

Молекулярно-генетическое исследование видов р. *Trollius* L. с использованием ISSR, ITS, *rbcL* и *matK* маркеров

Molecular genetic study of *Trollius* L. species using ISSR, ITS, *rbcL* and *matK* markers

Путилин И. Р.¹, Ямских И. Е.¹, Степанов Н. В.¹, Куцев М. Г.^{2,1}

Putilin I. R.¹, Yamskikh I. E.¹, Stepanov N. V.¹, Kutsev M. G.^{2,1}

¹Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия.

E-mails: irputilin@mail.ru, iyamskikh@mail.ru, stepanov-nik@mail.ru

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

²Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: m_kucev@mail.ru

²Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. *Trollius* L. – род растений из семейства Ranunculaceae Juss., имеющих декоративное и прикладное значение. На территории Сибири отмечается наибольшее разнообразие представителей данного рода. В ходе исследования был проведён популяционно-генетический анализ 7 популяций *Trollius asiaticus*, 2 популяций *T. vitalii* и 1 популяции *T. sibiricus*, произрастающих на юге Сибири с использованием ISSR-PCR маркеров. Выявлено 114 локусов, суммарный полиморфизм которых составляет 98,25 %. Число амплифицированных фрагментов в зависимости от праймера варьирует от 27 (17899A) до 32 (ISSR-17 и HB14). Коэффициент подразделённости популяций (G_{ST}) составляет 0,5186, следовательно, изученные популяции имеют высокую степень дифференциации по классификации Райта и разделяются на отдельные виды. На дендрограмме сходства популяций выделяется 2 кластера, один из которых формируют популяции, относящиеся к виду *T. sibiricus*. Во второй кластер входят популяции *T. asiaticus* и *T. vitalii*. Обособленную группу, предположительно относящуюся к новому виду *T. austrosibiricus* Erst et Luferov, образуют байкальская и иджимская популяции. При построении дерева по отдельным представителям наблюдается четкое разделение популяций на обособленные группы. При проведении филогенетического анализа по нуклеотидным последовательностям ITS регионов, хлоропластных генов *matK* и *rbcL* было выявлено отсутствие значимых различий между видами *T. asiaticus*, *T. vitalii*, *T. kolonok*, *T. europaeus* L., *T. altaicus* и *T. sibiricus*. Единичные однонуклеотидные замены отмечены в последовательностях *matK* у *T. europaeus*, *T. altaicus* и *T. kolonok*.

Ключевые слова. Генетический полиморфизм, филогения, ISSR-PCR анализ, *Trollius*.

Summary. *Trollius* L. – plant genus of Ranunculaceae Juss. family that has decorative and practical applications. On the territory of Siberia, the greatest diversity of representatives is noted. During the study, a population genetic analysis for 7 populations of *T. asiaticus*, 2 populations of *T. vitalii* and 1 population of *T. sibiricus* was carried out. Revealed 114 loci, the total polymorphism of which is 98.25 %. The number of amplified fragments is related to the primer and range from 27 (17899A) to 32 (ISSR-17 and HB14). G_{ST} is 0,5186, therefore, the studied populations have a high degree of differentiation according to the classification of Wright's classification and are divided into separate species. On the dendrogram of population similarity, 2 clusters are distinguished, one of which is formed by populations belonging to the species *T. sibiricus*. The second cluster includes populations of *T. asiaticus* and *T. vitalii*. A separate group that, probably, belongs to *T. austrosibiricus* Erst et Luferov is formed by the Baikal and Idzhim populations. When constructing a tree for individual representatives, a clear division of populations into separate groups is observed. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS regions, chloroplast genes *matK* and *rbcL* revealed the absence of significant differences between the species *T. asiaticus*, *T. vitalii*, *T. kolonok*, *T. europaeus* L., *T. altaicus*, and *T. sibiricus*. SNPs were noted in the *matK* sequences in *T. europaeus*, *T. altaicus*, and *T. kolonok*.

Key words. Genetic polymorphism, ISSR-PCR analysis, phylogeny, *Trollius*.

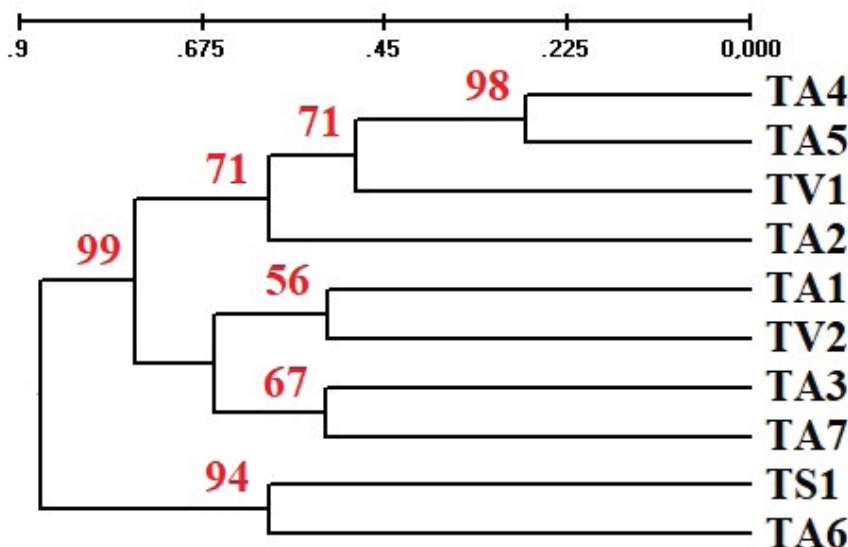


Рис. 1. Дендрограмма сходства популяций рода *Trollius*.

Род Купальница (*Trollius* L.) относится к семейству Лютиковые (*Ranunculaceae* L.) и включает в себя виды, произрастающие в областях Северного полушария, преимущественно в Азии. Наиболее полномасштабный обзор рода и его ревизия представлены в монографии А. Дорожевской (*Doroszevska*, 1974), в которой она выделяет 35 видов и разделяет их на 7 секций: *Pumilotrollius*, *Yunnanotrollius*, *Acailitrollius*, *Longipetala*, *Trollius*, *Insulaetrollius*, и *Laxotrollius*. Однако, автор указывает, что мор-

фологически виды всех этих секций настолько полиморфны, что различить их довольно сложно (*Doroszevska*, 1974). На территории России выделяется 19–20 видов (*Luferov et. al.*, 2018), из которых наибольшее разнообразие (около 12 видов) представлено в Сибири (*Erst et. al.*, 2018).

Таблица 1

Исследуемые популяции видов р. *Trollius*

№	Название сообщества, местоположение
TA-1	<i>Trollius asiaticus</i> L. Сосново-елово-берёзовый лес осочково-разнотравный (окр. д. Крутая, Емельяновский район, Красноярский край)
TA-2	<i>Trollius asiaticus</i> L. Сосновый лес орляково-разнотравный (окр. п. Майна, устье р. Уй, Бейский район, Республика Хакасия)
TA-3	<i>Trollius asiaticus</i> L. Пихтово-берёзовый лес широколиственно-злаковый (окр. п. Танзыбей, Ермаковский район, Красноярский край)
TA-4	<i>Trollius asiaticus</i> L. Березняк с елью разнотравно-осочковый (пойма р. Иджим Усинской котловины, Ермаковский район, Красноярский край)
TA-5	<i>Trollius asiaticus</i> L. Березняк с примесью сосны разнотравно-злаковый (ст. Глубокая, Шелеховский район, Иркутская область)
TA-6	<i>Trollius asiaticus</i> L. - (окрестности посёлка Жаровск, Курагинский район, Красноярский край)
TA-7	<i>Trollius asiaticus</i> L. Редкостойный березняк злаково-высокотравный (долина р. Сарала, район Ивановских озёр, Орджоникидзевский район, Республика Хакасия)
TV-1	<i>Trollius vitalii</i> Stepanov. Субальпийский разнотравный луг (Природный парк Ергаки, район ручья Горного, Ермаковский район, Красноярский край)
TV-2	<i>Trollius vitalii</i> Stepanov. Субальпийское пихтовое редколесье (Природный парк Ергаки, смотровая площадка, Ермаковский район, Красноярский край)
TS-1	<i>Trollius sibiricus</i> Schipcz. Заболоченный разнотравно-злаковый луг (дол. р. Паньковка, Слюдянский район, Иркутская область)

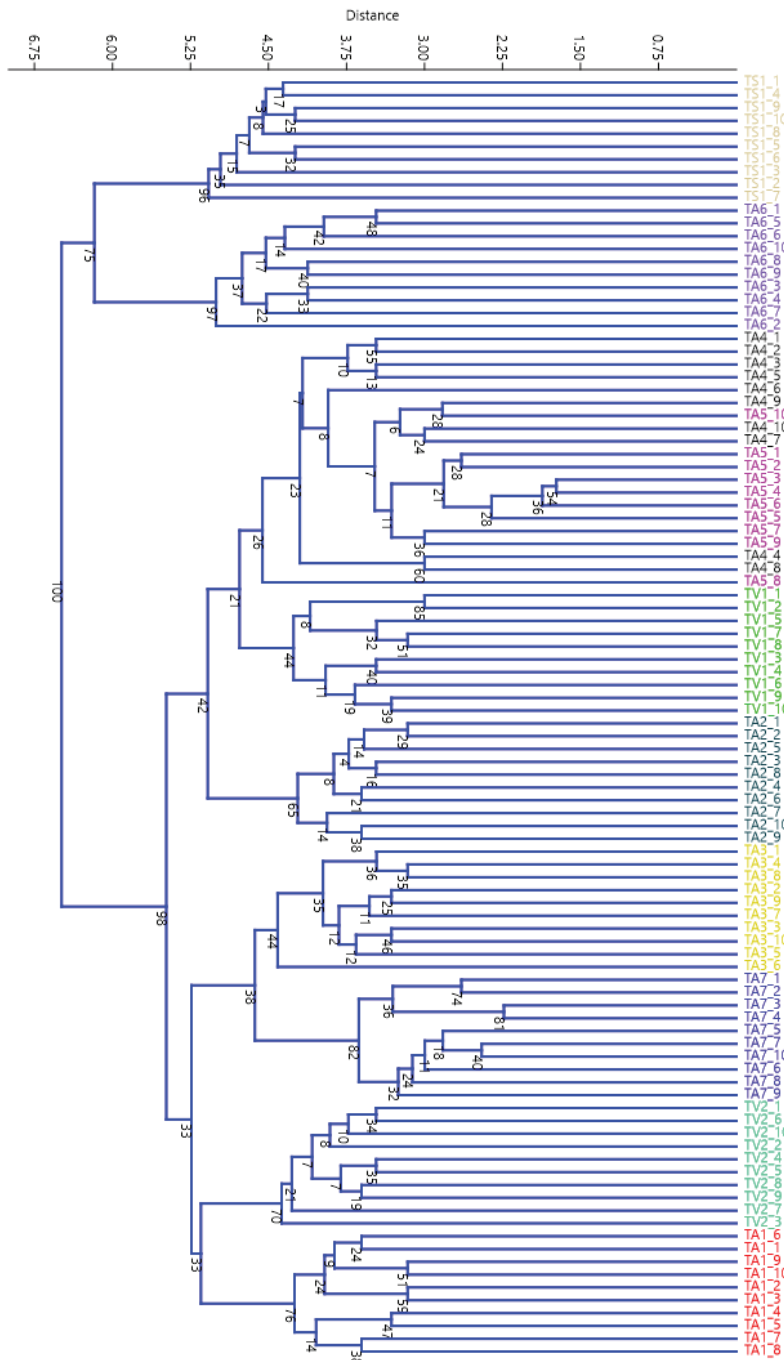


Рис. 2. Дендрограмма сходства представителей различных популяций рода *Trollius*.

оны) (табл. 1). Для филогенетических исследований было отобрано 6 представителей рода *Trollius*: *T. asiaticus*, *T. altaicus* C. A. Mey, *T. sibiricus*, *T. europaeus* L., *T. vitalii* и *T. kolonok*.

Выделение ДНК из листьев купальниц проводилось СТАВ-методом (Doyle J. J., Doyle J. L., 1987). В ISSR-PCR-анализе использовали данные 10 популяций с объемом выборок – 10 экземпляров. ISSR-PCR проводили в 20 мкл смеси (6 мкл ddH₂O, 10 мкл смеси БиоМастер HS-Taq ПРЦ-Color 2х, 2 мкл

Недавние исследования филогении и генетического разнообразия показывают генетическую близость некоторых видов (Буглова, 2018). В Красноярском крае и Хакасии описаны *Trollius vitalii* Stepanov и *T. kolonok* Stepanov (Степанов, 2018), однако, некоторые авторы сомневаются в видовом статус данных видов. В протологе *T. vitalii* – купальница Виталия, св зывается родством с восточносибирским видом *T. bargusinensis* Sipl. (Степанов, 1994), однако ранее Н. В. Фризен в монографической обработке рода *Trollius* для Флоры Сибири не отделяет *T. bargusinensis* от *T. asiaticus* L. (Фризен, 1993). М. М. Серебряный относит *T. vitalii* к *T. chinensis* Bunge (Serebryanyi, 2019).

Цель наших исследований – популяционно-генетический и филогенетический анализ сибирских представителей р. *Trollius*.

Объектом популяционно-генетических исследований явились популяции *T. asiaticus*, *T. sibiricus* Schipcz., *T. vitalii*, произрастающие в пределах северо-восточной части Западного Саяна (Ермаковский район), Красноярской лесостепи (Емельяновский район), Республики Хакасии (Орджоникидзевский и Бейский районы), а также на восточном и западном побережьях оз. Байкал в пределах Иркутской области (Слюдянский и Шелеховский рай-

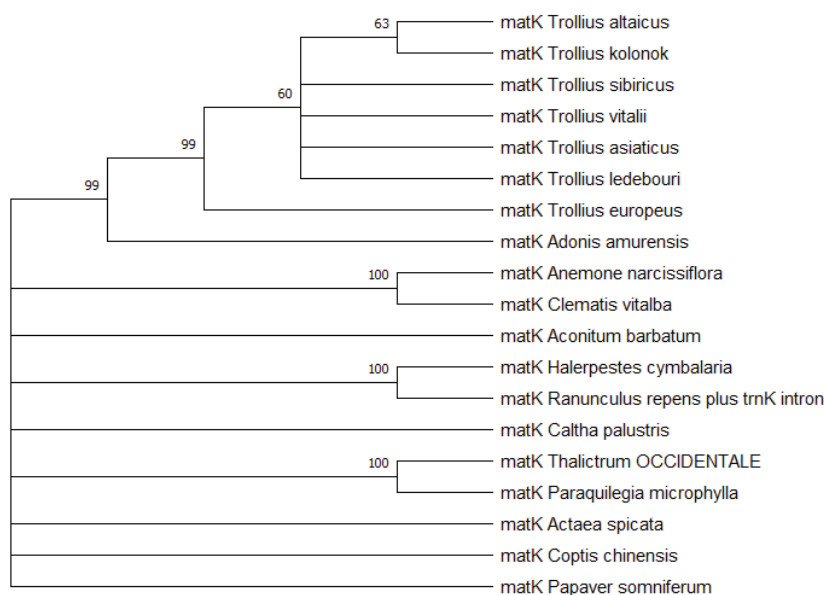


Рис. 3. Филогенетическое дерево представителей семейства Ranunculaceae (matK).

ДНК, 2 мкл 10мМ праймеры) по следующей программе: 95 °С – 5 мин.; 13 циклов: 95 °С – 20 сек.; 55 °С – 45 сек., понижение температуры на 0,7°С в каждом последующем цикле; 72°С – 90 сек.; 25 циклов: 95 °С – 20 сек., 44 °С – 30 сек., 72 °С – 90 сек.; 72 °С – 7 мин – завершающая стадия; охлаждение при 4 °С. Разделение продуктов амплификации проводилось в агарозном геле в горизонтальной камере для электрофореза Bio-Rad Sub-cell GT при 80V. В ISSR-PCR-анализе использовали 4 праймера, обладающих высоким уровнем полиморфизма и дающих воспроизводимый результат: 17899A

(CA)₆AG), HB12 (CAC)₃GC), HB14 (CTC)₃GC) и ISSR-17 (GACA)₄). Анализ гелей проводили с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software, на основании которого была составлена матрица для генетического анализа.

Полученные результаты анализировали с помощью программ TFPGA version 1.3 и Popgene version 1.32. Для оценки уровня генетического разнообразия были рассчитаны: уровень полиморфизма, генное разнообразие Нея (H_e), индекс Шеннона (I_o), генетические расстояния Нея (D). Дендрограмма сходства была построена невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) в программах TFPGA и Past 4.02.

В ходе ISSR-PCR анализа выявлено 114 фрагментов ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 98,25 %. Число амплифицированных фрагментов варьирует от 27 (17899A) до 32 (ISSR-17 и HB14). Максимальный уровень полиморфизма отмечается для популяций TS1 и TA6 (53,51 % и 49,12 % соответственно). Также, для этих популяций характерны высокие значения индекса Шеннона ($I_o = 0,2475$ и $I_o = 0,2321$ соответственно), а коэффициент разнообразия Нея равен $H_e = 0,1610$ и $H_e = 0,1512$.

Коэффициент подразделённости популяций (G_{ST}) составляет 0,5186, т.е. на долю межпопуляционного разнообразия приходится 51,86 %, а изученные популяции имеют высокую степень дифференциации по классификации Райта разделяются на отдельные виды. Наибольшие значения генетических дистанций Нея наблюдаются для популяций TA3 и TS1 ($D = 0,3014$); TA7 и TS1 ($D = 0,3003$), что говорит о том, что виды *T. asiaticus* и *T. sibiricus* довольно сильно отличаются друг от друга на генетическом уровне. Наибольшее генетическое сходство наблюдается между популяциями TA3 и TA7 (0,9104), TA4 и TA5 (0,9550).

На дендрограмме сходства чётко выделяются 2 кластера (рис. 1). В первый кластер входят популяции TS1 и TA6, который произрастают на значительном расстоянии друг от друга. Это может говорить о том, что скорее всего популяция TA6 относится к виду *T. sibiricus*. Во втором кластере формируется 2 субкластера: 1 – TA1, TV2, TA3 и TA7; 2 – TA4, TA5, TV1 и TA2. Популяции TA4 и TA5 произрастают на значительном удалении друг от друга, тем не менее являются обособленными от остальных, т.к. отделены от остальных популяций горными хребтами, что затрудняет перенос генетического материала на разные высотные пояса. Скорее всего, данные популяции относятся к недавно описанному виду *Trollius austrosibiricus* Erst et Lufarov (Erst et al., 2019). При построении деревьев по отдельным представителям наблюдается такая же картина (рис. 2). Особи разных популяций, в том числе и *T. vitalii*, формируют четко обособленные группы.

Для проведения филогенетического анализа была использована ДНК, выделенная из листьев 6 представителей р. *Trollius*. Амплификация полученного материала проводилась с использованием

ем праймеров к последовательностям *ITS* (*ITS-for* – 5'-CGT-AAC-AAG-GTT-TCC-GTA-G-3', *ITS-rev* – 5'-GGA-ATC-CTT-GTA-AGT-TTC-TTT-3'), *matK* (*matK 1R_KIM* – 5'-CGT-ACA-GTA-CTT-TTG-TGT-TTA-CGA-G-3', *matK 3F_KIM* – 5'-CCC-AGT-CCA-TCT-GGA-AAT-CTT-GGT-TC-3') и *rbcL* (*rbcL 1F* – 5'-ATG-TCA-CCA-CAA-ACA-GAA-AC-3', *rbcL 724R* – 5'-TCG-CAT-GTA-CCT-GCA-GTA-GC-3'). Проверка качества выделения проводилась с помощью электрофореза при 100V. Выделенная и амплифицированная ДНК была секвенирована с помощью набора реактивов BigDive Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, MD, USA). Определение нуклеотидных последовательностей forward-цепей проводилась методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130 (г. Новосибирск).

Молекулярно филогенетический анализ проводился путём сравнения хлоропластных последовательностей *rbcL* (RuBisCo Large Subunit), *matK* (Maturase K) и участка ядерного генома *ITS* (Internal Transcribed Spacer) с помощью алгоритмов выравнивания (MUSCLE), фильтрации выравниваний (Gblocks 0,91b), подбора модели нуклеотидных замен (jModelTest2) и дальнейшего построения дендрограмм в программе MEGA 10 (Kumar et. al., 2018). Также для построения более точного филогенетического дерева на сайте NCBI были отобраны последовательности *rbcL*, *matK* и *ITS* для видов, относящихся к семейству Ranunculaceae L. В качестве аутгруппы был выбран вид, являющийся родственником по ближайшей таксономической единице (порядок *Ranunculales* Juss. ex Bercht. et J. Presl) – *Papaver somniferum* L. (табл. 2). Филогенетические деревья строились алгоритмами ML (Maximum likelihood) и MrBayes (Bayesian statistics) для дальнейшего сравнения результатов. В качестве подтверждения статистической достоверности (для ML) использовался коэффициент бутстрепа. Узел считался достоверным, если он появлялся в 50 % случаев построения деревьев. Если же коэффициент бутстрепа был меньше 50, то узел не учитывался и образовывалась политомия.

Таблица 2

Последовательности, взятые из базы данных NCBI

rbcL	matK	ITS
<i>Aconitum barbatum</i> JF940656.1	-/- JF953024.1	-/- KY417292.1
<i>Actaea spicata</i> KF997475.1	-/- JQ033440.1	-/- Z98279.1
<i>Adonis amurensis</i> EU053900.1	-/- FJ626486.1	-/- KU570389.1
<i>Anemone narcissiflora</i> MF572154.1	-/- MF543478.1	-/- MF543747.1
<i>Caltha palustris</i> EU053906.1	-/- AB069845.1	-/- AY148283.1
-	<i>Clematis vitalba</i> HE967387.1	-/- GU732643.1
<i>Coptis chinensis</i> AB817806.1	-/- AB817805.1	-/- JF423949.1
<i>Halerpestes ruthenica</i> KF312697.1	<i>H. cymbalaria</i> KC474866.1	<i>H. uniflora</i> GU552270.1
<i>Papaver somniferum</i> MF973030.1	-/- JN896016.1	-/- AY689330.1
<i>Paraquilegia microphylla</i> EF437146.1	-/- EF437136.1	-/- JX233771.1
<i>Ranunculus repens</i> MK526485.1	-/- AY954182.1	-/- HQ338339.1
<i>Thalictrum simplex</i> FJ449863.1	<i>T. occidentale</i> KX677446.1	<i>T. simplex</i> KC417090.1
<i>Trollius ledebouri</i> EU053926.1	-/- AY515237.1	-/- AY148271.1

Филогенетическое дерево было построено для 18 видов семейства с использованием модели нуклеотидных замен GTR (General time reversible) (Tavare et. al., 1986).

В ходе филогенетических исследований было выявлено, что все последовательности представителей рода *Trollius* практически не отличаются друг от друга как по внутренним транскрибируемыми спейсерам (ITS1, ITS2), так и по хлоропластным генам *rbcl* и *matK*. Небольшие отличия отмечены по последовательностям *matK* – трансверсия С на А по 434 нуклеотиду у *T. europaeus* и транзиция G на А у *T. altaicus* и *T. kolonok*. В связи с этим, произошло расхождение на дендрограмме (рис. 3). Инделов, дупликаций или инверсий внутри рода не было обнаружено.

При построении филогенетических деревьев (в качестве примера приведено филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *matK*) было выявлено, что сиквенсы, относящиеся к видам рода *Trollius* объединяются в одну кладу, т.е. монофилетическую группу, внутри которой виды *T. altaicus* и *T. kolonok* отделяются от других видов. Появление политомии указывает на то, что возможно, изначальный предковый вид расширял свой ареал и в дальнейшем панмиктически подвергался перипатрическому видообразованию в разных регионах. Именно это и могло сказаться на том, что последовательности генов не претерпели существенных модификаций, или же претерпели незначительные.

Таким образом, по результатам ISSR-PCR анализа выявлено достоверное разделение на две группы. Высокие значения коэффициента подразделённости популяций ($G_{ST} = 51,86\%$) говорят о том, что в выборке присутствуют разные виды. Популяции четко отделяются друг от друга. В нуклеотидных последовательностях ITS регионов, хлоропластных генов *matK* и *rbcl* *значимых отличий между видами не обнаружено*. Для того, чтобы провести четкую границу между видами необходимо изучение морфологической изменчивости на популяционном уровне, а также поиск новых, более надежных молекулярных маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

- Буглова Л. В.** Естественные гибриды *Trollius asiaticus* x *T. altaicus*: признаки и распространения // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2018. – Т. 1. – С. 180–183.
- Степанов Н. В.** Новый вид *Trollius* L. (Ranunculaceae) из Кузнецкого Алатау // Систематические заметки по материалам гербария им. П. Н. Крылова Томского государственного университета, 2018. – №. 117. – С. 40–45.
- Степанов Н. В.** Флорогенетический анализ (на примере северо-восточной части Западного Саяна): Учебное пособие. Часть 1 / Н. В. Степанов. – Красноярск: Краснояр. гос. ун-т., 1994. – 108 с.
- Фризен Н. В.** *Trollius* L. – Жарок, или купальница // Флора Сибири. В 14 т. Т.6. – Новосибирск, 1993. – С. 103–108.
- Doroszewska A.** The genus *Trollius* L. / A taxonomical study. Monogr. bot., 1974. – P. 1–184.
- Doyle J. J., Doyle J. L.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical bulletin, 1987. – Vol. 19. – №. 1. – P. 11–15.
- Erst A., Lufarov A., Troshkina V., Shaulo D., Kuznetsov A., Xiang K., Wang W.** *Trollius austrosibiricus* (Ranunculaceae), a new species from South Siberia // PhytoKeys, 2019. – №. 115. – С. 83.
- Erst A. S., Lufarov A. N., Troshkina V. I., Xiang K., Wang W.** The genus *Trollius* L. (Ranunculaceae) in the flora of the Altai Mountain Country // Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова Томского государственного университета, 2018. – №118. – P. 64–67.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Molecular biology and evolution, 2018. – Vol. 35. – №. 6. – P. 1547–1549.
- Lufarov A. N., Erst A. S., Lufarov D. N., Shmakov A. I., Wang W.** The genus *Trollius* (Ranunculaceae) in the Russian Far East // Turczaninowia, 2018. – 21(2). – P. 110–116. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.2.12
- National Center for Biotechnology Information Search database. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Serebryanyi M. M.** Towards a taxonomic revision of the genus *Trollius* (Ranunculaceae) in the Asian part of Russia. I. *Trollius chinensis*: taxonomic and geographical reconsiderations // Novitates Systematicae Plantarium Vascularium, 2019. – Vol. 50. – P. 101–114. DOI: 10.31111/novitates/2019.50.101
- Tavaré S.** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences // Lectures on mathematics in the life sciences, 1986. – Vol. 17. – №. 2. – P. 57–86.