

К проблеме идентификации инвазионных видов борщевика на территории Республики Коми

The problem of identification of invasive species of *Heracleum* on the territory of the Komi Republic

Шадрин Д. М.¹, Далькэ И. В.¹, Захожий И. Г.¹, Малышев Р. В.¹, Кожин М. Н.^{2,3}, Чадин И. Ф.¹

Shadrin D. M.¹, Dalke I. V.¹, Zakhozhiy I. G.¹, Malyshev R. V.¹, Kozhin M. N.^{2,3}, Chadin I. F.¹

¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия.

E-mail: shdimas@ya.ru; dalke@ib.komisc.ru; zakhozhiy@ib.komisc.ru; malrus@ib.komisc.ru; chadin@ib.komisc.ru

¹ Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the RAN, Syktyvkar, Russia

² Московский государственный университет, г. Москва, Россия

² Moscow state university, Moscow Russia

³ Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н. А. Аврорина, г. Апатиты, Россия.

E-mail: mnk_umba@mail.ru

³ Polar Alpine Botanical Garden and Institute, Apatity, Russia

Реферат. По данным литературы, *Heracleum mantegazzianum* Somm. et Lev. и *H. sosnowskyi* Manden. (Apiaceae Lindl.) могут считаться экологическими двойниками по целому ряду особенностей индивидуального развития, структуры и динамики популяций. В систематике рода *Heracleum* до настоящего времени остается много неясностей, встречаются случаи межвидовой гибридизации. Не всегда в процессе интродукции растений этого рода проводился и документировался процесс идентификации. Авторами собраны и проанализированы образцы растений *Heracleum sosnowskyi* с разной степенью расчленения листовой пластинки в окрестностях городов Сыктывкара (Республика Коми), Апатиты и Кировск (Мурманская область). Для собранных образцов *H. sosnowskyi* получены нуклеотидные последовательности генов *rbcl* и *matK*, межгенного спейсера *trnH-psbA* хлоропластной ДНК и последовательности ITS и ETS ядерной ДНК. Последовательности генов *rbcl* и *matK*, а также последовательности ETS для вида *H. sosnowskyi* были получены впервые. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей растений рода *Heracleum* позволил определить потенциальные ДНК маркеры для молекулярной идентификации представителей вида *H. sosnowskyi*. Показано, что для идентификации растений *H. sosnowskyi* последовательности генов *rbcl* и *matK* хлоропластной ДНК, а также последовательность ITS2 ядерной ДНК не обладают достаточным уровнем полиморфизма среди близкородственных видов и, следовательно, не могут применяться для идентификации растений *H. sosnowskyi*. Анализ последовательностей *trnH-psbA* и ETS показал, что вне зависимости от степени расчленения листовой пластинки и географического происхождения все отобранные образцы можно отнести к *H. sosnowskyi*. Для окончательного ответа на данный вопрос необходимо включить в анализ больше данных для растений *H. mantegazzianum*.

Ключевые слова. ДНК штрихкодирование, инвазивный вид, Республика Коми, *Heracleum mantegazzianum*, *Heracleum sosnowskyi*.

Summary. According to literature, *Heracleum mantegazzianum* Somm. et Lev. and *H. sosnowskyi* Manden. (Apiaceae Lindl.) can be considered as ecological twins in a number of traits. There are still many uncertainties in the taxonomy of the genus *Heracleum*, and there are cases of interspecific hybridization. The process of identification was not always carried out and documented well during the introduction of plants of this genus in many regions of Europe. The authors collected and analyzed samples of *Heracleum sosnowskyi* plants with different degrees of leaf blade dissecting near Syktyvkar (Komi Republic) and Apatity (Murmansk region). Nucleotide sequences of genes *rbcl* and *matK*, the intergenic spacer *trnH-psbA* of chloroplast DNA and sequences of ITS and ETS of nuclear DNA were obtained for collected samples of the *rbcl* and *matK* gene sequences as well as the ETS sequences for *H. sosnowskyi* species were obtained for the first time. Comparative analysis of nucleotide sequences of plants of the genus *Heracleum* allowed us to determine potential DNA

markers for molecular identification of *H. sosnowskyi* species. It was shown that for identification of *H. sosnowskyi* plants, the sequences of *rbcL* and *matK* chloroplast genes, as well as the ITS2 nuclear DNA sequence do not have sufficient polymorphism among closely related species and, therefore, cannot be used for identification of *H. sosnowskyi* plants. Analysis of *trnH-psbA* and ETS sequences showed that regardless of the degree of leaf blade dissection and geographic origin, all selected samples can be attributed to *H. sosnowskyi*. For a definitive answer to this question, more data for the plant *H. mantegazzianum* should be included in the analysis.

Key words. DNA barcoding, *Heracleum mantegazzianum*, *Heracleum sosnowskyi*, invasive species, Komi Republic.

Введение. Несколько видов гигантских травянистых растений рода *Heracleum* из секции *Pubescentia* Manden. (Манденова, 1950), достигающих высоты 3–5 м и отнесенных при их описании к эндемикам Кавказа, в настоящее время произрастают далеко за пределами естественного ареала. Высокие декоративные и кормовые качества этих видов сделали их объектами целенаправленной интродукции во многих странах Европы. Наибольшее распространение на территории этого континента получили виды *H. mantegazzianum* Somm. et Lev. (центральная и западная часть Европы, GBIF. <https://www.gbif.org/species/3034825>), *H. persicum* Desf. ex Fisch., (север Европы, GBIF. <https://www.gbif.org/species/3628745>) и *H. sosnowskyi* Manden (восточная часть Европы, GBIF. <https://www.gbif.org/species/3642949>). Начиная со второй половины 20-го века указанные виды начинают активно распространяться за пределы культурных посевов и в настоящее время имеют статус инвазионных видов. Исследования биологии видов *H. mantegazzianum* и *H. sosnowskyi*, проведенные в пределах их инвазионных ареалов, с целью разработки мер контроля распространения этих видов показали, что данные виды могут считаться экологическими двойниками по целому ряду особенностей индивидуального развития, структуры и динамики популяций (Půšek et al., 2007; Dalke et al. 2015). В систематике рода *Heracleum* до настоящего времени остается много неясностей, встречаются случаи межвидовой гибридизации (Půšek et al., 2007; Sortland, 2010). Следует учитывать, что не всегда в процессе интродукции растений этого рода проводился и документировался процесс идентификации (Кудинов и др., 1980; Скупченко, 1989; Půšek et al., 2007). Так, например, с точки зрения Шарки Яходовой с соавторами (Půšek et al., 2007), интродукторам было бы крайне сложно собрать семена исключительно одного вида в местах совместного произрастания двух видов: *H. mantegazzianum* и *H. sosnowskyi*, так как основным признаком, различающих два этих вида – степень расчлененности долей листьев, практически невозможно использовать в период плодоношения. Поэтому, как отмечает А. Л. Эбель с соавторами (Эбель и др., 2018, с. 1065): «...использование названия *Heracleum sosnowskyi* для выращиваемых в культуре и одичавших растений «гигантского борщевика» довольно условно». Утверждение об условности идентификации также можно применить и в отношении *H. mantegazzianum*. Разработка методов надежной идентификации инвазионных видов гигантских борщевиков необходима для решения вопросов систематики, оценки направления и скорости микроэволюционных процессов этих видов в условиях инвазии, а также имеет принципиальное практическое значение для принятия управленческих решений при разработке программ по борьбе с их нежелательными зарослями на уровне отдельных регионов и целых стран.

Для поиска оптимального маркера обладающего достаточной дискриминационной способностью для растений *H. sosnowskyi* и *H. mantegazzianum*, нами была проанализирована литература по данной теме и имеющиеся в базах генетических данных NCBI и BOLD Systems последовательности для данных видов и ряда других видов из рода *Heracleum*. В первую очередь нами были проанализированы маркерные последовательности, рекомендованные консорциумом iBOL для идентификации представителей царства растений, включающие ген *rbcL*, ген *matK* и межгенный спейсер *trnH-psbA* хлоропластной ДНК, а также последовательность ITS2 ядерной ДНК (Шнеер, Родионов, 2018; Шеховцов и др., 2019).

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 16 образцов растений *H. sosnowskyi* из которых восемь имели более широкие доли листа первого порядка и восемь более узкие, по сравнению с первыми, четыре образца растений *Heracleum sphondylium* subsp. *sibiricum* (L.) Simonk. и три образца, обозначенные на рисунках как *Heracleum* sp., видовую принадлежность которых пока не удалось установить. Образцы были собраны в окрестностях г. Сыктывкара (Республика Коми) и городов. Апатиты и Кировск (Мурманская область).

Тотальную ДНК выделяли из высушенных листьев с помощью набора «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкциями производителя. Полимеразную цепную реакцию

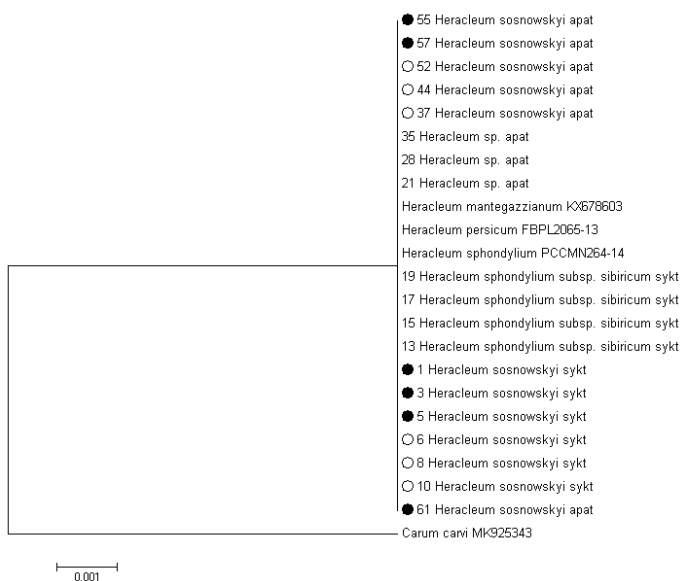


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения последовательностей гена *rbcL* хпДНК. Цифрами обозначены номера образцов полученных авторами. sykt – место сбора образцов г. Сыктывкар, apat – место сбора образцов г. Апатиты. Черный круг – перестолопастное рассечение листовой пластинки. Белый круг – перестораздельное рассечение листовой пластинки.

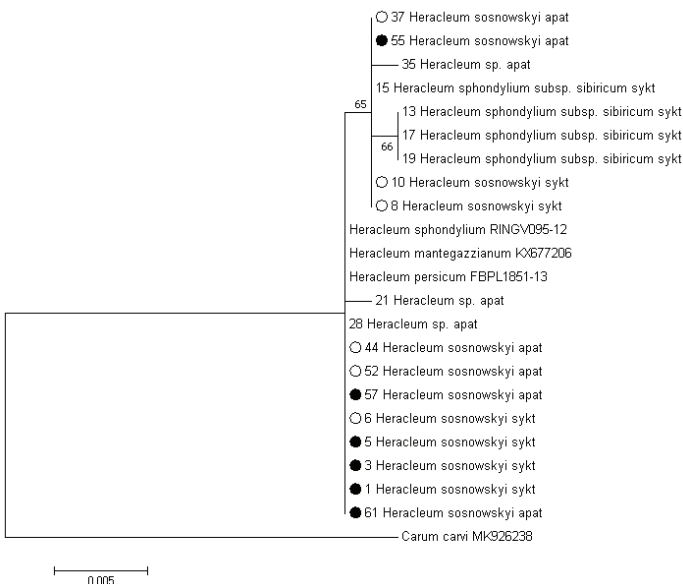


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения последовательностей гена *matK* хпДНК. Цифрами обозначены номера образцов полученных авторами. sykt – место сбора образцов г. Сыктывкар, apat – место сбора образцов г. Апатиты. Черный круг – перестолопастное рассечение листовой пластинки. Белый круг – перестораздельное рассечение листовой пластинки.

(ПЦР) фрагментов проводили в 25 мкл смеси, содержащей 5 мкл ScreenMix (Евроген, Россия), 5 мкл каждого праймера (0,3 мкМ) (Евроген, Россия), 9 мкл ddH₂O (Ambion, США) и 1 мкл ДНК-матрицы (1 ÷ 100 нг). Последовательности фрагментов генов *rbcL* и *matK* амплифицировали с использованием праймеров SI_For (5'-ATGT CACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'), SI_Rev (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3') и KIM 3F (5'-CGTACAGTACTTTTGTG TTTACGAG-3'), KIM 3R (5'-ACCCAGT CCATCTGGAAATCTTGGTTC-3') соответственно (Kress et al., 2009), фрагмента *trnH-psbA* амплифицированы с использованием праймеров trnH2 (5'-CGCGCATGGTGGATTACACAATCC-3')

psbAF (5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3') (Tate, Simpson, 2003), фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 с использованием праймеров ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') и ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATGTGATATGC-3') (Baldwin, 1995), фрагмента ETS с праймерами 18S-ETS (5'-ACTTACACATGCATG GCTTAATCT-3') и праймером Umb-ETS (5'-GCGCATGAGTGGTGAWTKGTA-3') (Logacheva et al. 2010). Термоциклирование включало предварительную денатурацию в течение пяти минут при температуре 95 °C и далее 35 циклов, включающие: денатурацию в течение 60 с при температуре 95 °C, отжиг праймеров в течение 30 с при температуре 50 °C (для *rbcL*) 55 °C (для ITS1-5.8S-ITS2), 60 °C (для *matK*, *trnH-psbA* и ETS) и элонгацию в течение 40 с при температуре 72 °C, с окончательной элонгацией в течение 5 минут при температуре 72 °C. Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование проводили с использованием оборудования ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с применением алгоритма ClustalW в программе MegaX (Thompson et al., 1994; Kumar et al., 2018). Филогенетические деревья строили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). При построении деревьев использованы нуклеотидные последовательности, полученные нами, а также данные других авторов, доступные в базах данных Genbank (NCBI, 2021) и BOLD Systems (BOLD Systems, 2021). В качестве внешней

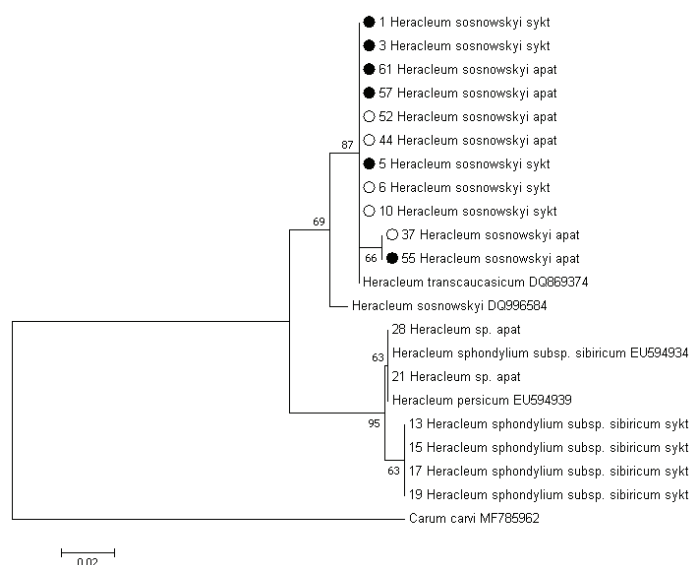


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения последовательностей межгенного спейсера *psbA-trnH* хпДНК. Цифрами обозначены номера образцов полученных авторами. *sykt* – место сбора образцов г. Сыктывкар, *apat* – место сбора образцов г. Апатиты. Черный круг – перестолопастное рассечение листовой пластинки. Белый круг – перестораздельное рассечение листовой пластинки.

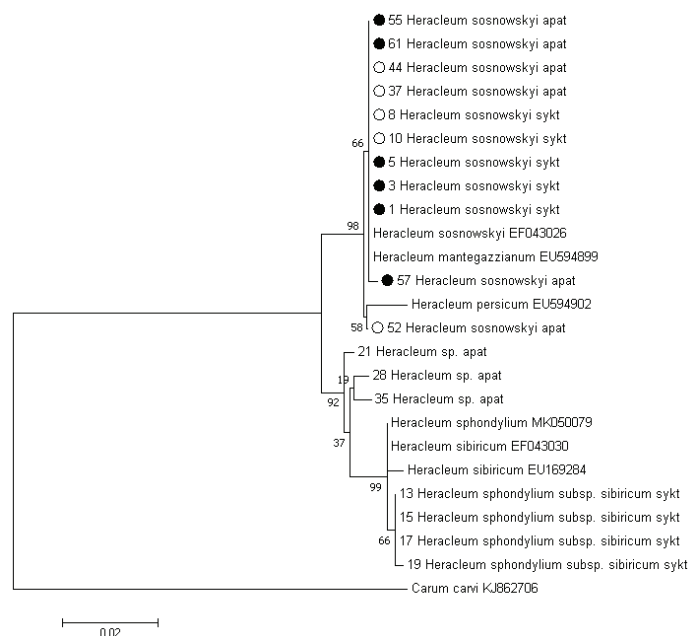


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения последовательностей ITS1-5.8-ITS2 ядДНК. Цифрами обозначены номера образцов полученных авторами. *sykt* – место сбора образцов г. Сыктывкар, *apat* – место сбора образцов г. Апатиты. Черный круг – перестолопастное рассечение листовой пластинки. Белый круг – перестораздельное рассечение листовой пластинки.

группы при реконструкции филогенетических деревьев использовали *Carum carvi* L.

Результаты. В базах генетических данных NCBI и BOLD Systems маркерные последовательности хлоропластных генов *rbcL* и *matK* имеются только для одного из двух интересующих нас видов, а именно для *H. mantegazzianum*. Проведенный анализ последовательностей генов *rbcL* и *matK* хлоропластной ДНК с включением впервые полученных нами данных для *H. sosnowskyi* и данных взятых из генетических баз для других видов рода *Heracleum*, включая *H. mantegazzianum* подтвердил отсутствие эволюционной изменчивости для последовательностей этих генов (рис. 1, 2). Таким образом, мы удостоверились, что данные маркеры являются неперспективными для разграничения *H. sosnowskyi* и *H. mantegazzianum*, т.е. нет дифференциации по данным последовательностям среди проанализированных видов рода *Heracleum*.

Анализ последовательностей области ядерного генома ITS1-5.8-ITS2 взятых из баз данных NCBI и BOLD Systems показал, что данные маркерные последовательности имеют небольшие различия для ряда видов внутри исследуемого рода, но для интересующих нас видов *H. sosnowskyi* и *H. mantegazzianum* являются абсолютно схожими и как следствие не могут применяться для их идентификации. Полученные нами последовательности ITS1-5.8-ITS2 были идентичны последовательностям *H. sosnowskyi* и единственной представленной последовательности *H. mantegazzianum* имеющихся в базах генетических данных (рис. 4). Это позволило нам удостовериться в непригодности данного маркера для разграничения интересующих нас видов.

Еще один маркер, который мы рассмотрели в качестве потенциального ДНК штрихкода, последовательность ETS (external transcribed spacer). В базах генетических данных из двух интересующих нас видов была представлена только одна последовательность для *H. mantegazzianum*, проанализировав ее с последовательностями близкородственных видов и полученными нами последовательностями мы обнаружили дискриминационную способность данного маркера по отношению к видам, включенным в анализ. Как видно на представленном филогенетическом древе, вид *H. mantegazzianum* не вошел в груп-

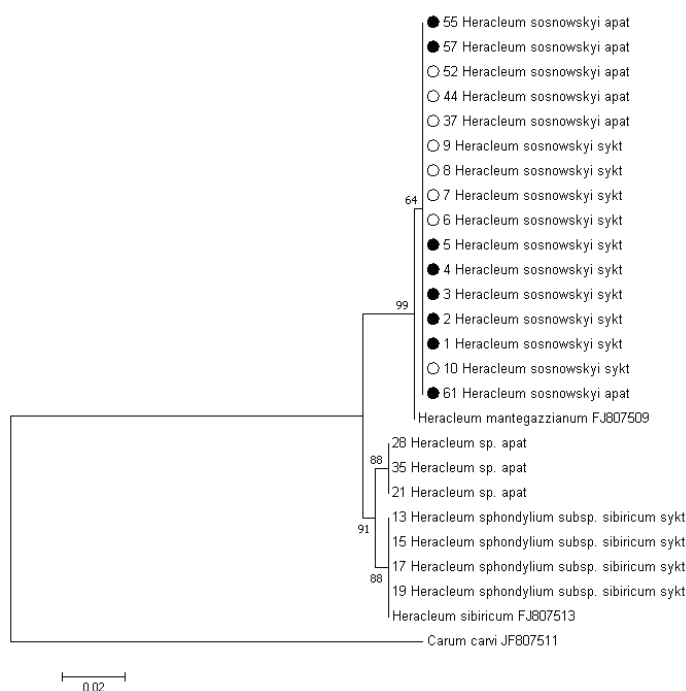


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения последовательностей ETS ядДНК. Цифрами обозначены номера образцов полученных авторами. sykt – место сбора образцов г. Сыктывкар, апат – место сбора образцов г. Апатиты. Черный круг – перестолопастное рассечение листовой пластинки. Белый круг – перестораздельное рассечение листовой пластинки.

пу *H. sosnowskyi* с разных частей ареала (Сыктывкар, Апатиты) и образовал отдельную ветвь (рис. 5). Для более детального анализа и определения внутривидового полиморфизма *H. mantegazzianum*, необходимо получить и вести в анализ последовательности для этого вида с разных частей ареала.

Заключение. Представленный выше анализ маркерных последовательностей позволил определить потенциальные ДНК маркеры для разграничения видов *H. sosnowskyi* и *H. mantegazzianum*, ими могут быть последовательности межгенного спейсера *psbA-trnN* хлДНК и последовательность ETS ядДНК. Также благодаря нашим исследования мы можем точно исключить для этих целей последовательности генов *rbcL* и *matK* хлДНК, а также последовательность ITS2 ядДНК. Для продолжения работы в данном направлении планируется включить в анализ большее количество образцов *H. mantegazzianum*, а также рассмотреть дискриминационную способность других молекулярных маркеров, которые в настоящее время представлены для небольшого числа видов рода *Heracleum*.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Национального научного фонда Болгарии № 20-54-18002.

The reported study was funded by RFBR and NSFB, project number № 20-54-18002.

ЛИТЕРАТУРА

- Кудинов М. А., Касач А. Е., Чекалинская И. И., Черник В. В., Чурилов А. К. Интродукция борщевиков в Белоруссии. – Минск: Наука и техника, 1980. – 200 с.
- Манденова И. П. Кавказские виды рода *Heracleum*. – Тбилиси: Изд-во Академии наук Грузинской ССР, 1950. – 103 с.
- Пименов М. Г., Остроумова Т. А. Зонтичные (Umbelliferae) России. – М.: Тов-во науч- изд- КМК, 2012. – 477 с.
- Скупченко Л. А. Семеноводство борщевика на Севере. – Л.: Наука, 1989. – 119 с.
- Шеховцов С. В., Шеховцова И. Н., Пельтек С. Е. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы // Усп. совр. биол., 2019. – Т. 139, № 3. – С. 211–220. DOI: 10.1134/S0042132419030074
- Шнеер В. С., Родионов А. В. ДНК-штрихкоды растений // Усп. совр. биол., 2018. – Т. 138, № 6. – С. 531–537. DOI: 10.7868/S0042132418060017
- Эбель А. Л., Зыкова Е. Ю., Михайлова С. Н., Черногригов П. Н., Эбель Т. В. Расселение и натурализация инвазивного вида *Heracleum sosnowskyi* Manden. (Ariaceae) в Сибири // Экология и география растений и растительных сообществ: материалы IV Междунар. науч. конф. (г. Екатеринбург, 16–19 апреля 2018 г.). – Екатеринбург: Гуманитарный ун-т, 2018. – С. 1065–1070.
- 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 // Annals of the Missouri Botanical Garden, 1995. – Vol. 82 (2). – P. 247–277. DOI: 10.2307/2399880
- Barcode of Life Data System V4. URL: <http://boldsystems.org/index.php/> (Accessed: 05.09.2021)
- Dalke I. V., Chadin I. F., Zakhozhiy I. G., Malyshev R. V., Maslova S. P., Tabalenkova G. N., Golovko T. K. Traits of *Heracleum sosnowskyi* plants in monostand on invaded area // PLoS ONE, 2015. – Vol. 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0142833

Global Biodiversity Information Facility. URL: <https://www.gbif.org/species> (Accessed: 05.09.2021).

Logacheva M. D., Valiejo-Roman C. M., Pimenov M. G. ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae–Tordylieae W. D. J. Koch, with notes on evolution of their *psbA-trnH* sequences // *Pl Syst Evol.*, 2007. DOI: 10.1007/s00606-007-0619-x

Kress W. J., Erickson D. L., Jones F. A. et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama // *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2009. – Vol. 106. – P. 18621–18626.

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(1). – P. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096

Logacheva M. D., Valiejo-Roman C. M., Degtjareva G. V., Stratton J. M., Downie S. R., Samigullin T. H., Pimenov M. G. A comparison of nrDNA ITS and ETS loci for phylogenetic inference in the Umbelliferae: An example from tribe Tordylieae // *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010. – Vol. 57. – P. 471–476.

National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (Accessed: 05.09.2021).

Pyšek P., Cock M. J. W., Nentwig W., Ravn H. P. Ecology and management of giant hogweed (*Heracleum mantegazzianum*). – CABI, Wallingford, UK; Cambridge, MA, 2007. – 324 pp.

Sortland A. B. The Genus *Heracleum* in Murmansk Oblast. A Preliminary Study // XII Московское совещание по филогении растений, посвященное 250-летию со дня рождения Георга-Франца Гофмана. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2010. – С. 88–91.

Tate J. A., Simpson B. B. Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species // *Systematic Botany*, 2003. – Vol. 28. P. 723–737. DOI: 10.1043/02-64.1

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Research*, 1994. – Vol. 22(22). – P. 4673–4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673