

УДК 582.32/.998(571.150/.1)

Молекулярно-филогенетическое исследование ковылей Алтайского края и Республики Алтай

Molecular-phylogenetic study of feather grasses of the Altai Krai and the Altai Republic

Матейкович П. А.^{1,2}, Носов Н. Н.², Гудкова П. Д.^{3,4}, Гнутиков А. А.⁵, Пунина Е. О.², Родионов А. В.^{1,2}

Mateikovich P. A.^{1,2}, Nosov N. N.², Gudkova P. D.^{3,4}, Gnutikov A. A.⁵, Punina E. O.², Rodionov A. V.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: sandhani@yandex.ru

² Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: elizaveta_punina@mail.ru, nnosov2004@mail.ru, avrodionov@mail.ru

³ Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия. E-mail: pdgudkova2017@yandex.ru

⁴ Томский государственный университет, Томск, Россия

⁵ ФИЦ Всероссийский институт растительных ресурсов им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: alexandr2911@yandex.ru

¹ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Komarov Botanical Institute RAS, St. Petersburg, Russia

³ Altai State University, Barnaul, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁵ N. I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

Реферат. Секвенированы последовательности ITS1–5.8S рДНК–ITS2 у 13 алтайских видов ковылей. Длина региона ITS1–5.8SRNA–ITS2 составила 596 п. н. Участок, кодирующий 5.8S рРНК, высоко консервативен и не содержит нуклеотидных замен. При анализе внутренних транскрибируемых спейсеров были выявлены 14 сайтов вариабельности и SNP в ITS1, и 16 – в ITS2; часть из которых оказалась видоспецифична. Выявлены также локусы, вариабельные в пределах вида, и полиморфные сайты, свидетельствующих о неоднородности кластера последовательностей рибосомальных генов. Показано, что ITS-последовательности могут быть использованы как маркер для идентификации групп близкородственных видов *Stipa*, и, в ряде случаев, отдельных видов.

Summary. The sequences ITS1–5.8S rDNA–ITS2 were obtained for 13 Altaic species of feather grass. The total length of the ITS1–5.8SRNA–ITS2 region was 596 bp. The region encoding 5.8S rRNA is highly conserved and does not contain nucleotide substitutions. In the analysis of internal transcribed spacers, 20 sites of variability and SNP in ITS1 and 25 in ITS2 were identified; some of which was species-specific. Loci, variable within the species, and polymorphic sites, indicating the heterogeneity of the sequence cluster of ribosomal genes, have also been identified. It is shown that ITS-sequences can be used as a marker for identification of groups of closely related *Stipa* species, and, in some cases, separate species.

Начиная с Карла Линнея, в 1753 г. описавшего 3 вида рода *Stipa* L., и по настоящее время в мире разными исследователями описано около 2000 видов злаков, относимых сейчас к трибе Stipeae Dumort. До конца XIX века род *Stipa* понимался широко, и в него включались в ранге подродов или секций такие ныне признаваемые многими самостоятельные рода, как *Lasiagrostis* Link, *Oryzopsis* Michx., *Ptilagrostis* Griseb., *Achnatherum* P. Beauv., *Jarava* Ruiz & Pav. и другие. В работах отечественных агро-стологов, изучавших эту группу, также не сразу сложилось единое мнение об объеме и составе трибы. Так, ряд видов *Achnatherum*, а в некоторых случаях и виды *Ptilagrostis*, рассматривались в составе рода *Stipa* (Крылов, 1928, Смирнов, 1928, Рожевиц, 1934, Цвелев, 1976). Только в роде *Stipa* sensu stricto и только в Евразии за всю историю изучения описано более 1000 видов. Очевидно, что при всем разнообразии их намного меньше, и, тем не менее, разными исследователями признается от 100 до 200 видов

уже в мировой флоре. Высокая степень внутривидового полиморфизма, с одной стороны и относительно малое количество значимых морфологических признаков с другой делает род *Stipa* предметом дискуссий многих поколений ботаников. Применение молекулярно-филогенетических методов позволило решить ряд вопросов о количестве и взаимном родстве родов, входящих в трибу Stipeae (Jacobs et al., 2007, Hamasha, von Hagen, Röser, 2012, Romaschenko et al., 2012 и др.), однако вопрос о взаимоотношениях видов внутри крупнейшего рода трибы – *Stipa* – остается открытым. Показано, что при построении филогенетических деревьев по нескольким хлоропластным генам виды рода *Stipa* всегда образуют неразрешимую кладу (Hamasha, von Hagen, Röser, 2012 и др.). Секвенированные нами хлоропластные последовательности спейсера trnL-trnF у 10 видов ковылей также оказались полностью идентичны. Некоторые исследователи полагают, что дивергенция широко применяемой в молекулярной систематике ядерной последовательности ДНК района ITS1–5.8S рДНК–ITS2 также недостаточна для разграничения видов рода *Stipa* (Hamasha, von Hagen, Röser, 2012, Romaschenko et al., 2012, Krawczyk et al., 2017); и этот район может быть использован только для разграничения секций в пределах рода, и лишь в редких случаях – видов в пределах секции. Однако, район ITS1–5.8S рДНК–ITS2, у ковылей флоры России изучен недостаточно. Только на территории республики Алтай и Алтайского края согласно «Флоре Сибири», произрастает 14 видов *Stipa* (Ломоносова, 1990), и немногие из них были изучены зарубежными авторами. Неясные морфологические границы ряда видов и секций и наши собственные новые находки заставляют пересмотреть видовой состав и филогенетические связи ковылей на территории региона.

Последовательности ДНК ITS1–5.8S рДНК–ITS2 для 13 алтайских видов ковылей: *S. pulcherrima* K. Koch; *S. borysthenica* Klovov ex Prokudin; *S. dasyphylla* (Lindem.) Czern. ex Trautv.; *S. zaleskii* Wilensky; *S. orientalis* Trin. ex Ledeb.; *S. glareosa* P.A.Smirn.; *S. consanguinea* Trin. & Rupr.; *S. krylovii* Roshev.; *S. lessingiana* Trin. & Rupr.; *S. praecapillata* Alechin; *S. korshinskyi* Roshev.; *S. grandis* P.A.Smirn.; *S. capillata* L. (всего 31 образец) были секвенированы нами по Сэнгеру. Эти образцы были собраны авторами во время экспедиций 2007–2016 гг. Общая длина региона ITS1–5.8SRNA–ITS2 составила 596 п. н., где нуклеотиды с 1 по 217 позицию принадлежали ITS1, с 218 по 377 – 5.8SRNA, а с 378 по 596 – ITS2. Участок, кодирующий 5.8S рДНК, оказался высоко консервативен и не содержал нуклеотидных замен. При анализе внутренних транскрибируемых спейсеров нами были выявлены 14 сайтов вариабельности и SNP в ITS1, и 16 – в ITS2; часть которых оказалась видоспецифична. Молекулярно-филогенетический анализ проводился по методу Байеса с помощью программы Mr. Bayes 3.1 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Индели в выравнивании были кодированы с помощью программы SeqState 1.4.1 (Müller, 2005) и добавлены как двоичные данные. В анализ мы включили также некоторое количество последовательностей ITS1–5.8SRNA–ITS2 из GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

На построенном нами филогенетическом древе (рис.) видно, что все алтайские (Alt*), а также взятые нами дополнительно в анализ тывинские (Ty*) и хакасские (Kha*) образцы видов рода *Stipa* составляют монофилетическую кладу и хорошо дифференцированы от других родов алтайских представителей трибы Ковылевых. Внутри этой клады можно выделить три субклады и два отдельных вида, занимающих неопределенное положение. Так, все виды, имеющие длинные, ясно-перистые ости, и относимые многими исследователями, и, в частности, Н.Н. Цвелевым (2011) к типовой секции *Stipa*, группируются в единой субкладе.

Виды с не-перистыми остями, традиционно относимые к секции *Leiostipa* Dumort., также в целом образуют хорошо дифференцированную субкладу, однако здесь имеются исключения. В частности, в эту же кладу попадает гибридогенный вид *S. consanguinea*, относимый Н. Н. Цвелевым (2011) к выделенной им недавно секции *Hemibarbatae* Tzvelev, у которого один из предполагаемых родителей – *S. krylovii* из секции *Leiostipa*. Также к секции *Hemibarbatae* Н. Н. Цвелев относил и *S. korshinskyi*. Оба этих вида морфологически занимают промежуточное положение между видами других секций. Однако по нашим данным *S. korshinskyi* занимает неопределенное положение в кладе рода *Stipa*, аналогично виду *S. lessingiana*, который, в свою очередь, был отнесен в секцию *Subbarbatae* Tzvelev (Цвелев, 2011). В кладе, соответствующей секции *Leiostipa*, хорошо обособлен вид *S. grandis*; исследованные нами три образца из двух удаленных местонахождений, оказались идентичны. Их последовательности содержали несколько видоспецифичных замен в ITS1 и ITS2.

У *S. krylovii* выявлен незначительный внутривидовой полиморфизм последовательностей ITS1 и ITS2, однако в целом все исследованные нами образцы из разных местонахождений попадают в еди-

ную субкладу, соответствующую секции *Leiostipa*, так же, как и образец FN434558 из GenBank. Исключение составил единственный морфологически нетипичный образец из Тывы, с молекулярной точки зрения обнаруживший большее сходство с морфологически типичными образцами *S. capillata*. Мы полагаем, что подобные образцы требуют дополнительных исследований.

Неожиданными для нас оказались результаты исследования собранных нами образцов *S. capillata*. Этот широко распространенный вид в разных частях ареала демонстрирует морфологический полиморфизм: довольно часто отмечаются экземпляры с открытыми узлами генеративных побегов и/или слаборазвитыми щетинками коронки на нижней цветковой чешуе у основания ости, в то время как у типичных экземпляров стеблевые узлы всегда скрыты влагалищами, а коронка полностью отсутствует. Все три исследованных нами таких «нетипичных» образца из Алтайского края и Хакасии попадают в субкладу, соответствующую секции *Leiostipa*, и обнаруживают родство с образцами *S.*

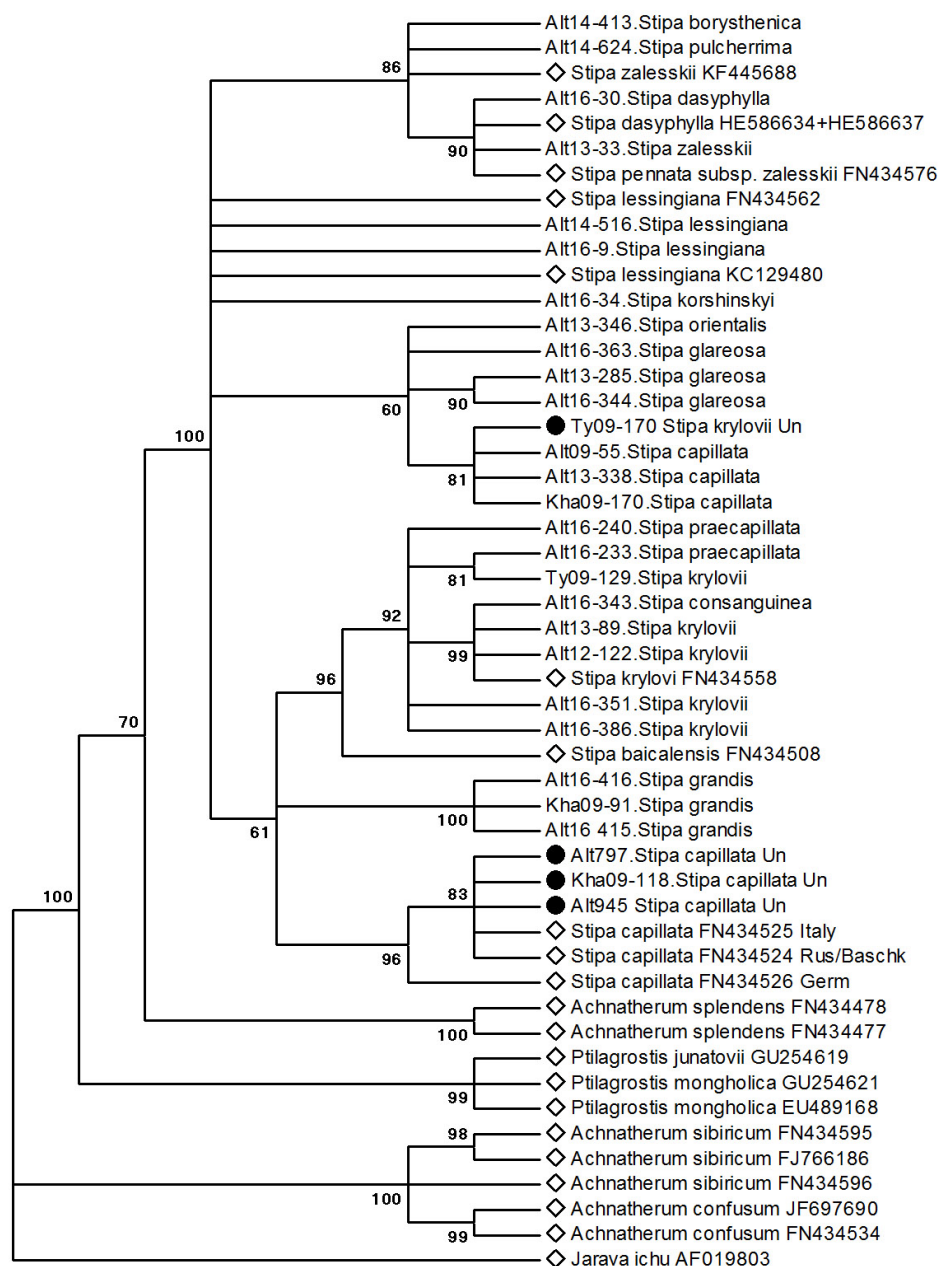


Рис.. Филогенетическое дерево алтайских представителей трибы Stipeae, построенное методом байесовского анализа последовательностей ядерной ДНК района ITS1–5.8S рДНК–ITS2. ● – нетипичные по морфологии образцы. ◇ – последовательности, взятые из GenBank.

capillata из GenBank из разных частей ареала. Вместе с тем типичные образцы *S. capillata* из Горного Алтая и Хакасии, обнаруживая почти идентичные друг другу ITS-последовательности ДНК, попадают в иную субкладу, где располагаются виды, относимые Н.Н. Цвелевым (2011) к секциям *Smirnovia* Tzvelev и *Barbatae* Junge. Мы планируем дальнейшие молекулярно-филогенетические и морфолого-географические исследования этого вида.

Виды *S. glareosa* и *S. orientalis* по молекулярно-филогенетическим данным оказались весьма близки, несмотря на то, что такой морфологический признак как наличие соответственно одного или двух колен ости давал основание отнести эти виды к разным секциям: *Smirnovia* и *Barbatae* (Цвелев, 1976). Однако на молекулярно-филогенетическом древе они попадают в одну субкладу.

Недавно группа польских исследователей (Krawczyk et al., 2017) изучила возможность применения для молекулярно-филогенетического анализа ковылей иной ядерной последовательности ДНК – межгенного спейсера IGS, полагая, что межвидовой полиморфизм последовательностей ДНК этого участка должен быть выше, чем у районов ITS. В число анализируемых польскими учеными видов вошли 9 таксонов из числа исследованных нами, сравнение результатов по ITS-последовательностям вполне согласуются с молекулярно-филогенетическим древом по IGS. В частности, анализ последовательностей участка IGS подтверждает обособленность видов традиционных секций *Stipa* и *Leiostipa*, неопределенное положение *S. lessingiana* и родство видов *S. glareosa* и *S. orientalis*, также попадающих в единую обособленную субкладу.

Полученные нами молекулярно-филогенетические данные свидетельствуют о том, что анализ ITS-последовательностей у ковылей может и должен быть использован при изучении таксономии этого рода, в частности при решении вопроса о его секционном делении, а в ряде случаев – и для разграничения видов.

Благодарности. Работа выполнена с использованием ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» БИН РАН (Санкт-Петербург); при поддержке Программы фундаментальных исследований РАН I.2.41 «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России», и грантов РФФИ № 16-34-60195 мол_а_дк. № 18-04-01040. Авторы благодарят А. И. Шмакова, А. П. Шалимова, А. Н. Черепанова и А. В. Кораблина за неоценимую помощь в экспедиционных работах.

ЛИТЕРАТУРА

- Крылов П. Н. *Stipa* // Флора Западной Сибири. – Томск, 1928. – Т. 2. – С. 139–376.
- Ломоносова М. Н. *Stipa* // Флора Сибири. – Новосибирск: Наука, 1990. – Т. 2. – С. 222–230.
- Рожевич Р. Ю. *Lasiagrostis*, *Ptilagrostis*, *Stipa* // Флора СССР. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1934. – Т. 2. – С. 71–112.
- Смирнов П. А. *Stipa* // Флора юго-востока европейской части СССР. – Л., 1928. – Вып. 2. – С. 98–117.
- Цвелёв Н. Н. Злаки СССР. М.: Наука, 1976. – 788 с.
- Цвелев Н. Н. Заметки о трибе Ковылевых (*Stipeae* Dumort., *Poaceae*) // Новости сист. высш. раст., 2011. – Т. 43. – С. 20–29.
- Hamasha, H.R., von Hagen, K.B. & Röser, M. *Stipa* (*Poaceae*) and allies in the Old World: molecular phylogenetics realigns genus circumscription and gives evidence on the origin of American and Australian lineages // Plant Syst. Evol., 2012. – Vol. 298, №2. – P. 351–367.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics, 2001. – Vol. 17. – P. 754–755.
- Jacobs, S., R. Bayer, J. Everett, M. Arriaga, M. Barkworth, A. SabinBadereau, A. Torres, F. Vazquez, N. Bagnall. Systematics of the tribe *Stipeae* (*Gramineae*) using molecular data // Aliso, 2007. – Vol. 23. – P. 349–361.
- Krawczyk K., Nobis M., Nowak A., Szczecińska M., Sawicki J. Phylogenetic implications of nuclear rRNA IGS variation in *Stipa* L. (*Poaceae*) // Scientific Reports, 2017. – Vol. 7. – 11506 p. doi.org/10.1038/s41598-017-11804-x
- Müller K. SeqState: primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets // Appl. Bioinformatics, 2005. – Vol. 4, №1. – 659 p.
- Romaschenko K., Garcia-Jacas N., Susanna A., Peterson P.M., Soreng R.J., Futorna O. Systematics and evolution of the needle grasses (*Poaceae*: *Pooideae*: *Stipeae*) based on analysis of multiple chloroplast loci, ITS, and lemma micromorphology // Taxon, 2012. – Vol. 61, №1. – P. 18–44.