

О различии видов тростника (*Phragmites*, Poaceae) по молекулярно-филогенетическим данным

On distinction of the reed species (*Phragmites*, Poaceae) according to the molecular phylogenetic data

Носов Н. Н.¹, Гнутиков А. А.², Пунина Е. О.¹, Мачс Э. М.¹, Конечная¹ Г. Ю., Родионов А. В.^{1,3}

Nosov N. N.¹, Gnutikov A. A.², Punina E. O.¹, Machs E. M.¹, Konechnaya¹ G. Yu., Rodionov A. V.^{1,3}

¹ ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: nnosov2004@mail.ru, elizaveta_punina@mail.ru, avrodionov@mail.ru

¹ V. L. Komarov Botanical Institute (BIN RAS), St-Petersburg, Russia

² ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: alexandr2911@yandex.ru;

² N. I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St-Petersburg, Russia

³ Санкт-Петербургский Государственный университет (СПбГУ), г. Санкт-Петербург, Россия.

³ Saint-Petersburg State University (SPbSU), St.-Petersburg, Russia

Реферат. Проведен молекулярно-филогенетический анализ маркерных последовательностей – районов ITS1-5.8S рДНК-ITS2 и trnL–trnF у тростника обыкновенного (*Phragmites australis*), тростника высочайшего (*P. altissimus*), некоторых предполагаемых гибридов между этими видами, а также образца *P. australis* s. l. из Тувы. Последовательности ITS1 тувинского образца исследованы методом секвенирования нового поколения (NGS), выявляющим внутригеномное разнообразие ITS-последовательностей у аллополиплоидного вида. Мы показали, что последовательности района ITS1-5.8S рДНК-ITS2 *P. australis* и *P. altissimus* различаются большим числом однонуклеотидных замен и делеций, в том числе делецией длиной 12 п.н. Образец *P. australis* s. l. из Тувы (р. Хемчик) демонстрирует обособленное положение на филогенетическом древе. По хлоропластным последовательностям trnL–trnF все изученные нами виды тростника не имеют значимых отличий между собой.

Ключевые слова. Гибридизация, злаки, молекулярная филогения, ITS, NGS, *Phragmites*, trnL–trnF.

Summary. Molecular phylogenetic analysis of the marker sequences ITS and trnL–trnF of the *Phragmites australis*, *P. altissimus*, some putative hybrids between them and the sample of *P. australis* s. l. from Republic of Tuva was performed. ITS1 sequences of the sample from Tuva were studied by the New-generation sequencing method (NGS) revealing intragenomic polymorphism of the ITS sequences in allopolyploid species. We showed good differences between *P. australis* and *P. altissimus* in the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences by many single-nucleotide substitutions and deletions, in particular, there is a 12 b.p. deletion. *P. australis* s. l. sample from Tuva (Hemchik river) demonstrates a separate position on the phylogenetic tree. All reed species studied by us do not have significant differences between each other according to the chloroplast sequences trnL–trnF.

Keywords. Grasses, hybridization, ITS, molecular phylogeny, NGS, *Phragmites*, trnL–trnF.

Виды рода Тростник (*Phragmites* Adans.) распространены на всех континентах кроме Антарктиды. Локальные популяции тростника морфологически разнообразны; западно-европейские систематики разделяют их на 4–6 видов и подвидов (Clayton, Renvoize, 1986; The Plant List. URL: <http://www.theplantlist.org/>), но, по мнению Н. Н. Цвелёва, их не менее 20 (Цвелёв, 2011; Цвелёв, Пробатова, 2019). Для России в последней обработке приводится 7 видов рода (Цвелёв, Пробатова, 2019), причем различия между видами имеются как по морфологическим признакам соцветия и вегетативных органов, так и по хромосомным числам. Для признаваемого многими систематиками японского вида *P. japonicus*

Steud., приводится лишь одно хромосомное число $2n = 48$, для *P. altissimus* (Benth.) Mabilie тоже одно – $2n = 36$, а для вида *P. australis* (Cav.) Trin. ex Steud. приводятся хромосомные числа (3x, 4x, 6x, 7x, 8x, 10x, 11x and 12x при $x = 12$). Наиболее характерны для этого вида тетраплоиды ($2n = 48$) и октоплоиды ($2n = 96$) (Clevering, Lissner, 1999; Цвелёв, 2012).

Во флоре России наиболее распространены два вида тростника – тростник высочайший (*P. altissimus*) и тростник южный или обыкновенный, *P. australis*. Образцы *P. altissimus* отличаются от тростника обыкновенного очень крупными размерами всего растения и листа (более 26 мм шириной), морфологией соцветия, а также более поздними сроками зацветания (Цвелёв, Пробатова, 2019). Ареал *P. altissimus* со временем меняется. Во «Флоре СССР» Е. М. Лавренко и В. Л. Комаров (1934) приводят его для водоемов Нижней Волги, Южного Закавказья, долины р. Амударьи, Туркмении. Через 40 лет Н. Н. Цвелёв (1976) отмечает его присутствие в южной Прибалтике, в Средне-Днепровском и Волжско-Донском районах, Молдавии, Причерноморье, в Крыму, во многих районах Западной Сибири и Дальнего Востока. С начала 90-х годов XX в. *P. altissimus* стал активно расселяться на север России, поднимаясь с юга по Дону и Волге (Папченков, 2008). Он распространился по Тверской, Новгородской, Псковской, Ленинградской, Вологодской областям (Цвелёв, Носкова, 1996; Цвелёв, 2000; Нотов, 2008; Папченков, 2008; Конечная и др., 2012). В последней сводке Н. Н. Цвелёв и Н. С. Пробатова (2019) приводят его для Карелии, Ладожско-Ильменского района, Верхней Волги, Приморья и Курильских островов. Найден он в Удмуртии, Тобольской и Тюменской областях, в Ханты-Мансийском округе (Капитонова, Дюкина, 2005; Капитонова, 2016, 2017), на северо-востоке Якутии (Николин, 2016). Вид признан инвазионным в 8 регионах Европейской России (Виноградова и др., 2015).

Специальное исследование российских видов тростника молекулярно-филогенетическими методами ранее не проводилось. В рамках данной работы мы секвенировали и проанализировали последовательности ITS1–гена 5.8S рРНК–ITS2 и trnL–trnF у нескольких образцов, по морфологии относимых к *P. australis*, *P. altissimus* или несущих признаки, характерные для обоих видов. Эти маркерные последовательности в настоящее время широко используются для идентификации видов в сложных группах родства (Шнеер, 2009; Hollingsworth et al., 2011). Материалом для исследования послужили растения *P. australis*, *P. altissimus* и предположительных гибридов между ними, собранные в Псковской и Новгородской областях, на Северном Кавказе (Ставропольский край, Краснодарский край, республика Адыгея, Кабардино-Балкария) и в Республике Тува. Всего было исследовано 8 образцов тростника. Один образец *P. australis* s. l., собранный нами в Туве, был исследован методом локус-специфичного секвенирования нового поколения (NGS), позволяющим выявлять внутригеномный полиморфизм рДНК и, тем самым, выявлять вероятных предков аллополиплоидов. Методом NGS были изучены последовательности ITS1. Секвенсы, полученные методом NGS, были отсортированы с помощью алгоритма bubble sorting, в молекулярно-филогенетический анализ нами были включены самые массовые риды (прочтения). Секвенирование маркерных последовательностей по Сэнгеру проводилось на генетическом анализаторе ABI3500 в Центре коллективного пользования БИН РАН, а секвенирование нового поколения на платформе Illumina – в ЦКП «геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии. Полученные нами последовательности были проанализированы методом Байеса с помощью программы Mr.Bayes 3.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001), 1000000 итераций с учетом оптимальной эволюционной модели, рассчитанной в MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для последовательностей ITS1–гена 5.8S рРНК–ITS2 и участка ITS1 была выбрана модель GTR+I+G, для trnL–trnF – T92+G.

Как мы видим, исследованные нами образцы по результатам анализа последовательности ITS1–гена 5.8S рРНК–ITS2 методом Байеса четко разделяются на три группы (рис. 1). В первую из них, соответствующую первому риботипу, попадают морфологически типичные образцы *Phragmites australis* s. str. из Новгородской области, Ставрополя, а также образцы из Китая и США, взятые нами в анализ из международной базы данных «Генбанк» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Типичные образцы *P. australis*, исследованные нами, характеризуются листьями средней ширины (6–25 мм) с зубчатым краем. Второй риботип характерен для части образцов *P. japonicus* из Южной Кореи (также взяты нами из базы данных «Генбанк»). Третий риботип характеризует тростник высочайший (*P. altissimus*). Он формирует кладу, сестринскую к *P. australis* s. str. + *P. japonicus*.

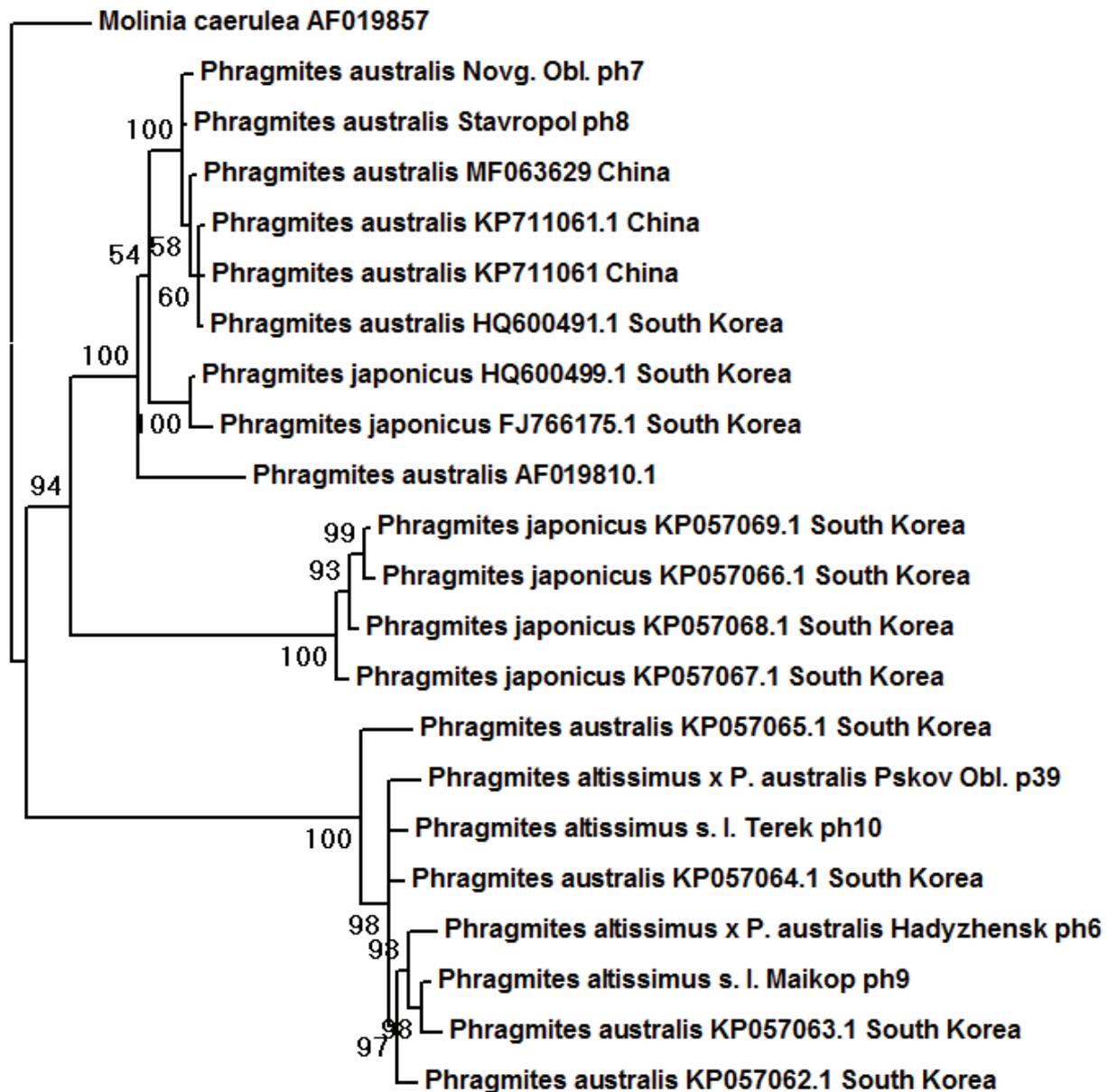


Рис. 1. Филогенетическое древо, отражающее родство исследованных нами видов тростника (*Phragmites*), построенное по результатам анализа последовательностей ITS1-5.8S рДНК-ITS2.

Исследованные в нашей работе молекулярно-филогенетическим методом образцы, собранные в республиках Адыгея и Кабардино-Балкария, морфологически соответствуют *P. altissimus*, но имеют густоопушенные снизу листья. Кроме того, в эту же кладу по результатам анализа ITS попадают и морфологически промежуточные между *P. altissimus* и *P. australis* образцы. Это растения из г. Хадыженска (Краснодарский край) и Псковской области. Помимо промежуточных параметров ширины листа (24–26 мм), они имеют цельный край листа, напоминающий таковой у *P. australis* subsp. *pseudodonax* (Rabenh.) Rauschert. Образец из Хадыженска, вероятнее всего, является гибридом первого поколения *P. altissimus* и *P. australis*, так как при секвенировании методом Сэнгера во всех нуклеотидных позициях исследованного участка ITS1–гена 5.8S рДНК–ITS2, по которым различаются последовательности ITS у видов *P. australis* и *P. altissimus*, мы видим полиморфные сайты (два разных нуклеотида в одной позиции) (о полиморфных сайтах и их использовании для определения предков гибридов см. Пунина и др., 2012 и др.).

Интересны данные, полученные нами при анализе последовательности ITS1 методом NGS у образца *P. australis* s. l. из Тувы (рис. 2). Большинство ридов (прочтений) ITS1 этого образца отличаются от всех имеющихся в базе данных «Генбанк» последовательностей тростника. На филогенетическом древе, построенном методом Байеса, они попадают в две отдельные клады, не показывающие близкого родства с другими, секвенированными нами и другими исследователями образцами представителей рода *Phragmites* (рис. 2). Подчеркнем, что при этом морфологически тувинский образец *P. australis* s. l. значимо не отличается от типичных образцов *P. australis*. Образец предполагаемого (судя по морфологии) гибрида *P. altissimus* × *P. australis* из Псковской области р40 (рис. 2), у которого был амплифицирован только участок ITS1, демонстрирует близость именно к кладе, включающей *P. australis* s. str., но не *P. altissimus*.

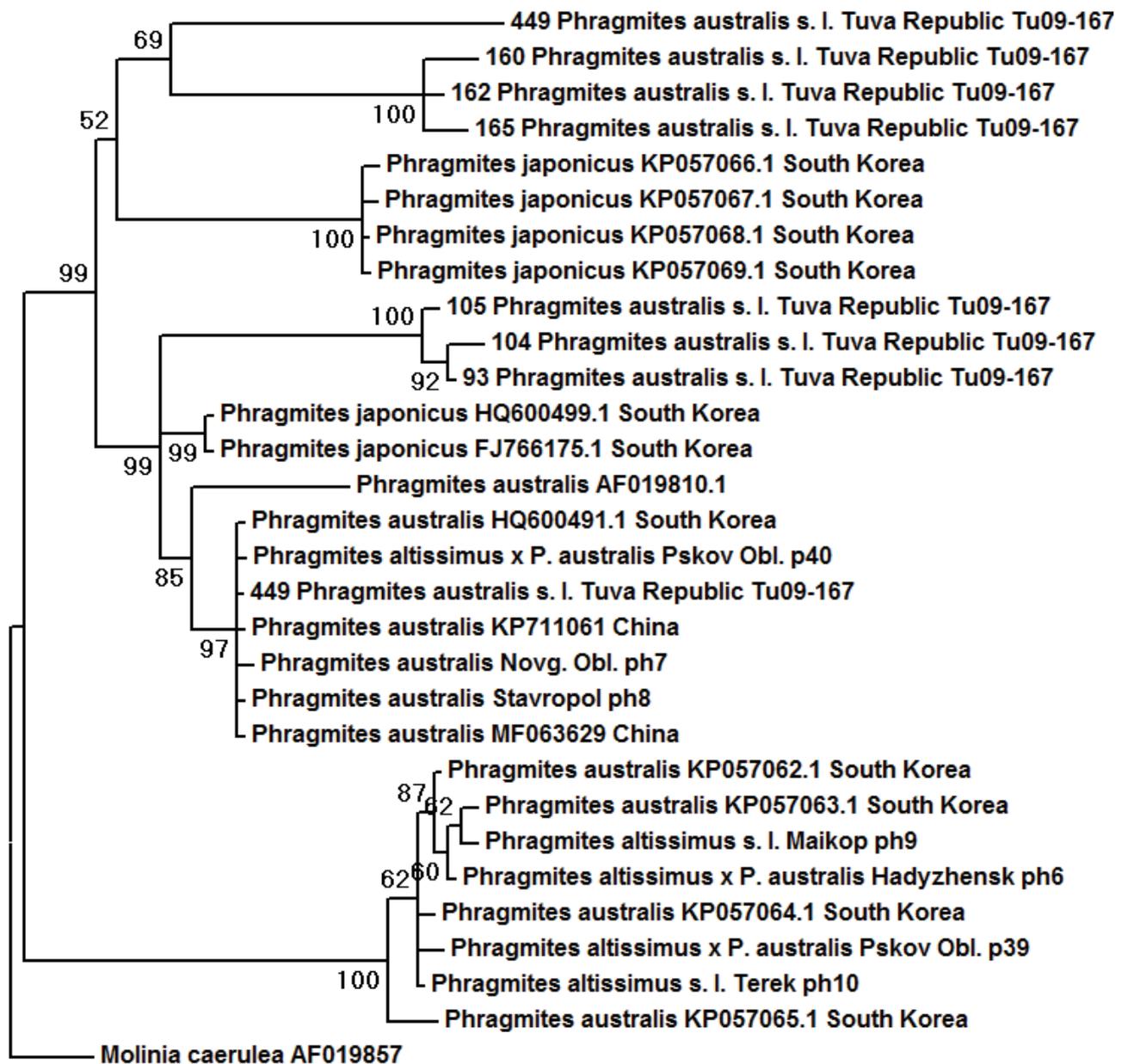


Рис. 2. Положение гибридного образца *Phragmites australis* s. l. из Республики Тува по результатам анализа последовательности ITS1 методом локус-специфичного секвенирования нового поколения (NGS).

По материнской линии (по результатам анализа хлоропластных сиквенсов *trnL-trnF*) все изученные нами образцы тростников из РФ имеют единый геном, самостоятельных групп среди не выделяется (рис. 3). Предок по материнской линии для всех изученных нами тростников, как *P. australis* s. str., так и *P. altissimus*, общий.

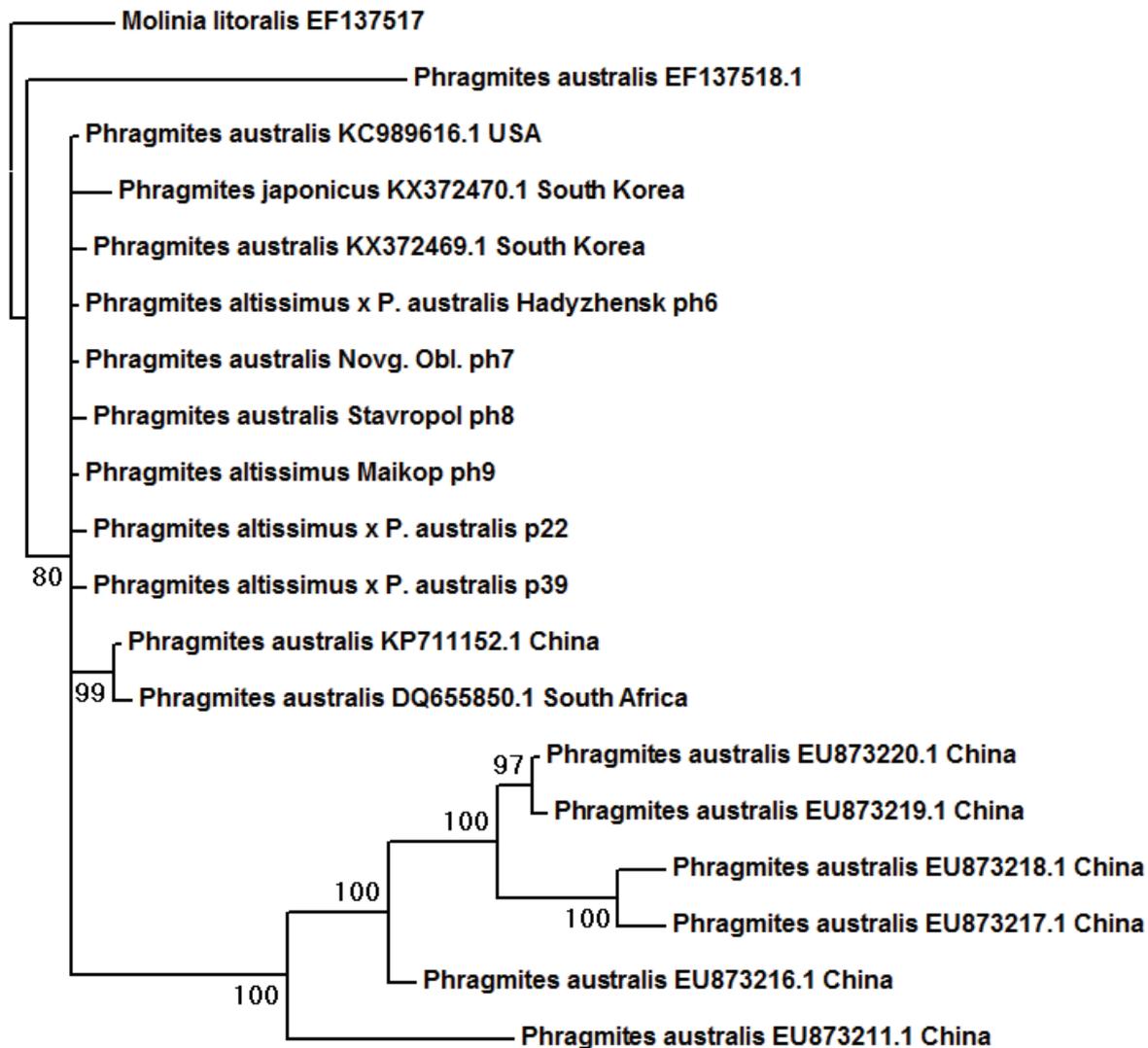


Рис. 3. Филогенетическое древо, отражающее родство исследованных нами видов тростника (*Phragmites*), построенное по результатам анализа последовательностей *trnL-trnF*.

Таким образом, мы показали, что при секвенировании района ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 генома ядра выделяются риботипы, четко характеризующие два вида, признаваемые в современных российских обработках рода (Цвелёв, 2012; Цвелёв, Пробатова, 2019): инвазивный *P. altissimus* и *P. australis*. Образец из Тувы представляет собой аллополиплоид, оба субгенома которого занимают особые места на филогенетическом древе рода *Phragmites*.

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность за помощь и обсуждение результатов В. Н. Тихомирову. Исследование выполнено на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов». Работа выполнена по Госзаданию «Сосудистые растения Евразии: Систематика, Флора, Растительные Ресурсы», регистрационный №: АААА-А19-119031290052-1 и при поддержке гранта РФФИ № 18-04-01040.

ЛИТЕРАТУРА

- Виноградова Ю. К., Акатова Т. В., Аненхонов О. А., Анкипович Е. С., Антипова Е. М., Антонова Л. А., Афанасьев В. Е., Багрикова Н. А., Баранова О. Г., Борисова Е. А., Борисова М. А., Бочкин В. Д., Буланый Ю. И., Верхозина А. В., Григорьевская А. Я., Ефремов А. Н., Зыкова Е. Ю., Кравченко А. В., Крылов А. В., Куприянов А. Н., Лавриненко Ю. В., Лактионов А. П., Лысенко Д. С., Майоров С. Р., Меньшакова М. Ю., Мещерякова Н. О., Мининзон И. Л., Михайлова С. И., Морозова О. В., Нотов А. А., Панасенко Н. Н., Пликина Н. В., Пузырёв А. Н., Раков Н. С., Решетникова Н. М., Рябовол С. В., Сагалаев В. А., Силаева Т. Б., Силантьева М. М., Стародубцева Е. А., Степанов Н. В., Стрельникова Т. О., Терёхина Т. А., Тремасова Н. А., Третьякова А. С., Хорун Л. В., Чернова О. Д., Шауло Д. Н., Эбель А. Л.** Black-лист» инвазионных растений России // Проблемы промышленной ботаники индустриально развитых регионов. Материалы IV Междунар. конф. и отчётного заседания Рабочей группы Проекта ПРООН-ГЭФ. – Кемерово, Кузбасский бот. сад, 2015. – С. 68–72.
- Капитонова О. А.** Новая находка *Phragmites altissimus* (Poaceae) в западной Сибири // Вестник Курганского государственного университета, 2016. – № 4. – С. 21–23.
- Капитонова О. А.** Находка Тростника высочайшего (*Phragmites altissimus*, Poaceae) на севере Тюменской области // Зырянские чтения, 2017. – С. 207–208.
- Капитонова О. А., Дюкина А. Р.** О новой находке Тростника высочайшего (*Phragmites altissimus*) в Удмуртии // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле, 2005. – № 10. – С. 126–128.
- Конечная Г. Ю., Ефимов П. Г., Цвелёв Н. Н., Смагин В. А., Крупкина Л. И.** Новые находки редких видов сосудистых растений на северо-западе Европейской России // Бюл. МОИП. Отд. биол., 2012. – Т. 117, Вып. 3. – С. 64–70.
- Лавренко, Е. М., Комаров В. Л.** Род Тростник – *Phragmites* Adans. // Флора СССР. – Л.: Изд-во АН СССР, 1934. – Т. 2. – С. 303–306.
- Николин Е. Г.** Инвазия *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (Poaceae) в Северо-Восточную Якутию // Природные ресурсы Арктики и Субарктики, 2016. – № 2. – С. 115–117.
- Нотов А. А.** Адвентивный компонент флоры Тверской области: динамика состава и структуры. – Тверь: Твер. Гос. ун-т, 2009. – 473 с.
- Папченков В. Г.** О распространении *Phragmites altissimus* (Benth.) Nabile (Poaceae) // Российский Журнал Биологических Инвазий, 2008. – № 1. – С. 36–41.
- Пунина Е. О., Мачс Э. М., Крапивская Е. Е., Ким Е. С., Мордак Е. В., Мякошина Ю. А., Родионов А. В.** Межвидовая гибридизация в роде *Raeonia* (Raeoniaceae): полиморфные сайты в транскрибируемых спейсерах генов 45S рРНК как индикаторы происхождения природных и искусственных гибридов пионов // Генетика, 2012. – Т. 48, № 7. – С. 812–826.
- Цвелёв Н. Н.** Злаки СССР. – М.: Наука, 1976. – 788 с.
- Цвелёв Н. Н.** Определитель сосудистых растений Северо-Западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области). – СПб.: Изд-во СПХФА, 2000. – 781 с.
- Цвелёв Н. Н.** О родах тростник (*Phragmites* Adams.) и змеёвка (*Cleistogenes* Keng) семейства злаков (Poaceae) в России // Нов. сист. высш. раст., 2012. – Т. 43. – С. 30–44.
- Цвелёв Н. Н., Носкова М. Г.** Флористические находки на острове Нерва и других островах восточной части Финского залива // Бот. журн., 1996. – Т. 81, № 4. – С. 97–103.
- Цвелёв Н. Н., Пробатова Н. С.** Злаки России. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2019. – 646 с.
- Шнеер В. С.** ДНК штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика, 2009. – Т. 54, № 11. – С. 1436–1448.
- Clayton W. D., Renvoize S. A.** Genera Graminum. Grasses of the world // Kew Bull. Additional Series, 1986. – Vol. 13. – Pp. 1–389.
- Clevering O. A., Lissner J.** Taxonomy, chromosome numbers, clonal diversity and population dynamics of *Phragmites australis* // Aquatic Botany, 1999. – Vol. 64, № 3–4. – Pp. 185–208.
- Hollingsworth P. M., Graham S. W., Little D. P.** Choosing and using a plant DNA barcode // PLoS One, 2011. – Vol. 6. – Iss. 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0019254
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics, 2001. – Vol. 17. – Pp. 754–755. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Kumar S., Stecher G., Tamura K.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets // Molecular Biology and Evolution, 2016. – Vol. 33, № 7. – Pp. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- The Plant List (TPL)** URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Poaceae/Phragmites> (Accessed 10 April 2020).