

Генетическая изменчивость популяций видов р. *Pulsatilla* (Ranunculaceae) на юге Приенисейской Сибири

Genetic variability of populations of *Pulsatilla* species (Ranunculaceae) in the south of Yenisei Siberia

Животов В. В.¹, Рябова К. К.^{1,2}, Ямских И. Е.¹, Степанов Н. В.¹, Куцев М. Г.^{1,3}

Zhivotov V. V.¹, Ryabova K. K.^{1,2}, Yamskikh I. E.¹, Stepanov N. V.¹, Kutsev M. G.^{1,3}

¹ Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия. E-mails: fobos.devil@mail.ru, iyamskikh@mail.ru, stepanov-nik@mail.ru

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», г. Красноярск, Россия. E-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru,

² Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Krasnoyarsk, Russia

³ Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: m_kucev@mail.ru

³ Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. Прострелы (*Pulsatilla*) – род эфемероидных трав, для которых свойственно высокое морфологическое разнообразие. В ходе исследования была проведена оценка генетического полиморфизма 9 популяций, представленных видами *P. orientali-sibirica* Stepanov, *P. turczaninonii* Krylov, их гибридом *P. herba-somnii* Stepanov, а также *P. multifida* G. Prizel. В результате амплификации геномной ДНК с 4 ISSR-праймерами получен 61 ампликон ДНК. Общий уровень полиморфизма – 98,36 %. Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьирует от 11 (17899А) до 17 (17899В, НВ12). Максимальный уровень генетической изменчивости отмечен для гибридной популяции *P. herba-somnii*. Коэффициент подразделенности изученных популяций (G_{st}) составляет 0,4718, что свидетельствует о высоком уровне их дифференциации. При построении дендрограммы выделяются 3 группы, каждая из которых представлена отдельным видом, при этом гибридная популяция объединяется с *P. orientali-sibirica*. При филогенетическом анализе изучаемых видов по хлоропластным маркерам (*rbcL*, *rpoB-trnC*, *atpB-rbcL*) происходит объединение *P. orientali-sibirica* с *P. multifida*, а *P. turczaninonii* с *P. herba-somnii*. При исследовании гибридов наиболее информативными являются ISSR, поскольку они равномерно распределены по геному и могут показать сходство с двумя родительскими организмами, тогда как хлоропласты наследуются, как правило, по материнской линии. Этим можно объяснить объединение гибрида с *P. turczaninonii* на филогенетических деревьях, построенных с использованием хлоропластных маркеров.

Ключевые слова. Анализ генетического полиморфизма популяций, филогенетический анализ, *atpB-rbcL*, ISSR-PCR маркеры, *Pulsatilla herba-somnii*, *Pulsatilla multifida*, *Pulsatilla orientali-sibirica*, *Pulsatilla turczaninonii*, *rbcL*, *rpoB-trnC*.

Summary. *Pulsatilla* is a genus of ephemeroïd grasses characterized by high morphological diversity. The study assessed the genetic polymorphism of 9 populations represented by the species *P. orientali-sibirica* Stepanov, *P. turczaninonii* Krylov and their hybrid *P. herba-somnii* Stepanov, and *P. multifida* G. Prizel. As a result of amplification of genomic DNA with 4 ISSR primers, 61 DNA amplicons were obtained. The overall level of polymorphism is 98.36 %. The number of amplified DNA fragments, depending on the primer, varies from 11 (17899A) to 17 (17899 B, HB12). The maximum level of genetic variability was noted for hybrid populations. The coefficient of genetic subdivision (G_{st}) of the studied populations is 0.4718, which indicates a high level of their differentiation. The dendrogram divides the studied populations into 3 groups, each of which is represented by a separate species, while the hybrid population is combined with *P. orientali-sibirica*. Phylogenetic analysis of the studied populations combines *P. orientali-sibirica* with *P. multifida* and *P. turczaninonii* with *P. herba-somnii*. These data demonstrate the intermediate position of the hybrid population of *P. herba-somnii*. In the study of hybrids, ISSRS are the most informative, since they are evenly distributed across the genome and can show similarities with two parent organisms, whereas chloroplasts are inherited, as a rule, through the maternal line.

Key words. Analysis of genetic polymorphism of populations, *atpB-rbcL*, ISSR-PCR markers, phylogenetic analysis, *Pulsatilla herba-somnii*, *Pulsatilla multifida*, *Pulsatilla orientali-sibirica*, *Pulsatilla turczaninonii*, *rbcL*, *rpoB-trnC*.

Pulsatilla Mill. – род растений семейства Ranunculaceae, включающий эфемероидные многолетние травы. Систематическое положение как видов рода *Pulsatilla*, так и собственно самой группы *Pulsatilla*, вызывает ряд дискуссий. Так, например, одни авторы рассматривают р. *Pulsatilla* как подрод или часть рода *Anemone* s. l. (Linnaeus, 1753; Hoot et al., 1994), а другие выделяют их в независимый род (Miller, 1754; Adanson, 1763; Wang et al., 2001). Также нет единого мнения по поводу внутривидовой таксономии р. *Pulsatilla*. Установлено, что виды прострелов, даже неродственные, сравнительно легко гибридизируют (Павлова, 1990; Цвелёв, 2001). В связи с этим появляется ещё большая неопределенность по видовому составу группы *Pulsatilla*. Так, например, как самостоятельный вид – *Pulsatilla herba-somnii* Stepanov – был выделен гибрид *P. orientali-sibirica* Stepanov и *P. turczaninonii* Krylov et Serg. Juz. (Степанов, 2014). Изучение генетического полиморфизма популяций видов позволило бы получить данные об их состоянии, характере родственных связей, на основании чего можно было бы судить о статусе изучаемых популяций.

Цель работы: изучение генетического полиморфизма популяций и филогении видов рода *Pulsatilla* в южной части Красноярского края и Хакасии.

Сбор материала проводился с мая по июнь в 2021–2022 гг. Объектом исследований явились 9 популяций прострелов, произрастающих в южной части Красноярского края и Хакасии. Генетический полиморфизм изучен на примере популяций видов *P. orientali-sibirica* (далее РО), *P. turczaninonii* (РТ) и их гибрида *P. herba-somnii* (РН), а также вида *P. multifida* (РМ). Популяции были собраны в г. Красноярске и его окрестностях (РО1, РО2, РО3, РТ1, РТ2 РТ3, РН1), в Новоселовском районе Красноярского края (РМ1) и в Хакасии (РМ2).

Образцами для генетического анализа служили выделенные ДНК 8–10 экземпляров из каждой популяции. Выделение ДНК проводилось модифицированным СТАВ-методом (Doyle, Doyle, 1987). В ISSR-анализе использовались праймеры, обладающие наибольшим полиморфизмом: ISSR09 (ATG)₆, 17899B ((CA)₆GG), 17899A ((CA)₆AG), HB12 ((CAC)₃GC).

Полученные данные анализировали с помощью программ TFPGA version 1.3 и Popgene version 1.32. Для оценки уровня генетического разнообразия были рассчитаны такие параметры как: процент полиморфизма (P), показатели внутривидового генетического разнообразия – генное разнообразие Нея (Ne), индекс Шеннона (Io) и генетические расстояния Нея (D). Дендрограмма сходства на основе ISSR анализа была построена невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA). Для оценки генетической структуры популяций был использован байесовский подход (MCMC: Марковская цепь Монте-Карло), реализованный в программном обеспечении STRUCTURE, версии 2.3.4. (Pritchard et al., 2000).

Для проведения филогенетического анализа были секвенированы ген большой субъединицы рибулезо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы (*rbcL*), межгенные спейсеры *rpoB-trnC* (между геном β -субъединицы РНК-полимеразы *rpoB* и геном, кодирующим тРНК-Cys) и *atpB-rbcL* (между геном β -субъединицы АТФ-синтазы и геном *rbcL*). Определение нуклеотидных последовательностей проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MD, USA) (г. Новосибирск). На основе данных секвенирования были построены филогенетические деревья с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML) и модели нуклеотидных замен Тамуры-Нея (TN93) (Tamura, Nei, 1993) в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) со значением параметра бутстрэпа 5000.

В ходе ISSR-анализа выявлен 61 фрагмент ДНК. Процент полиморфизма суммарно составляет 98,36 %. Число амплифицированных фрагментов ДНК в зависимости от праймера варьирует от 11 (17899A) до 17 (17899B, HB12). Генное разнообразие Нея (Ne) в суммарной выборке составляет 0,3508, индекс Шеннона (Io) – 0,5195. Уровень генетического разнообразия в популяциях варьирует от 37,70 % до 57,38 % и имеет максимальные показатели в популяции *P. herba-somnii* (РН) (P = 57,38 %; Ne = 0,2437; Io = 0,3506).

Коэффициент подразделенности популяций (G_{st}) составляет 0,4718. Следовательно, на долю межпопуляционного разнообразия приходится 47,18 %, а изученные популяции демонстрируют высокую степень дифференциации по классификации С. Райта (Wright, 1978). Значения генетических дистанций Нея (Nei, 1972), рассчитанные между гибридной РН и родительскими популяциями РТ3 и РО3 (окр. г. Красноярска), составляют 0,2086 и 0,2105 соответственно.

На дендрограмме сходства (рис. 1), выполненной в программе TFPGA, отмечается разделение на 3 группы: к первой относятся *P. orientali-sibirica* и *P. herba-somnii*, во вторую входят популяции вида

P. turczaninovii, последнюю образуют *P. multifida*. Похожая структура наблюдается при построении кластеров с использованием байесовского подхода, однако стоит отметить, что *P. herba-somnii* занимает промежуточное положение между родительскими видами (*P. orientali-sibirica* и *P. turczaninovii*). 88 генотипов разделяются максимально на 3 генетических кластера.

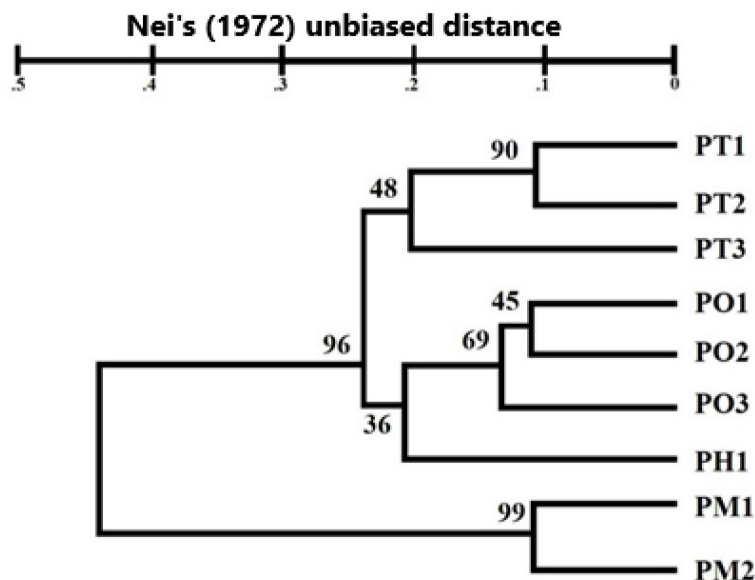


Рис. 1. Дендрограмма сходства популяций видов р. *Pulsatilla* на основе данных ISSR-анализа. Цифрами указан бутстрэп-индекс.

В результате секвенирования хлоропластного маркера – гена большой субъединицы рибулезо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы (*rbcL*), получена нуклеотидная последовательность длиной 679 пар оснований. В исследуемых нами образцах обнаружена 1 трансверсия, отличающая *P. turczaninovii* и *P. herba-somnii* от других видов. При построении филогенетического дерева наблюдается разделение на следующие группы (рис. 2).

Первую кладу образуют виды серии *Patens* (*P. multifida*, *P. orientali-sibirica*). Близкое положение к этой группе занимает вид *P. vernalis* (L.) Mill., произрастающий в Европе. Для данного вида известны гибриды с серией *Patens*. Следующую группу формируют виды *P. turczaninovii* и *P. herba-somnii*, встречающиеся в азиатской части России, а также дальневосточный *P. dahurica*. (Fisch. ex DC.) Spreng. Также близки к ним азиатские виды – *P. chinensis* (Bunge) Regel и *P. cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz.

Филогенетическое дерево, построенное на основе межгенного спейсера *rpoB-trnC*, напротив, объединяет большинство видов, обособляя *P. turczaninovii* и *P. herba-somnii*. В последовательности длиной 1140 пар оснований обнаружены 3 трансверсии в исследуемых нами видах, объединяющие PT и PH. Анализ участка хлоропластного спейсера *atpB-rbcL* также демонстрирует обособление клады из *P. turczaninovii* и гибрида *P. herba-somnii*. В последовательностях данных видов обнаружены 2 транзиции и пятинуклеотидная делеция.

Таким образом, в ходе изучения генетического полиморфизма 9 популяций прострелов, произрастающих в окрестностях г. Красноярска, Новоселовском районе и Республике Хакасия, было обнаружено достоверное разделение на отдельные виды. На филогенетических деревьях, построенных с использованием хлоропластных маркеров, наблюдается объединение *P. orientali-sibirica* и *P. multifida* в одну кладу, а *P. turczaninovii* и *P. herba-somnii* стабильно образуют другую группу. Популяция гибрида *P. herba-somnii* характеризуется высоким уровнем генетического полиморфизма, занимает промежуточное положение на дендрограмме сходства и четко идентифицируется с помощью ISSR маркеров. ISSR маркеры являются более информативными, поскольку они равномерно распределены по геному и могут показать сходство с двумя родительскими организмами, тогда как хлоропласты наследуются, как правило, по материнской линии. Этим можно объяснить объединение гибрида с *P. turczaninovii* на филогенетических деревьях, построенных с использованием хлоропластных маркеров.

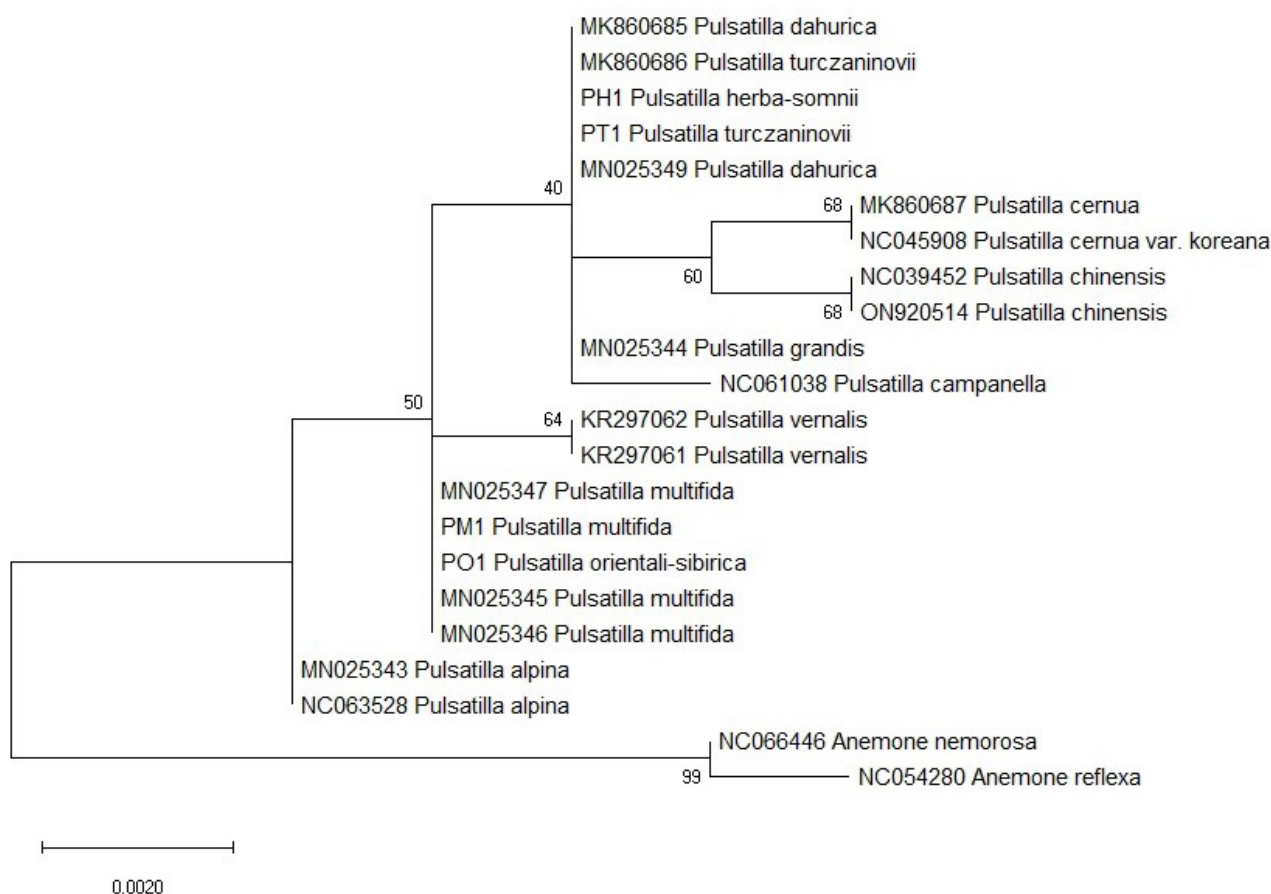


Рис. 2. Филогенетическое дерево видов р. *Pulsatilla*, построенное на основании сравнения последовательностей участка гена *rbcl* методом максимального правдоподобия (ML). Масштаб длины ветвей соответствует количеству замен на сайт. Цифрами обозначен бутстрэп-индекс.

ЛИТЕРАТУРА

- Павлова Т. А.** Прострел раскрытый (*Pulsatilla patens* (L.) Mill.) в природе и культуре: Препринт. – Новосибирск, 1990. – 78 с.
- Степанов Н. В.** Заметки о некоторых видах *Pulsatilla* L. (Ranunculaceae) из приенисейских Саян // Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова ТГУ. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2014. – № 109. – С. 6–19.
- Цвелёв Н. Н.** Триба 7. *Anemoneae* DC. // Флора Восточной Европы. – М.; СПб.: Мир и семья, 2001. – Т. 10. – С. 77–95.
- Adanson M.** Familles des plantes. – Vincent Paris, 1763. – P. 451–460.
- Doyle J. J., Doyle J. L.** A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue // Phytochemical Bulletin, 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
- Hoot S. B., Reznicek A. A., Palmer J. D.** Phylogenetic relationship in *Anemone* (Ranunculaceae) based on morphology and chloroplast DNA // Syst. Bot., 1994. – Vol. 19. – P. 169–200.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Molecular Biology and Evolution, 2018. – № 35. – P. 1547–1549.
- Linnaeus C. V.** Species plantarum. – Stockholm, 1753. – 1200 p.
- Miller P.** The gardeners dictionary // The Gardeners Dictionary ed. 4. – London, 1754. – Vol. 3. – P. 149.
- Nei M.** Genetic Distance between Populations // American Naturalist, 1972. – № 106. – P. 283–292.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P.** Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics, 2000. – № 155. – P. 945–959.
- Tamura K., Nei M.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution, 1993. – № 10. – P. 512–526.
- Wang W. C., Fu D. Z., Li L. Q., Bruce B., Anthony R. B., et al.** Flora of China // Beijing: Science Press. – St. Louis Mo.: Missouri Botanical Garden Press, 2001. – Vol. 6. – P. 133–438.
- Wright S.** Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations. – University of Chicago Press, 1978. – Vol. 4. – P. 590.