

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТЕНИЙ И ХЕМОСИСТЕМАТИКА

УДК 582.998:577.21+631.527.5

### Гибридогенная активность рода *Erigeron* sect. *Conyza*

### Hybridogenic activity of genus *Erigeron* sect. *Conyza*

Галкина М. А., Виноградова Ю. К.

Galkina M. A., Vinogradova Yu. K.

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, г. Москва, Россия. E-mail: mawa.galkina@gmail.com, gbsad@mail.ru

Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin of Russian Science Academy, Moscow, Russia

**Реферат.** Была изучена гибридогенная активность представителей рода *Erigeron* sect. *Conyza* в Южной Европе молекулярно-генетическим методом с использованием ISSR-анализа. Инвазионный *E. bonariensis* имеет очень низкую гибридогенную активность, а *E. sumatrensis* и *E. canadensis* могут гибридизировать друг с другом. Представленность гибридов и бэккроссов пока незначительна.

**Summary.** Hybridogenic activity of plants of the genus *Erigeron* sect. *Conyza* in Southern Europe was studied by a molecular genetic method using ISSR-analysis. Invasive *E. bonariensis* has very low hybridogenic activity, and *E. sumatrensis* and *E. canadensis* can hybridize with each other. The representation of hybrids and backcrosses is still insignificant.

В Европе натурализовались несколько видов секции *Conyza* рода *Erigeron*. Это *E. bilbaoanus* (Remy) Cabrera, *E. blakei* Cabrera, *E. bonariensis* L. (= *E. ambiguus* DC), *E. canadensis* L., *E. sumatrensis* Retz., *E. floribundus* (Kunth) Sch. Bip.) и как эфемерофит отмечен *E. trilobus* (Decne) Boiss (Виноградова, 2012). *E. canadensis*, согласно базам данных DAISIE и GT IBMA, входит в первую десятку наиболее агрессивных инвазионных видов Европы. Центром распространения видов рода *Erigeron* однозначно можно назвать Центральную и Южную Америку, а все таксоны секции *Conyza* на территории бассейна Средиземного моря являются чужеродными.

В 2017 г. нами были изучены морфологические особенности и экологическая приуроченность *E. canadensis*, *E. bonariensis* и *E. sumatrensis* в Италии, Испании и Португалии. На основании анализа морфологических признаков (формы соцветия, диаметра корзинок, характера опушения побегов и листьев) несколько растений не удалось отнести к какому-либо виду, поскольку они имели промежуточные параметры (чаще всего с сочетанием признаков двух видов – *E. canadensis* и *E. sumatrensis*, очень широко распространенных в Южной Европе). Вероятнее всего, данные особи являются гибридами или возвратными гибридами (бэккроссами) инвазионных видов *E. canadensis* и *E. sumatrensis*. Ранее уже был описан гибрид этих видов – *Conyza* × *rouyana* Sennen (= *C.* × *mixta* Fouc. et Neyr). Однако нельзя исключать, что морфологическое отличие нескольких особей могло быть вызвано влиянием неблагоприятных экологических условий или механическими воздействиями (например, повреждением растения или сильным загрязнением местообитаний). Что касается вида *E. bonariensis*, то нетипичным было одно растение, собранное в Италии в Помпеях: эта особь имела розовые, а не белые цветки в корзинах и произрастала поблизости от местообитаний других видов *Erigeron*, поэтому теоретически можно предположить его гибридогенное происхождение.

Для уточнения причин морфологических отличий мы провели молекулярно-генетические исследования с использованием фрагментного анализа межмикросателлитных участков ДНК (Inter Simple Sequence Repeats – ISSR). Выделение ДНК проводилось СТАВ-методом (Rogers, Bendich, 1985) из 34 гербарных образцов (табл.). Оценку гибридной природы образцов проводили с использованием фрагментного анализа. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе DNA En-

gine Dyad Peltier Thermal Cycler (Biorad, США). Для каждого праймера использовалась разная температура отжига. Предварительная денатурация проходила в течение 3 мин при 94 °С. Элонгация длилась 30 с при 94 °С, потом 30 с при 55 °С с (CAG)5 [M7], при 45 °С с (GA)8 YG [UBC 841], при 50 °С в случае с праймером (AC)8 (C/T)G [M2] и при 60 °С – с праймером DBD(AC)7 [UBC 889]. Затем элонгация проходила в течение 1 мин при 72 °С. Описанный процесс повторялся 35 раз, причем в каждый последующий раз элонгация длилась на 2 с дольше при 72 °С. Завершающей стадией была элонгация 3 мин при 72 °С. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7%-м агарозном геле с добавлением бромида этидия в 1×TBE-буфере в течение 1 ч. Затем фрагменты ДНК были сфотографированы в ультрафиолетовом свете (рис. 1). Для определения их длин использовался маркер молекулярной массы 100bp+. Обработку полученных данных производили в программе Cross Checker (Buntjer, 2000). Полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие определенного фрагмента рассматривалось как 1 или 0 соответственно. Полученная матрица была обработана в программе Structure 2.2, и дополнительно был проведен анализ данных методом Байеса (MCMC – Markov Chain Monte Carlo) в программе NewHybrids. Программа оценивает гибридный статус анализируемых растений по соответствию распределения фрагментов ДНК у предполагаемых родительских видов, гибридов первого и второго поколений и возвратных гибридов (бэкриссов). В качестве внешней группы для анализа использованы особи *Erigeron canadensis* с территории Главного ботанического сада РАН в г. Москве.

Таблица

Местонахождения изученных растений рода *Erigeron* секции *Conyza*

Номер образца	Таксон	Страна	Местонахождение	
1 (a, b, c)	<i>E. bonariensis</i>	Италия	остров Искья	
2 (a, b)			Геркуланум	
3	<i>E. sumatrensis</i>		Помпеи	
4	<i>E. bonariensis</i> (розовые цв.)		остров Искья	
5 (a, b, c)	<i>E. sumatrensis</i>		Геркуланум	
6			Москва, ГБС РАН	
7 (a, b)	<i>E. canadensis</i>	Россия	Москва, ГБС РАН	
8 (a, b)	<i>E. canadensis</i> (?) или <i>E. sumatrensis</i> × <i>canadensis</i> (?)	Италия	Неаполь	
9 (a, b)	<i>E. bonariensis</i>		Помпеи	
10 (a, b)	<i>E. sumatrensis</i> × <i>canadensis</i> (?)		Рим	
11 (a, b)	<i>Erigeron</i> sp. или <i>E. sumatrensis</i> × <i>canadensis</i> (?)		Помпеи	
12	<i>E. sumatrensis</i> × <i>canadensis</i> (?)		остров Искья	
13 (a, b)	<i>E. canadensis</i> (?)		Рим	
14	<i>E. sumatrensis</i>		Португалия	Лиссабон
15	<i>E. bonariensis</i>			Лиссабон, трасса в Белем
16	<i>E. sumatrensis</i>	Испания	Мадрид, городской парк	
17 (a, b)	<i>E. bonariensis</i>			
18	<i>E. canadensis</i>			
19	<i>E. sumatrensis</i> (?) (колосовидное соцвет.)			
20	<i>E. canadensis</i>			
21	<i>E. bonariensis</i>			
22	<i>E. sumatrensis</i> × <i>canadensis</i> (?) или <i>E. sumatrensis</i> (?)			

Примечание: буквами a, b, c показаны разные особи из одной и той же популяции.

Программа Structure (рис. 2) с оптимальным числом  $k = 3$  (при  $k = 2 \ln P(D) = -1475,4$ , при  $k = 3 \ln P(D) = -1333$ , при  $k = 4 \ln P(D) = -1365,5$ ) проиллюстрировала четкое выделение трех групп: 1) все образцы, которые и по морфологическим, и по молекулярным данным относятся к *E. bonariensis*, включая одну особь с нетипичными розовыми краевыми цветками, собранную в Помпеях (Италия); 2) все образцы, по морфологии не отличающиеся от типичного *E. canadensis*, за исключением образца

19, собранного в городском парке в г. Мадриде, который имел признаки *E. sumatrensis* и не отмеченное ни у одного из трех видов колосовидное соцветие; 3) все образцы *E. sumatrensis* и предположительные гибриды *E. sumatrensis* × *E. canadensis*. Несмотря на оптимальное значение  $k = 3$ , мы приняли во внимание и результаты с большим и меньшим  $k$ . В случае  $k = 2$  подряд расположены образцы *E. bonariensis*, но в ту же группу вошли и два других вида, и предполагаемые гибриды, а во вторую группу вошли также все таксоны за исключением *E. bonariensis* (т.е. данный результат не информативен). В случае с  $k = 4$  сохранились те же группы особей, что и с  $k = 3$ , но разделились образцы *E. bonariensis* по территориальному признаку: в одну группу вошли особи, произраставшие в Италии, а в другую – в Испании и Португалии. Эти внутривидовые генетические различия оказались более значимы, чем различия между предполагаемыми гибридами и одним из родительских видов – *E. sumatrensis*, что подтверждают морфологические данные о высоком полиморфизме вида *E. sumatrensis*, но для выяснения происхождения предполагаемых гибридов требуются дальнейшие исследования.

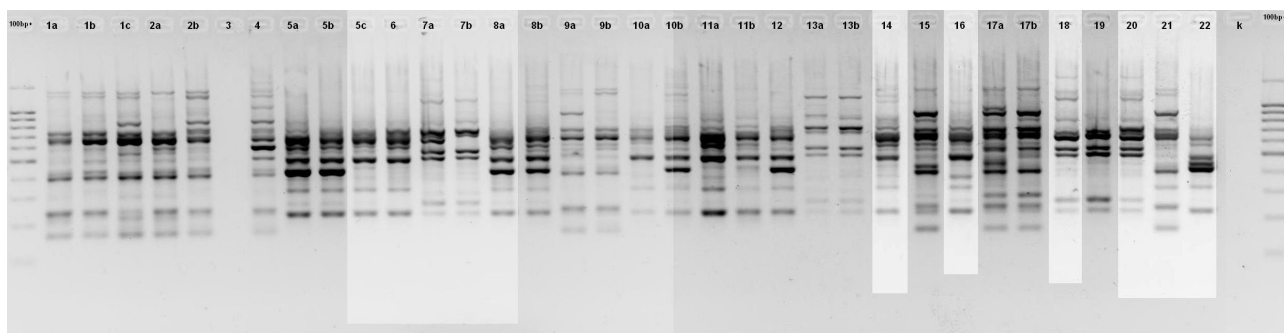


Рис. 1. Результаты ПЦР с праймером M2.

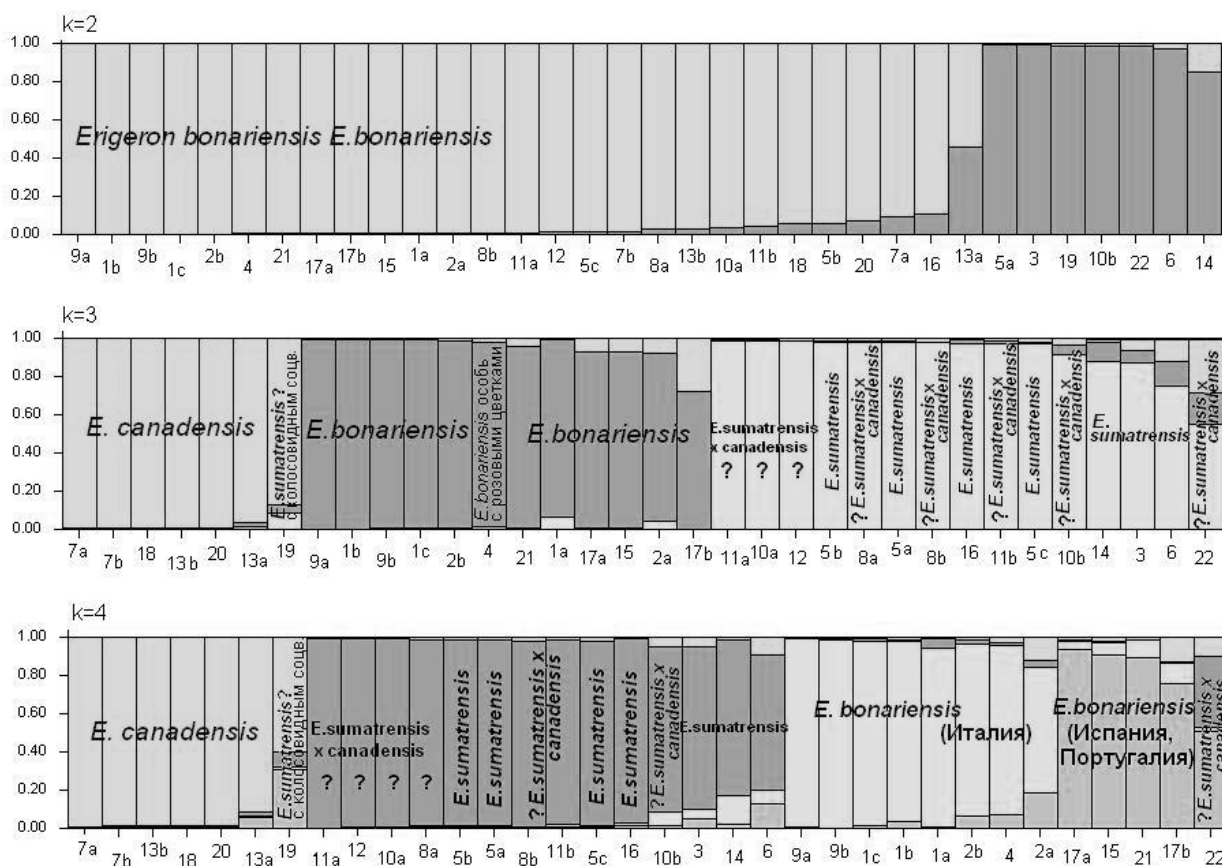


Рис. 2. Распределение различных таксонов секции *Conyza* рода *Erigeron* в зависимости от сходства их ДНК по результатам анализа данных в программе Structure.

Дальнейший анализ в программе NewHybrids показал (рис. 3), что 2 образца (6 и 22) имеют гибридогенное происхождение с вероятностью более 80 %, причем только у образца 22 морфологические признаки носили промежуточный характер, тогда как образец 6 по морфологии не отличался от типичного *E. sumatrensis*. Пять образцов (3, 5с, 8b, 10b и 19) являются гибридами с вероятностью 25 % и более, однако только два из них (10b и 22) мы по промежуточным морфологическим признакам отнесли к гибридам, а три образца, собранные в Италии, были нами первоначально отнесены к *E. sumatrensis*. Образец 19 (*E. sumatrensis* с колосовидным соцветием), по всей видимости, также является гибридом *E. sumatrensis* × *E. canadensis* (вероятность составляет 36 %). Таксоны неопределенного статуса из секции *Conyza* (по морфологическим признакам которых невозможно точно сказать, какие виды являются родительскими), также обозначенные на рис. 2 как *E. sumatrensis* × *E. canadensis*, попали в одну группу с *E. sumatrensis*. Образцы 8a и 8b, вошедшие в эту же группу, обладают более выраженными признаками *E. canadensis* (так, они имеют очень слабо выраженное опушение – в среднем менее 5 трихом на 1 мм<sup>2</sup> верхней и нижней стороны листа). Но ни один предположительный гибрид не был с высокой вероятностью отнесен к какому-либо одному гибриднему классу (к F1, F2 или бэккроссам), поэтому точно говорить о происхождении предполагаемых гибридов можно будет после дальнейших исследований и анализа последовательностей нуклеотидов с помощью ITS-метода, который мы планируем провести в ближайшее время.

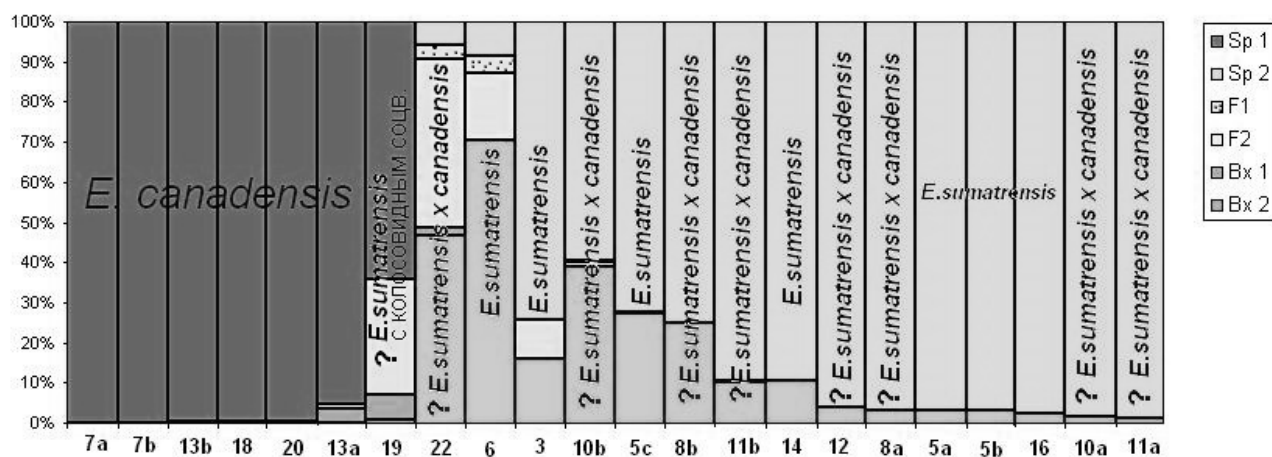


Рис. 3. Вероятность отнесения различных таксонов секции *Conyza* к видам, гибридам и возвратным гибридам (бэккроссам).

Таким образом, в Южной Европе инвазионный *E. bonariensis* не имеет или имеет очень низкую гибридогенную активность, тогда как *E. sumatrensis* и *E. canadensis* могут гибридизировать друг с другом. Представленность и гибридов, и бэккроссов пока незначительна, но, несомненно, дальнейшее изучение гибридогенной активности в секции *Conyza* рода *Erigeron* необходимо для прогнозирования расширения их вторичного ареала и возможной угрозы биоразнообразию стран Средиземноморского региона. Первые полученные данные молекулярно-генетических исследований неоднозначны и требуют продолжения изучения данной проблемы.

**Благодарности.** Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 18-04-00411.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Виноградова Ю. К.** Сравнительный анализ биоморфологических признаков инвазионных видов рода *Conyza* Less. // Бюл. Гл. ботан. сада, 2012. – № 3. – С. 46–50.
- Buntjer J. B.** Cross Checker: computer assisted scoring of genetic AFLP data // *Plant, Animal Genome*. – VIII Conf. S. Diego, CA, January 9–12, 2000. URL: <http://wheat.pw.usda.gov/jag/papers99/paper599/indexp599.html>.
- Rogers S. O., Bendich A. J.** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.*, 1985. – № 5. – P. 69–76.