

УДК 575.174.015.3:582.734.2

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ SALIX L. И SPIRAEA L. ЯКУТИИ НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ITS РДНК**

<sup>1</sup>Полякова Т.А., <sup>2</sup>Ефимова А.П., <sup>1</sup>Шатохина А.В.

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, e-mail: iogen@vigg.ru

<sup>2</sup>Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Россия, e-mail: bio@ibpc.ysn.ru

В статье приводятся результаты молекулярно-генетических исследований на основе секвенирования межгенных спейсеров ITS ядерной рибосомальной ДНК с целью идентификации видов и межвидовых гибридов *Salix* (*Salicaceae* Mirb.) и *Spiraea* (*Rosaceae* Juss.) в Якутии. Выявленная степень нуклеотидного полиморфизма ITS-региона рДНК демонстрирует приемлемую пригодность для идентификации видов и обнаружения межвидовых гибридов рода *Spiraea* и частичную – для рода *Salix*. Анализ выявил видоспецифические генетические различия в ITS-регионе у видов подрода *Salix* в виде однонуклеотидных замен – трансверсий. Предполагается, что низкий нуклеотидный полиморфизм ITS-региона у видов подродов *Chamaetia* и *Vetrix*, вероятно, указывает на их микроэволюционную незрелость. У видов рода *Spiraea* в ITS-регионе, кроме видоспецифических однонуклеотидных замен, обнаружены инсерции/делеции, однонуклеотидные делеции, имеющие таксономическое значение на уровне секций, циклов и рядов. В центральной и юго-восточной частях Якутии в зоне симпатрии «чистых» видов обнаружены интрогрессивные гибриды спирей *S. salicifolia* × *S. humilis*, *S. media* × *S. dahurica*, что подтверждается морфологически и наличием специфических точечных мутаций в регионе ITS.

**Ключевые слова:** *Salix*, *Spiraea*, ITS-регион, рДНК, нуклеотидная последовательность, гибриды, Якутия

**MOLECULAR-GENETIC RESEARCHES ON SALIX L. AND SPIRAEA L. OF YAKUTIA ON THE BASIS OF SEQUENCING DATA OF ITS RDNA**

<sup>1</sup>Polyakova T.A., <sup>2</sup>Efimova A.P., <sup>1</sup>Shatokhina A.V.

<sup>1</sup>Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, e-mail: iogen@vigg.ru

<sup>2</sup>Institute for Biological Problems for Cryolithozone SD RAS, Russia, Yakutsk, e-mail: bio@ibpc.ysn.ru

In article results of molecular-genetic researches on the basis of a nucleotide sequencing of intergenic internal transcribed spacer (ITS-region) of nuclear rDNA for the purpose of identification of species and interspecific hybrids of *Salix* and *Spiraea* in Yakutia are given. The revealed degree of nucleotide polymorphism of the ITS region shows the acceptable suitability for species identification and detection of trans-species hybrids of the *Spiraea* genus and partial suitability – of the *Salix* genus. The analysis of nucleotide polymorphism of the ITS region of willows has revealed species-specific genetic distinctions at species of the subgenus *Salix* in the form of one-nucleotide replacements – transversions. It is supposed that low nucleotide polymorphism of the ITS region at species of the subgenus *Chamaetia* and *Vetrix* probably indicates their microevolutionary immaturity. The species-specific one-nucleotide replacements, insertions/deletions, one-nucleotide deletions having taxonomical value at the level of sections, cycles and ranks are found in species of the genus *Spiraea* in the ITS region. In the central and southeast parts of Yakutia in a sympatric zone of «pure» species introgressive hybrids of *S. salicifolia* × *S. humilis*, *S. media* × *S. dahurica* meet that is confirmed morphologically and existence of specific one-nucleotide replacements in ITS region.

**Keywords:** *Salix*, *Spiraea*, ITS-region, rDNA, nucleotide sequencing, hybrid, Yakutia

Представители *Salix* L. (*Salicaceae*) и *Spiraea* L. (*Rosaceae*) известны как одни из наиболее полиморфных древесно-кустарниковых растений, широко распространенных в северном полушарии. Наблюдаемые явления межвидовой гибридизации усложняют и без того непростую систематику этих родов.

**Цель исследования**

Для видовой идентификации и выявления гибридных комбинаций ив и спирей, а

также для понимания роли гибридизации в изменчивости и микроэволюции необходимы исследования на стыке ботаники и генетики. В связи с этим нами начаты молекулярно-генетические исследования с целью идентификации видов и межвидовых гибридов *Salix* и *Spiraea*.

**Материал и методы исследования**

Для выделения ДНК с 2-летних побегов ив и спирей собирались молодые неповрежденные листья и сушились в силикагеле.

Лабораторные работы по выделению и анализу фрагментов ДНК выполнены в г. Москва в Институте общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова. Геномная ДНК выделена с использованием модифицированного СТАВ протокола. Для амплификации фрагмента ITS-оперона рибосомальной ДНК (рДНК) использовали праймеры ITS6 и ITS9, разработанные для восточноазиатских видов трибы *Spiraea* [9] и успешно протестированные нами [8]. 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. Секвенирование ITS фрагментов проводили в ЗАО «Евроген» в обоих направлениях. Сиквенсы были попарно выравнены в программе BioEdit, множественное выравнивание выполнено в программе ClustalW2 с визуальной проверкой спорных позиций на хроматограммах. Эволюционные исследования выполнены в программе MEGA 6 [10]. Для оценки таксономических различий видов и выявления гибридов выбран регион ITS, включающий межгенные спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5.8S ядерной рибосомальной ДНК. Ядерные последовательности ITS рекомендовали себя как наиболее востребованные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений [2, 4, 6] благодаря ряду преимуществ, среди которых высокая вариабельность, консервативная протяженность, высокая копияность, а также двуродительское наследование [1], обеспечивающее идентификацию недавно возникших гибридов [5]. Молекулярно-генетические исследования дальневосточных ив с применением ITS-региона рДНК впервые для России были проведены В.Ю. Баркаловым, М.М. Козыренко [7]. Результаты работ позволили частично прояснить взаимоотношения видов и секций в подроде *Salix*, а также выявить родственные связи *Chosenia* и *Toisusu*. Высокая схожесть пластидной и ядерной геномных характеристик большинства видов, принадлежащих роду *Salix*, включенных в анализ, может свидетельствовать о том факте, что они относительно недавно отошли от общего предка или это есть результат пересечения генеалогических линий через гибридизацию.

Нами исследования ив и спирей с использованием ITS-региона проведены впервые для Якутии. Образцы ив и спирей собраны в центральных (окрестности г. Якутска, среднее течение р. Лены), юго-восточных (бассейны рр. Мая, Юдома) и южных (р.

Хани, окрестности г. Алдан, пос. Беркамит, Томмот) районах Якутии, а также взяты для анализа из гербарных фондовых материалов ИБПК СО РАН (SASY). Кроме того, образцы ив отобраны в северных (дельта и низовья р. Лены) и северо-восточных (Восточное Верхоянье, Колымская низменность) районах Якутии. Всего для исследования взято 165 образцов ив, составляющих 31 вид, и 25 предполагаемых межвидовых гибридов. Для сравнения также взяты образцы *S. alba*, *S. fragilis*, *S. caprea* из Московской области (окрестности г. Пушкино и г. Звенигород), а также образцы *S. lanata* из Лапландии (гора Пикку-Малла). В данном исследовании проанализировано более 30 образцов спирей, составляющих 6 таксонов, а также включены в анализ дальневосточные и сибирские виды спирей, изученные нами ранее [3].

#### Результаты исследования и их обсуждение

Анализ нуклеотидного полиморфизма ITS-региона рДНК рода *Salix* выявил генетические различия в виде однонуклеотидных замен – трансверсий (табл. 1) у 12 видов, в том числе аутопоморфных. Общая длина анализируемого фрагмента ITS составила 597 позиций, из них 24 вариабельны, 13 позиций филогенетически информативны. Длина спейсера ITS1 составила 222-223 нуклеотида, ITS2 – 212 нуклеотидов, протяженность гена 5.8s – 163 нуклеотида. Последовательности изученных образцов разного происхождения, принадлежащих к одному виду, оказались идентичны.

Установлено, что методом секвенирования ITS-региона отчетливо идентифицируются виды более древнего подрода *Salix*, такие, как *S. alba*, *S. fragilis*, *S. triandra*, *S. pseudopentandra*. Они имеют определенный набор трансверсий, отделяющих их от других видов ив и от близких к ивам тополой. В условиях Якутии *S. triandra*, *S. pseudopentandra* внешне не полиморфны, практически не вступают в межвидовые скрещивания, и это может характеризовать их как устоявшиеся в процессе микроэволюции виды. Иная картина наблюдается у подродов *Chamaetia* и *Vetrix* – путем анализа нуклеотидного полиморфизма ITS большинство видов не идентифицируется. Удалось в некоторой степени верифицировать 7 видов и установить 2 гибрида: *Salix udensis* × *viminalis* и *Salix* × *zhataica* = *S. brachypoda* × *S. pyrolifolia*. В целом у этих подродов матрица сиквенсов обнаруживает некий парадокс: фенотипически весьма близкородственные односекционные виды имеют разделяющие их транзиции, в то время, как отдаленные разносекционные виды имеют идентичную нуклеотидную последовательность.

**Таблица 1**

Положение однонуклеотидных замен в спейсерах ITS 1 и ITS 2 рДНК у видов рода *Salix*

ITS 1		ITS 1		ITS 2		ITS 2	
Позиция	Замена	Позиция	Замена	Позиция	Замена	Позиция	Замена
26	T→C	139	C→T	368	T→C	540	T→C
34	C→T	158	T→G	453	C→A	546	C→T
77	T→C	165	T→C	469	A→T	575	T→C
81	A→T	171	A→C	526	C→T	581	T→A

**Таблица 2**

Мутации в области ITS у близких видов *Spiraea salicifolia* и *S. humilis* и их предполагаемых гибридов из Якутии

Позиция	Область	<i>S. salicifolia</i>	Предполагаемые гибриды		<i>S. humilis</i>
			Орбогур	Лапри	
39	ITS 1	T	T	C	C
92	ITS 1	T	C	T	C
106	ITS 1	T	T	T	C
615	ITS 2	C	C	C	T
627	ITS 2	T	T	T	C
629	ITS 2	C	C	C	A

**Таблица 3**

Транзиции в области ITS 1 и ITS 2 у видов *Spiraea media* и *S. dahurica* и их гибридов из Якутии

Позиция	<i>S. media</i>	Предполагаемые гибриды				<i>S. dahurica</i>
		Буотама	Хани	Юдома	Ленские столбы	
108	C	T	T	T	C	T
443	T	T	T	T	T	C
584	C	C	C	T	T	T

Для 30 образцов различных видов *Spiraea*, произрастающих в районах Центральной и Юго-Восточной Якутии, получены фрагменты, включавшие полноразмерный регион ITS 1-5.8s-ITS 2 и частично гены 18S и 26S. Были получены данные, сходные с нашими ранними исследованиями [3]. После выравнивания длина анализируемого фрагмента ITS насчитывала 660 позиций, из них 572 позиции консервативны, 85 переменны, но не информативны, 74 позиций оказались филогенетически-информативными. Сравнительное изучение ITS-фрагментов у изученных видов показало наличие как инделей, так и генных точечных мутаций – трансверсий и транзиций. По протяженности, а также по числу константных, переменных и филогенетически информативных сайтов спейсер ITS 1 более изменчив. Таксоноспецифичные инсерции/делеции наблюдались как в области ITS 1, так и ITS 2.

Тщательный анализ нуклеотидного полиморфизма ITS-региона позволил выявить аутопоморфные нуклеотидные замены в роде *Spiraea*, а также позволил обнаружить предполагаемые гибриды. Выявлено, что «чистые» образцы *S. salicifolia* из Якутии, Приморского, Хабаровского края, Амурской области и «чистые» экземпляры близкого ему *S. humilis* из Хабаровского края и Якутии отличаются по 6 однонуклеотидным заменам. Предполагается гибридная природа образцов *S. salicifolia* × *S. humilis*, обнаруженных в Тындинском районе Амурской области (граница на юге Якутии) и Усть-Майском районе юго-восточной части Якутии (табл. 2). Также вероятно, что в Якутии (центральная и юго-восточная части) в зоне симпатрии чистых видов встречаются интрогрессивные гибриды *S. media* × *S. dahurica*, что подтверждается морфологически и наличием у них 3 транзиций в зоне ITS (табл. 3).

### Выводы

Таким образом, выявленная нами степень нуклеотидного полиморфизма ITS-региона демонстрирует приемлемую пригодность для идентификации видов и обнаружения межвидовых гибридов рода *Spiraea* и частичную – рода *Salix*. Анализ нуклеотидного полиморфизма ITS-региона ив выявил видоспецифические генетические различия у видов подрода *Salix* в виде однонуклеотидных замен – трансверсий. Предполагается, что низкий нуклеотидный полиморфизм ITS-региона у видов подродов *Chamaetia* и *Vetrix*, вероятно, указывает на их микроэволюционную незрелость. У видов *Spiraea* в ITS-регионе обнаружены видоспецифические однонуклеотидные замены, инсерции/делеции, однонуклеотидные делеции, имеющие таксономическое значение на уровне секций, циклов и рядов. В центральной и юго-восточной частях Якутии в зоне симпатрии «чистых» видов обнаружены интрогрессивные гибриды спирей *S. salicifolia* × *S. humilis*, *S. media* × *S. dahurica*, что подтверждается морфологически и наличием специфичных точечных мутаций в регионе ITS. Полученные ITS-сиквенсы ив и спирей частично депонированы в международном банке генетических данных NCBI (KU302249; KU321584-KU321585; KU321587-KU321591).

Исследования выполнены в рамках проектов НИР ИБПК СО РАН № 52.1.11 «Разнообразие растительного мира таёжной зоны Якутии:

структура, динамика, сохранение», № 52.2.8 «Лесные экосистемы криолитозоны Якутии в условиях глобального изменения климата и антропогенного воздействия: состав, структура, продуктивность, прогноз динамики», а также при финансовой поддержке РФФИ (гранты №15-44-05103 и № 15-04-03093).

### Список литературы

1. 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.
2. 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 Моск. совещ. по филогении растений: Матер. между. конф. (Москва, 2-6 февр. 2015 г.). – М.: МАКС Пресс, 2015. – С. 263-265.
3. Полякова Т.А., Шатохина А.В., Ширманов М.В., Бондаренко Г.Н. Оценка таксономических отношений у сибирских представителей секции *Chamaedryon* Ser. рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) на основе анализа нуклеотидного полиморфизма ITS-региона // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. науч. статей по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф. (25-29 мая 2015 г., Барнаул). – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2015. – С. 353-358.
4. 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.
5. Alvarez I.A., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Molec. Phyl. Evol. – 2003. – Vol. 29. – № 3. – P. 417-434.
6. 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. – 82. – P. 247-277.