

**Идентификация коллекционных образцов рода *Spiraea* L. (Rosaceae)
Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН по
молекулярным данным**

**Identification of collection samples of the genus *Spiraea* L. (Rosaceae) of the
Botanical garden of the Institute of Biology of Komi SC UrB RAS according
molecular data**

Смирнова А. Н., Зайнуллина К. С.

Smirnova A. N., Zainullina K. S.

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия. E-mail: smirnova@ib.komisc.ru

Institute of Biology of Komi SC UrB RAS, Syktyvkar, Russia

Реферат. Род *Spiraea* L. подсемейства *Spiraeoideae* семейства Rosaceae таксономически сложен. Нами проведены молекулярно-генетические исследования с целью идентификации видов и таксонов подвидового ранга родового комплекса *Spiraea*. По результатам работы получены последовательности участка ITS рибосомальной ДНК 21 образца *Spiraea*, включая один природный образец местного вида *Spiraea media* Franz Schmidt, у части видов ITS фрагмент секвенирован впервые.

Ключевые слова. Ботанический сад, идентификация, ITS-регион, нуклеотидная последовательность, рДНК, *Spiraea*, таксономия.

Summary. The genus *Spiraea* L. of the subfamily *Spiraeoideae* of the Rosaceae family is taxonomically complex. We conducted molecular genetic studies to identify taxa of the genus. The ITS sequences of ribosomal DNA of 21 *Spiraea* samples including one wild sample of the local species of *Spiraea media* are obtained. Some of these ITS fragments were first sequenced.

Key words. Botanical garden, identification, ITS-region, nucleotide sequence, rDNA, *Spiraea*, taxonomy.

Введение

Для видовой идентификации и выявления гибридов растений необходимы исследования на стыке ботаники и генетики. Для того чтобы в полной мере изучить биологические особенности видов при интродукции, необходимо точно установить их таксономическую принадлежность. Нами проведены молекулярно-генетические исследования с целью идентификации видов и таксонов подвидового ранга рода *Spiraea* L.

Род *Spiraea* (спирея) подсемейства *Spiraeoideae* семейства Rosaceae таксономически сложен. Объем рода *Spiraea* до сих пор точно не установлен, т. к. имеется много сведений о межвидовых гибридах; разные авторы включают в него от 90 (Шульгина, 1954) до 100 (Бонюк, 2008) видов.

Известно, что спиреи при совместном произрастании, особенно в условиях культуры, способны давать гибриды (Мамаев, Семкина, 1988), что не гарантирует видовую чистоту растений, полученных из семян при перекрестном опылении. Идентификация видов рода *Spiraea* на основании только морфологических признаков затруднена и на сегодняшний день остается актуальным вопросом.

В течение последнего десятилетия активно ведется изучение систематики, генетической изменчивости и филогении рода *Spiraea* с привлечением разных молекулярных маркеров, в т. ч. ядерных (Zhang et al., 2006; Potter et al., 2007; Huh et al., 2008; Huh, 2012; Полякова и др., 2015). В настоящее время одними из наиболее популярных последовательностей для филогенетических исследований рас-

тений являются последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов (ITS – internal transcribed spacer). Цель исследования – идентификация коллекционных образцов рода *Spiraea* по молекулярно-генетическим данным. Задачи включали определение последовательности участка ITS (ITS1–5.8S–ITS2) рибосомальной ДНК у представленных коллекционных образцов *Spiraea* и верификацию таксономического статуса образцов спиреи по маркерным последовательностям ITS-фрагмента ДНК.

Материалы и методы

Объекты исследований – образцы видов и гибридов *Spiraea* коллекции Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН, материал для исследования – высушенные листья спиреи.

Общая ДНК была извлечена из высушенных измельченных образцов растений с помощью набора для извлечения ДНК из растительного материала "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Германия). Для амплификации фрагмента ITS1–5.8 S–ITS2 использовали праймеры ITS-5 5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3' и ITS-4 5'–TCCTCCGCTTATGATATGC–3'. Амплификация проводилась в термоциклере T100 (BioRad Laboratories, Inc, США) по схеме: предварительная денатурация 5 мин при 95 °С; 30 циклов: денатурация 30 сек при 94 °С, отжиг 30 сек при 57 °С, элонгация 40 сек при 72 °С; и финальная элонгация 2 мин при 72 °С. Продукты амплификации отделяли электрофорезом в 1,3 % агарозном геле. Для очистки полученного продукта использовался набор Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Количество выделенной ДНК и ПЦР-продукта определяли с помощью флуориметра Qubit 1.0 (Invitrogen/Life Technologies, США).

Результаты секвенирования были обработаны и проанализированы в программном обеспечении MEGA 7. Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов рДНК осуществлялся с помощью программы BLAST в базе данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

По результатам работы получены последовательности участка ITS рибосомальной ДНК 21 образца *Spiraea*, включая один природный образец местного вида *Spiraea media*, для части из них ITS фрагмент расшифрован впервые. В полученных последовательностях рибосомальной ДНК образцов спиреи общая длина ITS-участков варьировала от 622 до 752 п. н.

В анализе с помощью программы BLAST не выявлено 100%-ной идентичности последовательностей ITS исследуемых образцов спирей с образцами в GenBank. Степень идентичности определяли как долю (в процентах) одинаковых нуклеотидов, занимающих одни и те же позиции у каждой из сравниваемых нуклеотидных последовательностей (максимальная степень идентичности в сумме представлена итоговым баллом и процентом идентификации). За наиболее высокую степень идентичности принимали 99%-ный уровень.

Заключение

При сравнении последовательностей ITS рибосомной ДНК, выделенной из коллекционных образцов *Spiraea*, с данными NCBI GenBank установлено, что все исследуемые образцы относятся к видам *Spiraea* семейства Rosaceae. Наивысшая степень идентичности полученных последовательностей соответствует 99%-ному уровню последовательностей нуклеотидов из GenBank.

Образец *Spiraea media*, взятый нами для сравнения из природной популяции флоры Республики Коми, оказался высокоидентичным (99%) как образцам данного вида в коллекции Ботанического сада (БС), так и образцам в базе данных GenBank.

Образцы подвидового ранга – формы и разновидности – оказались родственными образцам конкретного вида, с чуть меньшим процентом совпадения последовательностей (*S. media* f. *mollis* C. K. Schneid). Для гибридов максимальное совпадение последовательностей закономерно оказалось от одной или обоих исходных родительских видов (*Spiraea* × *bumalda* Burv., *S.* × *vanhouttei* (Briot.) Zabel).

Образец *Spiraea miyabei* Koidz. на 99 % идентифицируется как очень близкий по морфологии и филогении вид *Spiraea rosthornii* Pritz., *Spiraea flexuosa* Fisch. – как *Spiraea media*. С учетом вновь полученных данных эти образцы в коллекции БС, возможно, следует переопределить.

Выявленная нами степень нуклеотидного полиморфизма ITS-региона демонстрирует приемлемую пригодность для идентификации видов и меньшую – для обнаружения межвидовых гибридов рода

Spiraea. Предварительные результаты анализа показывают, что в целом молекулярные и биоморфологические данные согласуются между собой.

Таким образом, применение молекулярно-генетических методов с целью идентификации видов в условиях культивирования следует применять в сочетании с традиционными методами определения растений по определителям и гербарным образцам. Полученные результаты по рибосомальным ITS-последовательностям могут служить дополнительным материалом при изучении филогении рода *Spiraea* L. Полученные ITS последовательности спирей частично депонированы в международном банке генетических данных NCBI GenBank под номерами MK530326, MK570224, MK570226, MK570285, MK570293, MK570298, MK570301, MK570302, MK570303, MK570453 и MK570455.

Благодарности

Выражаем огромную благодарность сотрудникам ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии Коми НЦ УрО РАН – Шадрину Д. М. и Пылиной Я. И. за выделение и секвенирование ДНК.

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Закономерности процессов репродукции ресурсных растений в культуре на европейском Северо-Востоке» (№ АААА–А17–117122090004–9) на базе УНУ «Научная коллекция живых растений» Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН, регистрационный № 507428. Гербарные образцы хранятся в УНУ «Научный гербарий СУКО Института биологии Коми НЦ УрО РАН».

ЛИТЕРАТУРА

- Бонюк З. Г.** Таволги (*Spiraea* L.). – Киев: ВПЦ Київський університет, 2008. – 248 с.
- Мамаев С. А., Семкина Л. А.** Интродуцированные деревья и кустарники Урала (розоцветные). – Свердловск: АН СССР, УО, 1988. – 105 с.
- 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. ст. по материалам Четырнадцатой междунар. науч.-практ. конф. (Барнаул, 25–29 мая 2015 г.). – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2015. – С. 353–358.
- Шульгина В. В.** Род Таволга – *Spiraea* L. // Деревья и кустарники СССР. – Т. 3. – М.–Л., 1954. – С. 286–332.
- BLAST:** Basic local alignment search tool, 2018 URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Дата обращения 02.12.2018)
- GenBank Home**, 2018. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (Дата обращения 14.01.2019)
- Huh M. K., Huh H. W., Lee S. Y.** A taxonomic study of the genus *Spiraea* in Korea using sequences of ITS // Journal of Life Science, 2008. – Vol. 18. – № 5. – P. 694–700.
- Huh M. K.** Analysis of the phylogenetic relationships in the genus *Spiraea* based on the nuclear ribosomal DNA ITS region // Journal of Life Science, 2012. – № 22. – P. 285–292.
- Potter D., Still S. M., Grebenc T., Ballian D., Bozic G., Franjiae J., Kraigher H.** Phylogenetic relationships in tribe *Spiraeae* (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data // Plant Syst. Evol., 2007. – № 266 (1–2). – P. 105–118.
- Zhang Z., Fan L., Yang J., Hao X., Gu Z.** Alkaloid polymorphism and ITS sequence variation in the *Spiraea japonica* complex (Rosaceae) in China: traces of the biological effects of the Himalaya–Tibet Plateau uplift. // Am. J. Bot., 2006. – № 93 (5). – P. 762–769.