e-mail: shelepova-olga@mail.ru

²Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, e-mail: lab-physiol@mail.ru

Реферат. Обобщены данные изучения генетических и анатомо-морфологических признаков *Mentha arvensis* L. южно-сибирских и восточно-европейских популяций, а также дальневосточных популяций *Mentha canadensis* L. Отмечено, что иерархический кластерный анализ 9 количественных и 3 качественных морфологических признаков и фрагментарный анализ ДНК (по составу ISSR маркеров) не выявил существенных различий между восточно-европейскими и южно-сибирскими популяциями *M. arvensis* и свидетельствует о слабой генетической и морфологической дифференциации популяций. Полученные результаты подтверждают существование контактов между *M. arvensis* и *M. canadensis* на территории Южной Сибири.

Summary. The study of genetic and anatomical and morphological characters provides data *Mentha arvensis* L. Southern Siberia and Eastern European populations, as well as Far Eastern populations *Mentha canadensis* L. It is noted that a hierarchical cluster analysis of 9 quantitative and 3 qualitative morphological characters and fragmented DNA analysis (in composition of ISSR markers) revealed no significant differences between Eastern European and South Siberian populations of *M. arvensis* and indicated a weak genetic and morphological differentiation of populations. At the same time, the results confirm the existence of contacts between *M. arvensis* and *M. canadensis* in South Siberia.

Введение

Mentha arvensis L. – мята полевая – один из наиболее широко распространенных видов рода, встречается во многих регионах Европы и Азии. В нашей стране она распространена повсеместно в европейской части, Урале и Сибири как обычное растение (Губанов и др., 2004). Отличается высокой генетической изменчивостью и полиморфизмом, а также способностью к образованию гибридных форм с другими видами мяты, такими как *Mentha longifolia* (L.) Huds. и *Mentha aquatica* L. Анатомические и морфологические отличия (габитус растения, форма листа и соотношение длины к ширине листа, форма чашечки и ее зубцов (основной диагностически значимый признак) позволяют выделить 12 разновидностей вида (Макаров, 1972).

Наиболее генетически близким видом к *M. arvensis* является *M. canadensis* (синоним *M. arvensis* var. *piperascens* Malinv. ex. Holmes). Наиболее надежным морфологическим признаком видового разделения мят, согласно В.В. Макарову (1972) и В.М. Доронькину (1997) может служить форма чашечки и ее зубцов: у *M. arvensis* они треугольные, на конце туповатые, реже островатые (но никогда не бывают остистыми), короткие (особенно заметно при плодоношении, здесь зубцы могут быть короче трубки в 3–5 раз), не превышающие бутоны.

Целью настоящей работы было изучение генетической и морфологической изменчивости растений *M. arvensis* восточно-европейских и южно-сибирских популяций и *M. canadensis* дальневосточных популяций, с помощью фрагментного анализа ДНК, а также по морфологическим признакам. Для изучения полиморфизма ДНК мы использовали ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) маркеры, ранее хорошо зарекомендовавшие себя для исследования внутривидовой изменчивости и гибридизации в роде *Mentha* (Семенова и др., 2014; Шелепова и др., 2014; Schanzer et al., 2012).

Материалы и методы

В исследования были включены образцы *M. arvensis* из географически удаленных друг от друга локальных восточно-европейских популяций (Московская, Владимирская, Калужская области и Республика

Коми, г. Сыктывкар), южно-сибирской популяции (Республика Хакасия, Алтайский р-н), образцы Дальневосточной популяции (Приморский край, Хасанский р-н). Список местонахождений, сокращенное обозначение локальных популяций и число образцов, изученных в каждой популяции, приведены в таблице 1. Растения собирали в фазу цветения и завязывания семян, из каждой популяции брались от 6 до 18 побегов типичных растений *M. arvensis* через каждые 5–200 м в зависимости от размера и плотности популяции. Все образцы определены авторами с последующей проверкой в гербарии ГБС РАН (МНА), гербарные образцы хранятся в гербарии лаборатории экологической физиологии и иммунитета растений ГБС РАН.

Таблица 1

Описание популяций *Mentha arvensis* и *Mentha canadensis*, взятых для исследования

Популяция	Место сбора	Количество образцов
М	Московская область, Раменский р-н, окрест. ст. Бронницы, (N55°31', E38°22')	3
К	Калужская область, Жуковский р-н, дер. Огороково (Трясь), (N55°07', E36°60')	2
F	Владимирская область, Ковровский р-н, пойма реки Клязьма (N56°37', E41°27')	3
Sr	Республика Коми, Городской округ Сыктывкар, вдоль рек Сысола и Вычегда (N61°41', E50°50')	3
Hr	Республика Хакасия, Алтайский р-н, пойма реки Абакан (N53°33', E91°14')	5
DV	Приморский край, Хасанский р-н, побережье Астахова и бухта Витязь (N42°37', E131°11')	3

Для изучения изменчивости морфологических признаков использовали количественные и качественные признаки вегетативных и генеративных частей растений: длина и ширина листовой пластинки, расстояние от основания листа до самой широкой его части, длина трубки чашечки и ее зубцов, длина и ширина эремов, соотношение длины чашечки к длине зубца, соотношение длины трубки чашечки к длине ее зубца, опушенность стебля, тип роста и ветвистость стебля. Биометрический анализ проводили с использованием цифрового микроскопа KEYENCEVHX-1000E. Статистический анализ морфологических признаков выполнен в программе PAST v. 3.0 (Hammer et al., 2001).

ДНК выделяли СТАВ методом (Doyle, 1987) из сухих листьев. ISSR-праймеры, использованные нами для постановки ПЦР, синтезированы и очищены в РААГ фирмой Syntol Ltd (Москва, Россия). Семь ISSR-праймеров, выбранных для постановки ПЦР, приведены в таблице 2. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 1мкл ДНК, 20 пикомолей праймера и 4 мкл готового реакционного микса (Диалат Лтд., Москва). ПЦР с предварительной денатурацией (95 °С, 3 мин.) проводили в амплификаторе DNA Engine Dyad (Biorad Ltd., США) в течение 35 циклов в режиме: денатурация при 94 °С – 30 сек., отжиг при соответствующей температуре – 30 сек., элонгация при 72 °С – 40 сек. + прибавление 2 сек. на каждый цикл.

Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 1,7%-м агарозном геле (Amresco Inc., США) в 0,5-кратном трис-боратном буфере с окрашиванием бромидом этидия (0,5 мкг/мл) при 90В и

Таблица 2

Список ISSR праймеров, использованных для постановки ПЦР

Праймер	Последовательность
M2	(AC) ₈ (C/T)G
M3	(GA) ₈ (C/T)C
M4	(AG) ₈ YC
M8	(GTG) ₅
M12	(CA) ₆ (A/G)(C/T)
UBC 840	(GA) ₈ AYT
UBC855	(AC) ₈ CYT

фотографировали с помощью гель-документирующей системы GelDoc-It (UVP, США). Полученные фотографии гелей анализировали в программе Cross Checker 2.91 (Buntjer, 2000). В результате анализа была получена бинарная матрица присутствия/отсутствия фрагментов одинаковой длины, которая подвергалась дальнейшему анализу. Матрица присутствия/отсутствия фрагментов была проанализирована несколькими методами. Кластерный анализ (методом невзвешенных парно-групповых средних, UPGMA) с использованием меры сходства Жаккара был проведен в программе PAST (Hammer et al., 2001).

Результаты и обсуждение

M. arvensis – многолетнее ветвистое растение с лежащим до половины своей длины (от 15 до 20 см) или

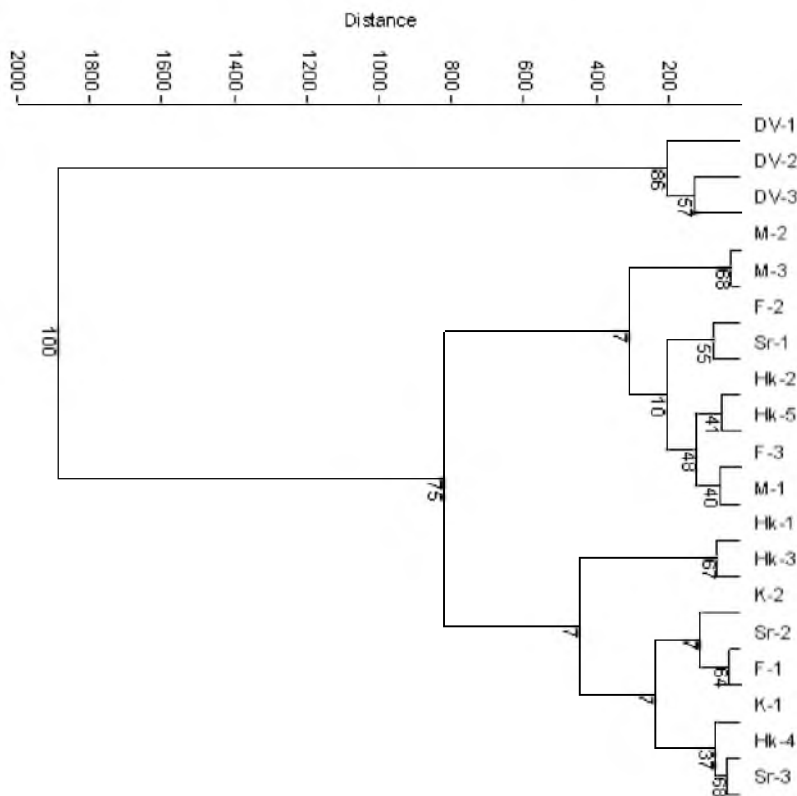


Рис. 1. Результаты кластерного анализа образцов *M. arvensis* по морфологическим признакам. Условные обозначения: М – Московская популяция; К – Калужская популяция; F– Владимирская популяция; Sr – популяция из Республики Коми; Hk – (Хакасская популяция; DV – Дальневосточная популяция.

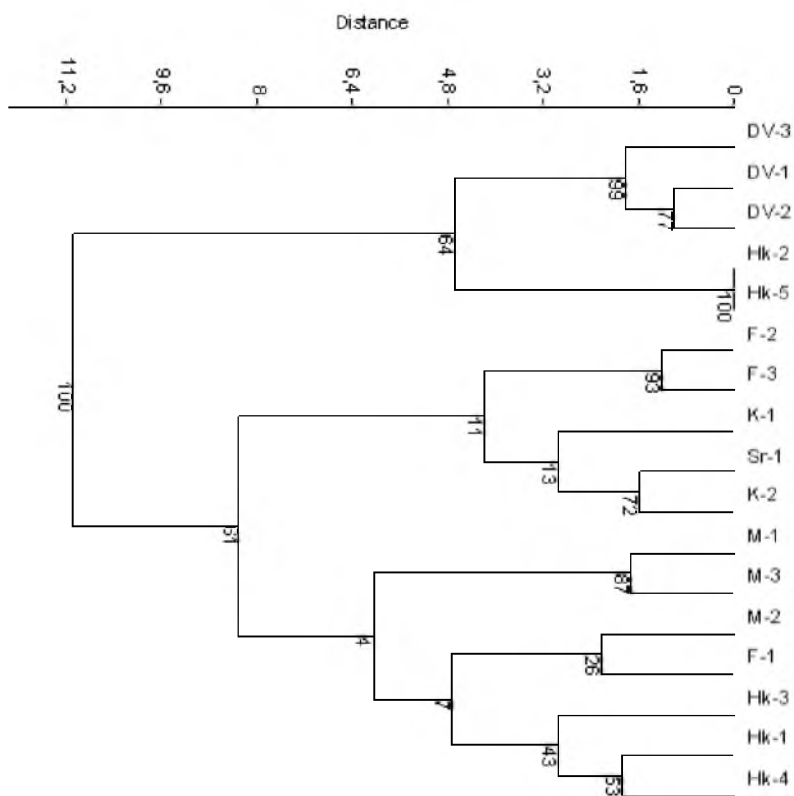


Рис. 2. Результаты кластерного анализа образцов *M. arvensis* по составу полиморфных ISSR-маркеров. Условные обозначения: М – Московская популяция; К – Калужская популяция; F– Владимирская популяция; Sr – популяция из Республики Коми; Hk – (Хакасская популяция; DV – Дальневосточная популяция.

прямостоящим восходящим стеблем, слабо опушенным, с практически отсутствующей антоциановой окраской. Листья его эллиптические с очень слабой опушенной верхней стороной на коротких черешках, верхние листья сидячие, с неглубокой пильчатой зубчатостью края, заостренным кончиком и клиновидным основанием (отсутствует антоциановая окраска, зеленая окраска средней степени). Цветки розово-фиолетовой окраски (лиловой) находятся в многоцветковых, шаровидных ложных мутовках в пазухах верхних листьев, на волосистых цветоножках; чашечка колокольчатая негусто опушенная с треугольными короткими острыми прямостоящими зубцами; венчик широкотрубчатый, опушен редкими волосками, лиловый; тычинки длиннее трубки венчика или значительно короче (недоразвиты).

Кластерный анализ (метод Варда) изменчивости 9 количественных и 3 качественных морфологических признаков показал, что изученные популяции четко подразделяются на два кластера с коэффициентом подобия 0,92, в один из которых входят только дальневосточные популяции *M. canadensis*, а во второй – популяции *M. arvensis* (рис. 1). Второй кластер разделился на два субкластера, при этом южно-сибирские популяции разделились между ними. В пределах одной локальной популяции *M. arvensis* (Нк) часто встречались несколько вариантов формы чашечки, длины трубки и зубцов чашечки цветка, иерархический дисперсионный анализ по указанным выше количественным признакам не показал наличие статистически достоверных различий ($p < 0,01$) как между отдельными южно-сибирскими популяциями, так и между ними и восточно-европейскими популяциями. Дендрограмма наглядно демонстрирует высокую степень сходства по морфологическим признакам между южно-сибирскими и восточно-европейскими популяциями.

Основной фонд продуцируемого мятой эфирного масла формируется в железистом аппарате растения. Это специфическая по своей структуре и функциональной диагностике система. Наибольшая плотность секреторных железок наблюдается на листьях, она возрастает от листьев нижнего яруса к листьям верхнего яруса. Значительный полиморфизм *M. arvensis* позволяет предположить, что для растений из географически разобщенных популяций также будет характерно варьирование параметров железистого аппарата. У *M. canadensis* количество секреторных железок на абаксиальной (1464 ± 87 шт/см²) и адаксиальной (1411 ± 96 шт/см²) поверхностях листа в 1,6–2,6 раза больше, чем у растений *M. arvensis*. При этом никакого деления выборок восточно-европейских популяций по этому признаку не наблюдается: популяция М – 598 ± 42 и 556 ± 38 шт/см², популяция F – 684 ± 40 и 595 ± 28 шт/см², популяция К – 641 ± 25 и 513 ± 33 шт/см², популяция Sr – 555 ± 39 и 558 ± 29 шт/см². Однако у растений *M. arvensis* популяций Нк по данному признаку наблюдается достоверное ($p < 0,05$) отличие – количество секреторных железок на обеих поверхностях листа (897 ± 35 и 889 ± 40 шт/см²) в 1,2–1,6 раза больше чем аналогичный показатель у растений восточно-европейских популяций.

Исследование морфологии семян растений *M. arvensis* и *M. canadensis* из географически разобщенных популяций показало существенные отличия. Так, размеры эремов *M. arvensis* восточно-европейских популяций (Sk и M) варьировали от 834,8 до 882,4 мкм длина, от 485,9 до 521,3 мкм ширина. Окраска семян была палево-коричневая, блестящая или со слабым блеском. Их форма овальная и овально-яйцевидная, на вентральной стороне клиновидная с маленьким базальным рубчиком. Эремы на верхушке тупо закругленные. Поверхность мелкосетчатая, скульптура эремов ячеистая, образованная продолговатыми клетками со слабо утолщенными стенками, поверхность большинства клеток ямчатая.

Эремы растений *M. arvensis* южно-сибирских популяций (Нк) морфологически сходны с эремами *M. canadensis* (DV), только были несколько больших размеров – 898,6 (Нк) и 869,3 (DV) мкм длина, 550,1 (Нк) и 541,3 (DV) мкм ширина, палево-коричневые, овальной формы. Поверхность – крупносетчатая, скульптура крупно ячеистая с одновременным присутствием тетра-, пента-, гекса- и октогональных клеток с выпуклыми стенками и четко фиксируемыми узлами сочленения.

Результаты морфометрического исследования восточно-европейских и южно-сибирских популяций *M. arvensis* позволяют прийти к выводу, что о слабой морфологической дифференциации популяций. Растения 5 локальных популяций Республики Хакасия отличались от растений восточно-европейских популяций только количеством секреторных железок на листьях и ультраскульптурой поверхности эремов. Чтобы попытаться понять причины столь слабой дифференциации, мы провели молекулярно-генетическое исследование с использованием фрагментного анализа ДНК.

Оценку межпопуляционной изменчивости проводили с помощью фрагментного анализа их ДНК. Результаты анализа этой матрицы в программе PAST методом иерархического кластерного анализа ISSR фрагментов представлены на рис. 2. Образцы образовали два основных кластера. В первый, более дистальный, с 64%-м индексом бутстреп-поддержки вошли все растения *M. canadensis* из дальневосточной популяции

и два образца *M. arvensis* хакасских популяций (образцы Нг-2 и Нг-5), во второй – все остальные растения. Хотя образцы из отдельных локальных популяций имеют тенденцию группироваться недалеко друг от друга, в целом, никакой определенной закономерности в их распределении не наблюдается. Так, внутри второго кластера, образующего общую полиморфную группу, выделяются два субкластера: один, состоящий из растений *M. arvensis* популяции F (кроме образца F-1), K и Sr, второй – из растений из Московской (популяции М-1, М-2 М-3), Владимирской (популяция F-1) областей и трех хакасских популяций (Нк-1, Нк-3, Нк-4).

Анализ ISSR маркеров оказался подходящим методом для изучения генетического полиморфизма южно-сибирских и восточно-европейских популяций *M. arvensis*, так как позволил получить порядка 95 фрагментов ДНК, большинство из которых оказались полиморфными. Вместе с тем, прямолинейный подход к анализу этих данных не позволил сделать однозначных выводов о генетических особенностях южно-сибирских популяций *M. arvensis*. Только образцы двух локальных популяций Республики Хакасия оказались несколько отличающимися по составу ISSR маркеров от остальных популяций.

Байесовский анализ в программе Structure позволил с высокой вероятностью разделить исследуемую выборку на 2 генетические группы. Первая самая большая группа включает в себя растения *M. arvensis* восточно-европейской части России (Московской, Владимирской и Калужской областей), Республики Хакасии и Коми, причем основная часть образцов относится к этой группе с вероятностью 100 %, кроме Нк-2 и Нк-5, которые имеют смешанную структуру (до 30 % ампликонов, характерных для *M. canadensis*). Ко второй группе относятся образцы *M. canadensis* из природной флоры Дальнем Востоке.

В целом, можно констатировать, что изучение генетических особенностей южно-сибирских популяций *M. arvensis* требует дополнительного исследования и подтверждения с использованием других, в первую очередь, хлоропластных маркеров. Наши результаты подтверждают существование контактов между *M. arvensis* и *M. canadensis* на территории Южной Сибири, которые, вероятно, происходили в прошлом и следы которых сохранились в генетической структуре некоторых популяций.

Благодарности. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-00401.

ЛИТЕРАТУРА

Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 3: Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. – 133 с.

Доронькин В. М. *Mentha* L. Флора Сибири / Под ред. Л.И. Малышева. – Новосибирск, 1997. – Т. 11. – С. 222–225.

Макаров В. В. Дикорастущие мяты СССР: дис... канд. биол. наук. – М.: ГБС РАН, 1972. – 179 с.

Семёнова М. В., Шапцев И. А., Шелепова О. В. Изменчивость растений рода *Mentha* L. по данным фрагментного (ISSR) анализа ДНК // Растительность Восточной Европы и Северной Азии: Материалы Междунар. науч. конф. – Брянск, 2014. – С. 126.

Шелепова О. В., Воронкова Т. В., Кондратьева В. В., Семенова М. В., Бидюкова Г. Ф., Олехнович Л. С. Фенологические и фитохимические различия *Mentha arvensis* L. и *Mentha canadensis* L. // Изв. РАН. Сер. биол., 2014. – № 1. – С. 1–5.

Buntjer J. B. CrossChecker: Computer Assisted Scoring of Genetic AFLP Data. Plant and Animal Genome Conference VIII, San Diego, 2000. URL.: <http://www.intl-pag.org/pag/8/abstracts/pag8664.html>.

Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull., 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.

Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. // Palaeontologia Electronica, 2001. – Vol. 4 (1, 4). – P. 9.

Schanzer I. A., Semёнова М. В., Шелепова О. В., Воронкова Т. В. Genetic diversity and natural hybridization in populations of clonal plants of *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) // Wulfenia, 2012. – Vol. 19. – P. 131–139.