



УДК 582.657.2+574.3+575.22

## Генетический полиморфизм популяций и филогения среднесибирских спорышей секции *Polygonum* (*Polygonaceae*) с использованием ISSR и хлоропластных маркеров

И. Е. Ямских<sup>1,5\*</sup>, Н. Н. Тупицына<sup>2,6</sup>, К. К. Рябова<sup>1,3,7</sup>, М. Г. Куцев<sup>1,4,8</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, д. 79, г. Красноярск, 660041, Россия

<sup>2</sup> Красноярский государственный педагогический университет им. В. П. Астафьева, ул. Ады Лебедевой, д. 89, г. Красноярск, 660049, Россия

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», ул. Академгородок, д. 50, г. Красноярск, 660036, Россия

<sup>4</sup> Алтайский государственный университет, пр. Ленина, д. 61, г. Барнаул, 656049, Россия

<sup>5</sup> E-mail: iyamskikh@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1424-9547>

<sup>6</sup> E-mail: floranatalka@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2191-9740>

<sup>7</sup> E-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0008-0896-4249>

<sup>8</sup> E-mail: m\_kucev@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2284-6851>

\* Автор для переписки

**Ключевые слова:** генетическая структура, популяция, секция *Polygonum*, филогения, ISSR-PCR анализ, *matK*, *trnL-trnF*.

**Аннотация.** Статья посвящена исследованию генетического полиморфизма популяций и филогении видов секции *Polygonum* с использованием ISSR и хлоропластных маркеров. Спорыши представляют собой таксономически сложную группу. Идентификация особей осложняется мелкими размерами растений, процессами межвидовой гибридизации, гетерокарпией, фенологической и экологической пластичностью. В данной работе изучена генетическая изменчивость 6 популяций 5 видов спорышей, произрастающих в г. Красноярске. ISSR-анализом установлено, что уровень генетического разнообразия в популяциях варьирует от 4,17 % до 35,83 % и имеет максимальные показатели для генетически близких видов *P. sabulosum* ( $P = 35,83$  %) и *P. arenastrum* ( $P = 22,5–30$  %). Минимальные значения генетического разнообразия зафиксированы для популяций *P. aviculare* ( $P = 4,17$  %) и *P. calcatum* ( $P = 5$  %). Изученные популяции характеризуются очень высоким уровнем генетической дифференциации ( $G_{st} = 0,78$ ) и достоверно относятся к разным видам. На UPGMA-дендрограмме сходства особи данных видов формируют четко обособленные клады. Анализ генотипов особей в программе STRUCTURE также показывает достоверное разделение на 5 кластеров, соответствующих исследуемым видам. Филогенетический анализ с использованием *trnL-trnF* участка хлоропластной ДНК показывает наличие 5-нуклеотидной делеции и двух трансверсий, позволяющих разделить изучаемую группу спорышей на два кластера, морфологически отличающихся друг от друга. Первую группу формируют виды *P. arenastrum*, *P. calcatum*, *P. caspicum*, *P. sabulosum*, характеризующиеся отсутствием выраженного главного побега, постепенным уменьшением листьев к верхушкам побегов и расчленением околоцветника на 1/2 своей длины. Во вторую группу входят *P. aviculare*, *P. boreale*, *P. neglectum*, *P. rectum* с выраженным главным побегом, гетерофилией, расчленением околоцветника на 2/3–3/4 своей длины. В последовательностях гена *matK* выявлено 2 замены, он является менее информативным для решения вопросов таксономии изучаемой группы.

## Genetic polymorphism of populations and phylogeny of the Central Siberian *Polygonum* (Polygonaceae) section using ISSR and chloroplast markers

I. E. Yamskikh<sup>1\*</sup>, N. N. Tupitsyna<sup>2</sup>, K. K. Ryabova<sup>1,3</sup>, M. G. Kutsev<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Siberian Federal University, Svobodny Pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

<sup>2</sup> V. P. Astafyev Krasnoyarsk State Pedagogical University, Ady Lebedevoy St., 89, Krasnoyarsk, 660049, Russian Federation

<sup>3</sup> Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Akademgorodok St., 50, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

<sup>4</sup> Altai State University, Lenina Pr., 61, 656049, Barnaul, Russian Federation

\*Corresponding author

**Keywords:** genetic structure, ISSR-PCR analysis, *matK*, phylogeny, population, section *Polygonum*, *trnL-trnF*.

**Summary.** This article is devoted to the study of genetic polymorphism of populations and phylogeny of *Polygonum* section using ISSR and chloroplast markers. Section *Polygonum* is a taxonomically complex group. Identification of individuals is complicated because of the small size of plants, the processes of interspecific hybridization, heterocarpy, phenological and ecological plasticity. In this work, the genetic variability of six populations of five knotweed species growing in Krasnoyarsk was studied. ISSR analysis revealed that the level of genetic diversity in the populations varies from 4.17 % to 35.83 % and has maximum values for genetically close species *P. sabulosum* ( $P = 35.83\%$ ) and *P. arenastrum* ( $P = 22.5\text{--}30\%$ ). Minimum values of genetic diversity were observed for populations of *P. aviculare* ( $P = 4.17\%$ ) and *P. calcatum* ( $P = 5\%$ ). The studied populations are characterized by a very high level of genetic differentiation ( $G_{st} = 0.78$ ) and reliably belong to different species. On the similarity dendrogram (UPGMA), individuals of these species form clearly distinct clades. The genetic structure of populations using STRUCTURE also shows a reliable division of individuals into 5 clusters corresponding to the studied species. Phylogenetic analysis using the *trnL-trnF* chloroplast region shows the presence of a 5-nucleotide deletion and two transversions that makes it possible to divide the studied group of *Polygonum* into two morphologically different clusters. The first group is formed by *P. arenastrum*, *P. calcatum*, *P. caspicum*, *P. sabulosum* and characterized by the absence of a main shoot, a gradual reduction of leaves to the top of shoots and the perianth dissection by 1/2 of its length. The second group includes *P. aviculare*, *P. boreale*, *P. neglectum*, *P. rectum* that have a main shoot, heterophilly, perianth dissection by 2/3–3/4 of its length. Two substitutions have been identified in the *matK* sequences, however it is less informative for solving taxonomic issues of the studied group.

### Введение

Виды рода Спорыш – *Polygonum* L. – широко распространенные растения. Род характеризуется рядом биологических особенностей, которые способствуют чрезвычайной вариабельности признаков и формированию большого количества видов и форм спорышей. Это высокая фенотипическая пластичность признаков, обусловленная различными условиями обитания в пределах обширных ареалов видов, приводящая к формированию рас, обладающих морфологическим своеобразием (Yurtseva, Kramina, 2003); самоопыление, когда даже мелкие уклонения признаков иногда оказываются наследственно устойчивыми (Voroshilov, 1954; Yurtseva, 1998); межвидовая гибридизация, которая осуществляется между видами не только одной, но и разных подсекций благодаря возможности редкой ксеногамии при хазмогамии и частичной

протандрии (Voroshilov, 1954; Scholz, 1958; Styles, 1962; Yurtseva, 1998), чему способствует совпадающий у многих видов длительный период цветения. Благодаря этому спорыши достигли чрезвычайного полиморфизма и статуса сложной в таксономическом отношении группы. Трудностям в определении способствует и присущая р. *Polygonum* гетерокарпия (Yanishevskiy, 1927; Nikitina, 1965; Yurtseva et al., 1999).

Род *Polygonum* L. s. str. на территории Сибири представлен видами, относящимися по классификации И. Г. Серебрякова (Serebryakov, 1962, 1964) к монокарпическим травам с ассимилирующими побегами несуккулентного типа, не нуждающимися в опоре – однолетними травянистыми монокарпиками. Все сибирские виды рода относятся к секции *Polygonum = Avicularia* Meissn. (Meissner, 1826), типовой секции. Секция насчитывает около 50 видов (Yurtseva et al., 2010). Полиморфизм видов, вызванный процессами

гибридизации и самоопылением, способствующим стабилизации гибридов, а также мелкие размеры растений, «скрывающие» диагностические признаки, приводят к затруднениям в определении видов. В данном случае на помощь методам классической систематики, основанной на анализе морфологических признаков, могут прийти методы молекулярно-генетического анализа. О значительной степени генетической обособленности видов спорышей может свидетельствовать их высокое видовое разнообразие на ограниченной территории. В качестве такой территории нами был выбран г. Красноярск.

Цель настоящей работы состояла в изучении генетического полиморфизма популяций и филогении видов секции *Polygonum* с использованием ISSR и хлоропластных маркеров.

## Материалы и методы

Объектами исследования служили популяции спорышей, произрастающие в г. Красноярске: две популяции *Polygonum arenastrum* Boreau (PAR 1–PAR 2), по одной популяции *P. aviculare* L. (PA), *P. calcatum* Lindm. (PC), *P. sabulosum* Vorosch. (PS), *P. caspicum* Kom. (PCS). В каждой популяции было отобрано по 9–10 особей. Для сравнения использовался образец *P. evenkiense* Tupitz. et Juzefovich, собранный в 45 км от пос. Ванавара (Эвенкийский р-н Красноярского края). Для филогенетических исследований дополнительно использовались образцы *P. boreale* (Lange) Small, *P. neglectum* Besser, *P. rectum* (Chrtek) Scholz (табл. 1).

Таблица 1

Исследованные популяции и особи видов секции *Polygonum* и номера секвенированных последовательностей ДНК в базе данных GenBank

Название таксона	Местонахождение	Координаты	<i>matK</i>	<i>trnL-trnF</i>
<i>Polygonum arenastrum</i> (PAR1)	г. Красноярск, Красной Армии, 15	56°00'47.8" с. ш. 92°50'48.5" в. д.	OR463362	OR463368
<i>Polygonum arenastrum</i> (PAR2)	г. Красноярск, ул. Горького, 14	56°01'28.4" с. ш. 92°84'85.5" в. д.	–	–
<i>Polygonum aviculare</i> (PA)	г. Красноярск, Академгородок, 25	55°59'45.6" с. ш. 92°45'55.9" в. д.	OR463363	OR463369
<i>Polygonum calcatum</i> (PC)	г. Красноярск, ул. Дорожная, 6Б	56°01'38.5" с. ш. 92°49'42.7" в. д.	OR463364	OR463370
<i>Polygonum sabulosum</i> (PS)	г. Красноярск, ул. Дорожная, 6Б	56°01'38.5" с. ш. 92°49'42.7" в. д.	OR463365	OR463371
<i>Polygonum caspicum</i> (PCS)	г. Красноярск, ул. Декабристов, 36	56°01'27.5" с. ш. 92°84'63.6" в. д.	OR463367	OR463373
<i>Polygonum neglectum</i>	г. Красноярск, ул. Куйбышева, 85	56°01'12.7" с. ш. 92°49'40.4" в. д.	–	OR463374
<i>Polygonum boreale</i>	г. Красноярск, Академгородок, 25	55°59'45.6" с. ш. 92°45'55.9" в. д.	–	OR463375
<i>Polygonum rectum</i>	г. Красноярск, ул. Куйбышева, 85	56°01'12.7" с. ш. 92°49'40.4" в. д.	–	OR463376
<i>Polygonum evenkiense</i> (PE)	Красноярский край, Эвенкийский р-н, 45 км от пос. Ванавара, 40 м восточнее скважины № 8 Пайгинского НГМ	60°13'01.9" с. ш. 102°53'06.1" в. д.	OR463366	OR463372

Исследования проводились в лаборатории молекулярно-генетических методов и биотехнологии ИФБиТ СФУ. Экстракцию тотальной ДНК производили из 10 мг сухой растительной ткани с помощью коммерческого набора DiamondDNA (ООО «Научно-производственная фирма «Алтайбиотех», Барнаул). Для изучения генетической изменчивости популяций использовался ISSR-PCR (Inter Simple Sequence

Repeats) метод. Для анализа было отобрано 7 праймеров (Mansour et al., 2009; Paterson et al., 2009), обладающих высоким уровнем полиморфизма и дающих воспроизводимый результат (табл. 2).

Аmplификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, включающей: 10 мкл готовой PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 6 мкл воды, 2 мкл ДНК и 2 мкл праймера. Программа

Таблица 2

## Характеристика праймеров, использованных для ISSR-PCR анализа

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Общее количество амплифицированных фрагментов ДНК	Количество полиморфных локусов	Процент полиморфных локусов
17898A	(CA) <sub>6</sub> AC	16	13	81,25
17898B	(CA) <sub>6</sub> GT	11	10	91
HB10	(GA) <sub>6</sub> CC	11	9	81,8
HB11	(GT) <sub>6</sub> CC	18	18	100
HB12	(CAC) <sub>3</sub> GC	14	12	85,7
HB14	(CTC) <sub>3</sub> GC	14	14	100
ISSR-23	(AC) <sub>8</sub> TA	15	13	86,6

амплификации: 95 °C (5 мин); 13 циклов: 95 °C (20 с), 55 °C (45 с, понижение температуры на 0,7 °C в каждом последующем цикле), 72 °C (90 с); 25 циклов: 95 °C (20 с), 44 °C (30 с), 72 °C (90 с); 72 °C (7 мин). Разделение продуктов амплификации производили в 1,8%-м агарозном геле, в горизонтальной электрофорезной камере в ТАЕ-буфере при 90V с применением бромистого этидия. Визуализацию продуктов амплификации проводили в проходящем УФ-излучении с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали ДНК-маркеры (ООО «Биолабмикс», Новосибирск).

Электрофореграммы анализировали с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Popgene version 1.32 (расчет уровня полиморфизма (P), генного разнообразия Нея (H<sub>e</sub>), индекса Шеннона (I<sub>o</sub>), генетических дистанций Нея (D), показателя подразделенности популяций (G<sub>st</sub>)). Дендрограмма сходства популяций строилась при помощи компьютерной программы TFPGA version 1.3 невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA – unweighted pair-group method using arithmetic average).

Для оценки генетической структуры популяций на основе данных ISSR-PCR анализа был использован байесовский подход (MCMC: Марковская цепь Монте-Карло), реализованный в программном обеспечении STRUCTURE версии 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Использовалось длительное выгорание (Burn-In) – 40000 циклов и MCMC – 120000 циклов. Количество возможных кластеров (K) тестировалось от 2 до 12 в двенад-

цати повторностях. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью ΔK (Evanno et al., 2005), вычисления которого доступны на софте STRUCTURE HarvesterWeb 0.6.94 (Earl, von Holdt, 2012).

Для определения филогенетических отношений между исследуемыми образцами секвенировали хлоропластные участки ДНК: *matK* (ген белка Maturase K) с использованием пары праймеров 1R\_KIM и 3F\_KIM (Costion et al., 2011) и межгенный спейсер *trnL-trnF* (между генами транспортных РНК, переносщими лейцин и фенилаланин) с использованием пары праймеров (e / f) (Taberlet et al., 1991). Амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси: 25 мкл ddH<sub>2</sub>O, 21 мкл ПЦР-смесь (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 2 мкл ДНК, 1 мкл каждого праймера (10мМ) по следующей программе: 95 °C (3 мин); 35 циклов: 95 °C (20 с), 59 °C (30 с), 72 °C (30 с); 75 °C (5 мин). Определение нуклеотидных последовательностей проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MD, USA) (г. Новосибирск). Полученные последовательности ДНК депонировали в базе данных «GenBank» (см. табл. 1). На основе данных секвенирования были построены филогенетические деревья с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML) и модели нуклеотидных замен Тамуры–Нея (TN93) (Tamura, 1993) в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) со значением параметра бутстрэпа 5000.

Помимо секвенированных последовательностей для построения филогенетических деревьев в банке NCBI было отобрано 16 последовательностей близкородственных видов р. *Polygonum*. В качестве аутгруппы была выбрана гречишка многоцветковая *Fallopia multiflora* (Thunb.) K. Haraldson. При поиске мутаций их положение

определялось при выравнивании секвенированных нами образцов на соответствующую последовательность MZ748474 *Polygonum aviculare* из базы данных GenBank.

### Результаты исследований

#### ISSR-PCR анализ

В ходе ISSR-PCR анализа с использованием 7 праймеров выявлено 99 фрагментов ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 90 % (табл. 3). Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьировало от 11 (HB10, 17898B) до 18 (HB11).

Генное разнообразие Нея ( $H_e$ ) в суммарной выборке составляет 0,22, индекс Шеннона ( $I_o$ ) – 0,34. Уровень генетического разнообразия в популяциях варьирует от 4,17 % до 35,83 % и имеет максимальные показатели в популяции *P. sabulosum* (PS1) ( $P = 35,83\%$ ;  $H_e = 0,12$ ;  $I_o = 0,18$ ). Также высокий уровень полиморфизма отмечен для двух популяций *P. arenastrum* (PAR1 – PAR2) ( $P = 22,5–30\%$ ;  $H_e = 0,06–0,12$ ;  $I_o = 0,10–0,18$ ). Минимальные значения генетического разнообразия зафиксированы для популяций *P. aviculare* (PA1) ( $P = 4,17\%$ ;  $H_e = 0,01$ ;  $I_o = 0,02$ ) и *P. calcatum* ( $P = 5\%$ ,  $H_e = 0,01$ ;  $I_o = 0,02$ ) (табл. 3).

Таблица 3

Показатели внутривидового генетического разнообразия видов секции *Polygonum*

Показатели	PAR1	PAR2	PA	PC	PS	PCS	Все популяции
P, %	22,5	30	4,17	5	35,83	25	90
$H_e \pm SD$	$0,06 \pm 0,12$	$0,12 \pm 0,19$	$0,01 \pm 0,07$	$0,01 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,18$	$0,02 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,19$
$I_o \pm SD$	$0,10 \pm 0,19$	$0,18 \pm 0,28$	$0,02 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,11$	$0,18 \pm 0,26$	$0,03 \pm 0,12$	$0,34 \pm 0,27$

Примеч.: P – процент полиморфных локусов;  $H_e$  – генное разнообразие Нея;  $I_o$  – индекс Шеннона; SD – стандартные отклонения.

На следующем этапе был проведен анализ генетических различий между исследуемыми популяциями близкородственных видов спорышей (табл. 4). Для этого использовались показатель генетических дистанций М. Нея (Nei, 1972) (D) и коэффициент подразделенности популяций ( $G_{st}$ ).

Выявлено, что генетические дистанции Нея максимальны между популяциями *P. aviculare* и *P. caspicum* ( $D = 0,37$ ), а также между *P. caspicum* и *P. calcatum* ( $D = 0,34$ ). Генетически близки друг другу популяции *P. arenastrum* (PAR1 и PAR2) и *P. sabulosum* (PS) ( $D = 0,09–0,11$ ).

Таблица 4

Степень генетической дифференциации ( $G_{st}$ ) (над диагональю) и дистанции Нея (под диагональю) между видами секции *Polygonum* на основе ISSR-PCR анализа

Pop	PAR1	PAR2	PA	PC	PS	PCS
PAR1	****	0,25	0,61	0,57	0,28	0,55
PAR2	0,05	****	0,64	0,57	0,31	0,57
PA	0,28	0,26	****	0,90	0,62	0,81
PC	0,21	0,21	0,30	****	0,58	0,79
PS	0,09	0,11	0,26	0,22	****	0,51
PCS	0,25	0,27	0,37	0,34	0,23	****

Анализ значений коэффициентов подразделенности популяций ( $G_{st}$ ) (табл. 4) при их попарном сравнении показал высокую степень генетической дифференциации спорышей. Значения  $G_{st}$  варьируют от 0,28 до 0,9. Видовое сходство демонстрируют только популяции *P. arenastrum* (PAR1) и *P. sabulosum* (PS) ( $G_{st} = 0,28$ ). Общий показатель подразделенности популяций ( $G_{st}$ ) для всей выборки составил 0,7675. Это говорит

о том, что на долю межпопуляционного разнообразия приходится 76,75 %, а изученные популяции показывают очень высокую степень дифференциации и достоверно разделяются на разные виды.

Дендрограмма сходства популяций, построенная на основе данных ISSR-PCR анализа, представлена на рисунке 1. Минимальные генетические расстояния характерны для двух попу-

ляций одного вида *P. arenastrum* (PAR1 и PAR2). Близи к ним популяции *P. sabulosum* (PS) и *P. calcatum* (PC). Обособленным от других является *P. caspicum*. Высокие значения бутстрепа (82–97 %) позволяют нам сделать выводы о четких генетических отличиях изученных видов.

При построении дерева по отдельным представителям наблюдается аналогичная картина (рис. 2). Особи разных видов формируют четко обособленные группы. Генетическая близость также характерна для *P. arenastrum* и *P. sabulosum*. Минимальные генетические дистанции наблюдаются между особями внутри популяций *P. calcatum*, *P. caspicum*, *P. aviculare*. Высокий уровень полиморфизма отмечен для *P. sabulosum* и *P. arenastrum*, что, возможно, связано с их гибридогенным происхождением.

Анализ структуры распределения генотипов особей в программе STRUCTURE показывает, что исследуемые образцы достоверно можно разделить на 5 кластеров ( $K = 5$ ,  $\Delta K = 60,81$ ). На гистограммах вероятностей (рис. 3) при разделении популяций на 5 кластеров все изучаемые виды четко отделяются друг от друга. Можно отметить возможное гибридогенное происхождение 51 образца, представленного видом *P. evenkiense*. Аналогичное положение наблюдается и у 52 образца *P. caspicum*.

### Филогенетический анализ

Для построения филогенетических деревьев, помимо исследуемых видов, были дополнительно использованы собранные нами образцы видов *P. boreale*, *P. neglectum*, *P. rectum*. Филогения строилась по молекулярным маркерам *matK*, *trnL-trnL*.

При обработке последовательностей наших образцов по участку *matK* длиной 699 п. н. было выявлено только две нуклеотидных замены. У видов *P. aviculare* и *P. evenkiense* обнаружена замена тимина на цитозин в положении 918. *Polygonum evenkiense* также отличается от других видов, в том числе загруженных из NCBI, по транзиции цитозина на тимин в положении 698 относительно начала гена. Вследствие этого *P. evenkiense* занимает обособленное положение на филогенетическом дереве.

Межгенные спейсеры обладают большей информативностью, поскольку могут накапливать большее количество мутаций, при этом не влияя на работоспособность генов. Так, уже во время выравнивания последовательностей участка *trnL-trnF* длиной 346 п. н. в MEGA-X, выявились SNP у *P. arenastrum*, *P. sabulosum*, *P. calcatum*, *P. caspicum* в виде двух трансверсий (A > C и G > T), также наблюдалась делеция в 5 п. н. (табл. 5).

Таблица 5

Вариабельность последовательностей ДНК межгенного спейсера *trnL-trnF* у различных видов р. *Polygonum*

Положение замены	63	103	166	167	168	169	170	214	228	244	252	303
OR463368 <i>Polygonum arenastrum</i> *	G	C	-	-	-	-	-	C	A	G	T	T
OR463369 <i>Polygonum aviculare</i> *	G	A	T	T	T	G	A	C	A	T	T	T
OR463375 <i>Polygonum boreale</i> *	G	A	T	T	T	G	A	C	A	T	T	T
OR463370 <i>Polygonum calcatum</i> *	G	C	-	-	-	-	-	C	A	G	T	T
OR463373 <i>Polygonum caspicum</i> *	G	C	-	-	-	-	-	C	A	G	T	T
OR463371 <i>Polygonum sabulosum</i> *	G	C	-	-	-	-	-	C	A	G	T	T
OR463376 <i>Polygonum rectum</i> *	G	A	T	T	T	G	A	C	A	T	T	T
OR463374 <i>Polygonum neglectum</i> *	G	A	T	T	T	G	A	C	A	T	T	T
OR463372 <i>Polygonum evenkiensis</i> *	G	A	T	T	T	G	A	C	A	T	T	T
NC063678 <i>Polygonum plebeium</i>	G	A	T	T	T	G	A	T	A	T	T	C
KR537745 <i>Polygonum ramosissimum</i>	G	C	-	-	-	-	-	C	A	G	C	T
KR537730 <i>Polygonum equisetiforme</i>	A	C	T	T	T	G	A	C	A	G	T	T
KR537759 <i>Polygonum arenastrum</i>	G	C	-	-	-	-	-	C	A	G	T	T
KU508749 <i>Polygonum arenarium</i>	G	C	T	T	T	G	A	C	G	G	T	T
KU508750 <i>Polygonum boreale</i>	G	A	T	T	T	G	A	C	A	T	T	T
MZ748474 <i>Polygonum aviculare</i>	G	A	T	T	T	G	A	T	A	T	T	C

Примеч.: \* отмечены секвенированные нами последовательности.

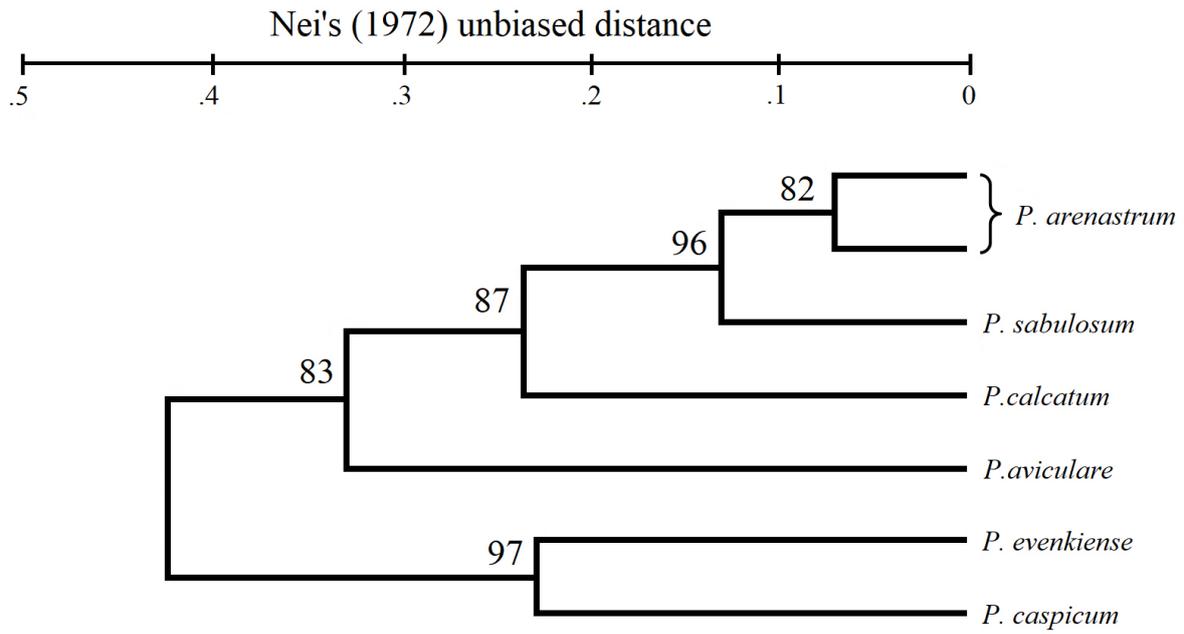


Рис. 1. UPGMA-дендрограмма сходства популяций видов секции *Polygonum* на основе данных ISSR-PCR анализа. Генетическое расстояние рассчитано по формуле Нея (Nei, 1972). Цифрами обозначены значения бутстрэпа.

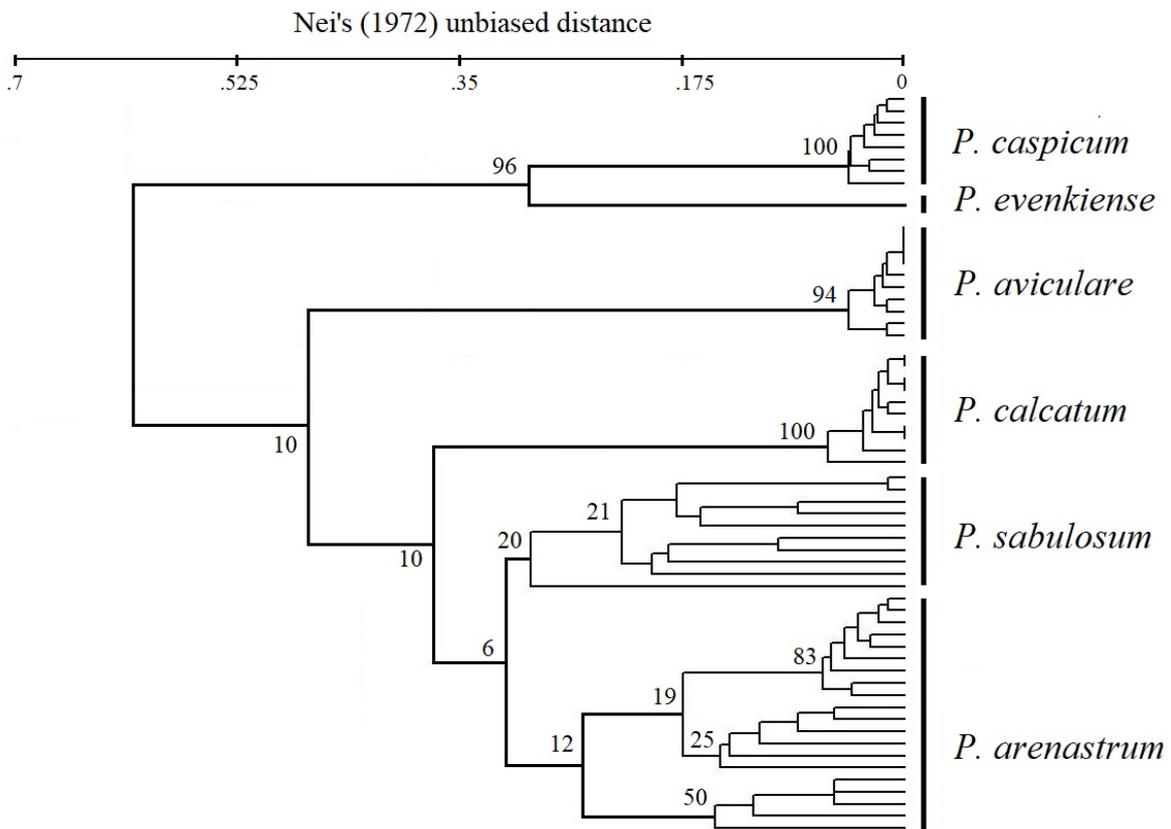


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма сходства особей видов секции *Polygonum* из различных популяций на основе данных ISSR-PCR анализа. Цифрами обозначены значения бутстрэпа.

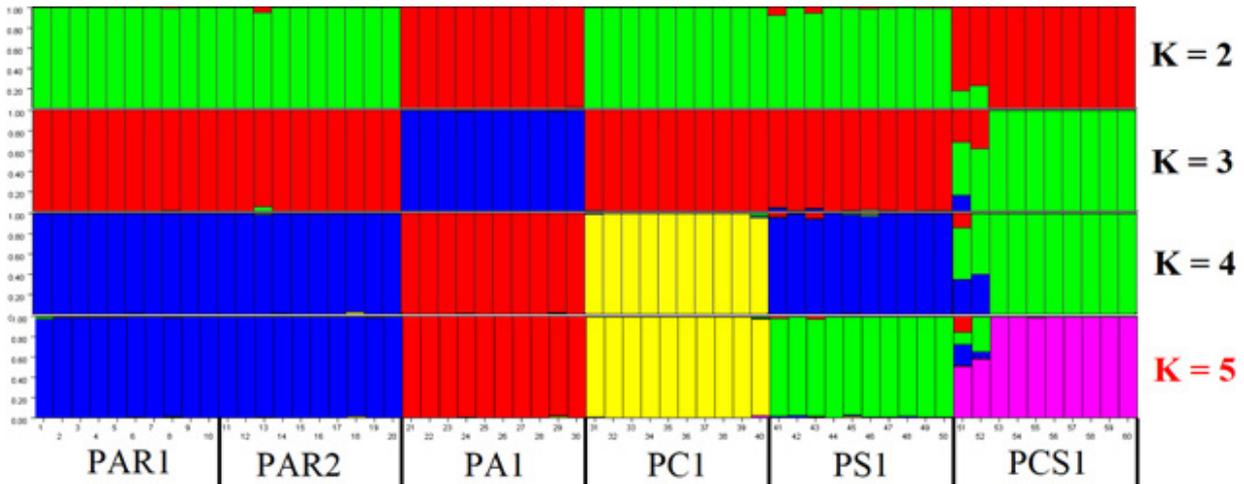


Рис. 3. Структура распределения генотипов спорышей по генетическим кластерам (апостериорная вероятность). По оси X – номера образцов и обозначения популяций, по оси Y – доля частот соответствующего кластера.

Примечательно, что подобное явление наблюдалось и у некоторых видов *Polygonum*, загруженных с платформы NCBI. В дальнейшем при построении филогенетического дерева по

участку *trnL-trnF* за счет обнаруженных полиморфизмов исследуемые виды разделились на 2 кластера (рис. 4).

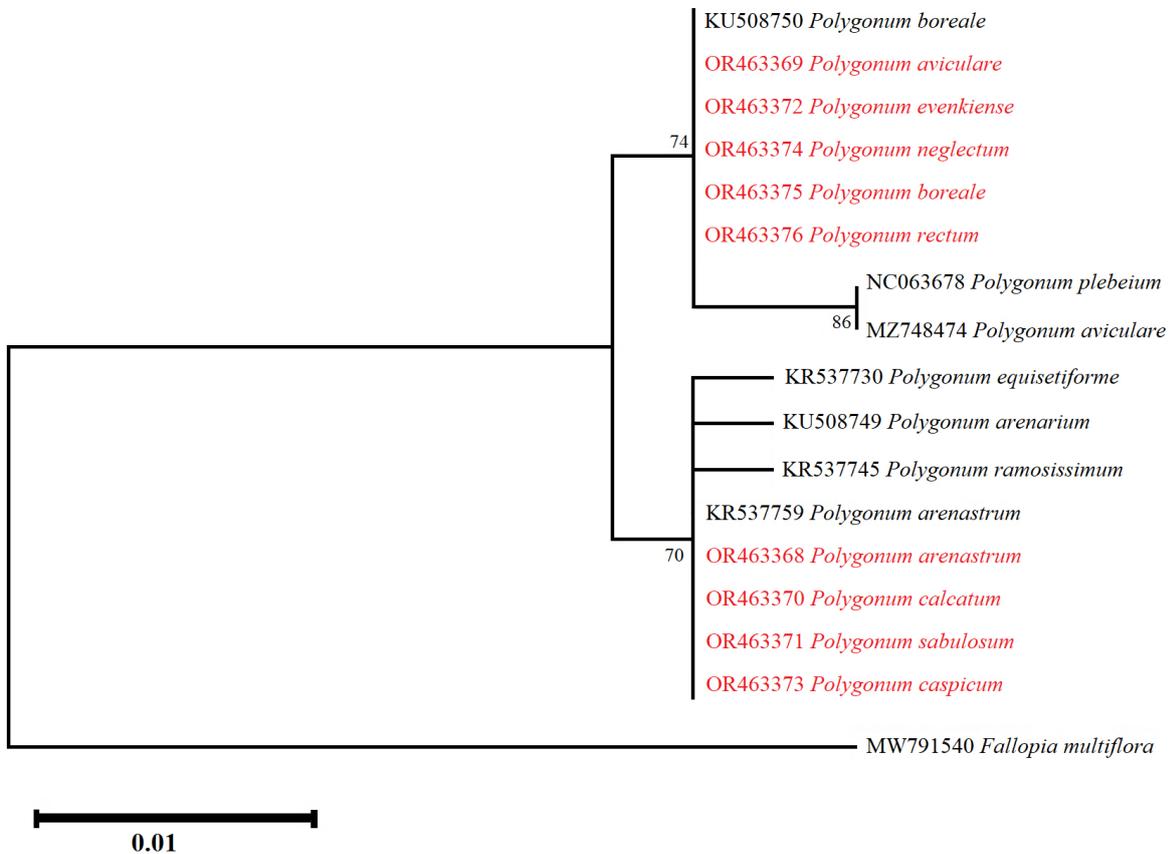


Рис. 4. Филогенетическое дерево видов р. *Polygonum*, построенное на основании сравнения последовательностей межгенного спейсера *trnL-trnF* хлоропластной ДНК методом максимального правдоподобия (ML). Цифрами обозначены значения бутстрэпа, красным цветом – секвенированные нами последовательности.

На полученном филогенетическом дереве по участку *trnL-trnF* в первую кладу вошли ранее определяемые как наиболее генетически близкие виды *P. arenastrum*, *P. sabulosum* и *P. calcatum*, а также *P. caspicum*. Во вторую кладу входят *P. aviculare*, *P. neglectum*, *P. boreale*, *P. rectum*, а также наиболее обособленный вид *P. evenkiense*. Следует отметить, что виды, входящие в полученные клады, имеют четкие морфологические отличия. Взятые из банка NCBI последовательности других видов спорышей адекватно вписываются в построенное филогенетическое дерево.

### Обсуждение результатов

Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа с использованием ISSR, *matK*, *trnL-trnF* маркеров видов секции *Polygonum* показали, что независимо от географической близости произрастания и сходных местообитаний, изученные популяции имеют очень высокую степень дифференциации и достоверно относятся к разным видам.

ISSR-PCR анализом установлено, что к популяциям *P. arenastrum* близка популяция *P. sabulosum*. Об этом свидетельствуют низкие значения генетических дистанций Нея ( $D = 0,09-0,11$ ) и коэффициента подразделенности популяций ( $G_{st} = 0,28-0,31$ ). На дендрограмме сходства также обнаруживается близкое родство данных видов. О. В. Юрцева с соавторами (Yurtseva et al., 2006), отмечает, что *P. arenastrum* является гибридом *P. calcatum* и *P. aviculare*. Важно отметить, что *P. calcatum* и *P. aviculare* обладают наименьшим генетическим полиморфизмом, тогда как *P. arenastrum* и *P. sabulosum*, напротив, имеют высокие показатели изменчивости, что может свидетельствовать об их гибридогенном происхождении и обилии переходных форм. Причем из двух возможных родительских видов, приведенных в работе О. В. Юрцевой с соавторами (Yurtseva et al., 2006), к *P. sabulosum* и *P. arenastrum* наиболее близок *P. calcatum*.

Полученные в ходе ISSR-PCR анализа данные подтверждаются и филогенетическим анализом. Наиболее информативным маркером оказался межгенный спейсер *trnL-trnF*. На филогенетическом дереве также отмечается близкое расположение видов *P. sabulosum*, *P. arenastrum* и *P. calcatum*, тогда как *P. aviculare* относится к другой кладе.

Филогенетический анализ показал, что рассмотренные представители секции *Polygonum*

разделяются на две клады, что подтверждает и морфологическая дифференциация указанных видов по признакам выраженности или отсутствия главного (прямостоячего, приподнимающегося, стелющегося) побега, наличия или отсутствия гетерофиллии и по степени расчленения околоцветника. В первую группу входят виды *P. arenastrum*, *P. calcatum*, *P. caspicum*, *P. sabulosum*. Для них характерны следующие признаки: главный побег не выражен, листья постепенно уменьшаются к верхушке побегов, околоцветник расчленен на 1/2 своей длины. Вторую группу формируют *P. aviculare*, *P. boreale*, *P. neglectum*, *P. rectum*, характеризующиеся выраженным главным побегом, гетерофиллией, расчленением околоцветника на 2/3–3/4 своей длины. Каждая группа включает исходные таксоны, обладающие таксономическим своеобразием, устойчивыми, константными признаками (Meerts et al., 1990; Yurtseva, Kramina, 2003), остальные виды (*P. arenastrum*, *P. sabulosum*) имеют признаки, свидетельствующие о гибридогенном происхождении.

*Polygonum evenkiense* (исследован один экземпляр) характеризуется толстоватыми, узколанцетными листовыми пластинками снизу с незаметными или едва заметными боковыми жилками, раструбами с 4–6 жилками, яйцевидным околоцветником, слабо блестящим плодом. Данное исследование предполагает гибридогенную природу *P. evenkiense*. По данным ISSR анализа, вид содержит блоки генов *P. aviculare* (явная гетерофиллия и крупный околоцветник, расчлененный на 2/3), *P. sabulosum* (листья узкие), *P. capsicum* и *P. arenastrum* (нет сходных морфологических признаков). По данным филогенетического анализа, *P. evenkiense* близок к *P. aviculare*. Для подтверждения гибридогенной природы этого вида потребуются дальнейшие популяционные и филогенетические исследования.

### Заключение

Проведенный ISSR-PCR анализ показал, что уровень генетического разнообразия в популяциях спорышей варьирует от 4,17 % до 35,83 % и имеет максимальные показатели для *P. sabulosum* ( $P = 35,83$  %;  $H_e = 0,12$ ;  $I_o = 0,18$ ). Минимальные значения генетического разнообразия зафиксированы для популяции *P. aviculare* ( $P = 4,17$  %;  $H_e = 0,01$ ;  $I_o = 0,02$ ). Изученные популяции характеризуются очень высоким уровнем генетиче-

ской дифференциации ( $G_{st} = 0,7675$ ) и достоверно относятся к разным видам.

Анализ степени генетической дифференциации популяций близкородственных видов р. *Polygonum* на данном этапе исследований показал разделение на следующие виды: *P. arenastrum*, *P. aviculare*, *P. calcatum*, *P. caspicum*. Популяция *P. sabulosum* генетически близка к виду *P. arenastrum*.

Филогенетический анализ с использованием *trnL-trnF* маркера хлоропластной ДНК показал наличие 5-нуклеотидной делеции и двух трансверсий, позволяющих разделить изучаемую группу спорышей на два кластера. Первую группу формируют виды *P. arenastrum*, *P. calcatum*, *P. caspicum*, *P. sabulosum*, характеризующиеся отсутствием выраженного главного побега, уменьшением листьев к верхушке побегов и расчленением околоцветника на 1/2 своей длины. Во вторую группу входят *P. aviculare*, *P. boreale*,

*P. neglectum*, *P. rectum* с выраженным главным побегом, гетерофиллией, расчленением околоцветника на 2/3–3/4 своей длины. Вполне возможно, что данные группы относятся к разным подсекциям секции *Polygonum*. Однако для подтверждения этого требуются дополнительные морфологические и генетические исследования.

В целом, используемые в данных исследованиях молекулярные маркеры и методы показали полную адекватность и могут быть использованы при анализе видов секции *Polygonum*. Для филогенетических построений наиболее информативным является межгенный хлоропластный спейсер *trnL-trnF*. В последовательностях гена *matK* выявлено 2 замены, он является менее пригодным для решения вопросов таксономии изучаемой группы. В дальнейшем планируется осуществить подбор дополнительных молекулярных маркеров для филогенетического анализа.

#### REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Costion C., Ford A., Cross H., Crayn D., Harrington M., Lowe A.** 2011. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. *PLoS One*. 6(11): e26841. DOI: 10.1371/journal.pone.0026841
- Earl D. A., von Holdt B. M.** 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno G., Regnaud S., Goudet J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K.** 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Mansour A., Ismail H. M., Ramadan M. F., Gyulai G.** 2009. Variations in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars grown under heat stress. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 4: 118–127. DOI: 10.1007/s00003-009-0474-5
- Meerts P., Briane J. P., Lefèbvre C.** 1990. A numerical taxonomic study of the *Polygonum aviculare* complex (Polygonaceae) in Belgium. *Plant Systematics and Evolution* 173: 71–89. DOI: 10.1007/BF00937764
- Meissner C. F.** 1826. *Monographiae Generis Polygoni Prodromus*. Genevae. 117 pp. DOI: 10.5962/bhl.title.51543
- Nei M.** 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283–292. DOI: 10.1086/282771
- Nikitina K. K.** 1965. About seed reproduction of knotgrass. In: *Uchenye zapiski Ulyanovskogo pedagogicheskogo instituta* [Memoir of Ulyanovsk Pedagogical Institute] 20, 6: 31–37. [In Russian] (**Никитина К. К.** О семенном размножении спорыша // Ученые записки Ульяновского педагогического института, 1965. Т. 20, вып. 6. С. 31–37).
- Paterson I. D., Downie D. A., Hill M. P.** 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. *Biological Control* 48(1): 84–91. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.09.012
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945
- Scholz H.** 1958. Die systematic des europäischen *Polygonum aviculare* L. I. Die Zweiteilung des *P. aviculare* nach Lindman und der Formenkreis des *P. aequale* Lindman. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 71(10): 427–434.
- Serebryakov I. G.** 1962. *Ekologicheskaya morfologiya rasteny. Zhiznennyye formy pokrytosemnykh i khvoynnykh* [Ecological morphology of plants. Plant life-form of angiosperms and conifers]. Moscow: Vysshaya shkola. 378 pp. [In Russian] (**Серебряков И. Г.** Экологическая морфология растений. Жизненные формы покрытосеменных и хвойных. М.: Высшая школа, 1962. 378 с.).
- Serebryakov I. G.** 1964. Plant life-form of Embryophyta and their study. In: *Polevaya geobotanika* [Field geobotany]. Vol. 3. Moscow: AN SSSR. Pp. 146–205. [In Russian] (**Серебряков И. Г.** Жизненные формы высших растений и их изучение // Полевая геоботаника. Т. 3. М.: АН СССР, 1964. С. 146–205).

- Styles B. T.** 1962. The taxonomy of *Polygonum aviculare* and its allies in Britain. *Watsonia* 5(4): 177–214.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.** 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109. DOI: 10.1007/BF00037152
- Tamura K., Nei M.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10(3): 512–526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Voroshilov V. N.** 1954. For systematics of knotgrasses of Center of European part of USSR. *Byull. Glavn. bot. sada (Moscow)* [Bulletin of the Main Botanical Garden] 18: 97–108. [In Russian] (**Ворошилов В. Н.** К систематике спорышей Средней полосы европейской части СССР // Бюл. Глав. ботан. сада, 1954. Вып. 18. С. 97–108).
- Yanishanskiy D. Ye.** 1927. On the characterization of *Polygonum salsugineum* M. V. and heterocarpy in the genus *Polygonum* of the section *Avicularia* Meisn. *Izvestiya Saratovskogo obshchestva yestestvoispytateley* [News of the Saratov Society of Naturalists] 2, 1: 16–19. [In Russian] (**Янишевский Д. Е.** К характеристике *Polygonum salsugineum* M. V. и гетерокарпии у рода *Polygonum* секции *Avicularia* Meisn. // Известия Саратовского общ-ва естествоиспытат., 1927. Т. 2, № 1. С. 16–19).
- Yurtseva O. V.** 1998. Self-pollination in species of *Polygonum aviculare* L. relationship (*Polygonum* subsection *Polygonum*). *Byull. Moskovsk. Obshch. Isp. Prir., Otd. Biol.* [Bull. Moscow Soc. Natur. Biol. Ser.] 103, 5: 61–67. [In Russian] (**Юрцева О. В.** Самоопыление у видов родства *Polygonum aviculare* L. (*Polygonum* subsect. *Polygonum*) // Бюл. МОИП. Отд. биол., 1998. Т. 103, вып. 5. С. 61–67).
- Yurtseva O. V., Kramina T. Ye.** 2003. Variability of species of subsection *Polygonum* of the genus *Polygonum* (Polygonaceae) due to possible hybridization. *Bot. Zhurn.* 88(1): 9–25. [In Russian] (**Юрцева О. В. Крамина Т. Е.** Изменчивость видов подсекции *Polygonum* рода *Polygonum* (Polygonaceae) в связи с возможной гибридизацией // Бот. журн., 2003. Т. 88, № 1. С. 9–25).
- Yurtseva O. V., Troitskiy A. V., Bobrova V. K., Voyloкова V. N.** 2010. To the revision of the system of the genus *Polygonum* L. s. str. (Polygonaceae): molecular and morphological data. *Bot. Zhurn.* 95(2): 226–247. [In Russian] (**Юрцева О. В., Троицкий А. В., Боброва В. К., Войлокова В. Н.** К ревизии системы рода *Polygonum* L. s. str. (Polygonaceae): молекулярные и морфологические данные // Бот. журн., 2010. Т. 95, № 2. С. 226–247).
- Yurtseva O. V., Voyloкова V. N., Troitskiy A. V., Bobrova V. K.** 2006. Morphological variability and genetic polymorphism of species of *Polygonum aviculare* relationship (Polygonaceae). *Bot. Zhurn.* 91(5): 697–716. [In Russian] (**Юрцева О. В., Войлокова В. Н., Троицкий А. В., Боброва В. К.** Морфологическая изменчивость и генетический полиморфизм видов родства *Polygonum aviculare* (Polygonaceae) // Бот. журн., 2006. Т. 91, № 5. С. 697–716).
- Yurtseva O. V., Yakovleva N. D., Ivanova-Ragkevich T. I.** 1999. Heterocarpy in *Polygonum aviculare* L. s. str. and related species (*Polygonum* subsect. *Polygonum*). *Byull. Moskovsk. Obshch. Isp. Prir., Otd. Biol.* [Bull. Moscow Soc. Natur. Biol. Ser.] 104, 2: 13–20. [In Russian] (**Юрцева О. В., Яковлева Н. Д., Иванова-Радкевич Т. И.** Гетерокарпия у *Polygonum aviculare* L. и близких видов (*Polygonum* subsect. *Polygonum*) // Бюл. МОИП. Отд. биол., 1999. Т. 104, вып. 2. С. 13–20).