



БІЯЛОГІЯ

УДК 575.16:581.524.2

Экстракция ДНК и выявление генетического полиморфизма чужеродных видов растений с помощью RAPD-диагностики

П.Ю. Колмаков, Г.Г. Пирханов, А.Ю. Леонов, Ю.И. Высоцкий
Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

В статье приводятся данные о генетической гетерогенности образцов растений из родов *Heracleum* L., *Solidago* L., *Impatiens* L., отобранных на территории Витебской области Республики Беларусь.

Цель исследования – изучить генетическую гетерогенность образцов видов из родов *Heracleum* L., *Solidago* L., *Impatiens* L.

Материал и методы. Материалом послужили образцы вегетативных органов видов, идентифицированных по морфологическим признакам, как *Heracleum sosnowskyi* Manden, *Impatiens glandulifera* Royle, *Solidago virgaurea* L., собранные в пределах Витебской области Республики Беларусь. Использовались молекулярно-генетические методы исследования. Все работы проведены на базе научно-исследовательской лаборатории ПЦР-анализа Витебского государственного университета имени П.М. Машерова.

Результаты и их обсуждение. Была выявлена внутривидовая и межвидовая генетическая гетерогенность между поступившими образцами внутри каждого изучаемого комплекса образцов. Степень генетической гетерогенности биоматериала обсуждается с учетом морфологических и экологических характеристик образцов.

Заключение. Образцы *Heracleum* spp. комплекса характеризуются межвидовыми генетическими различиями: выделяются три значимые группы образцов по межвидовому различию. Группа *Solidago* spp. характеризуется плавным изменением морфологических признаков вегетативных органов с выделением трех групп по межвидовой гетерогенности. Комплекс *Impatiens* spp. с четкими межвидовыми генетическими различиями: выделен образец с яркими морфологическими и межвидовыми генетическими различиями.

Ключевые слова: инвазивные виды, генетическая гетерогенность, *Heracleum* spp., *Solidago* spp., *Impatiens* spp., RAPD-диагностика, евклидово расстояние.

DNA Extraction and Identification of Genetic Polymorphism of Alien Plant Species by RAPD Diagnostics

P.Yu. Kolmakov, G.G. Pirkhanov, A.Yu. Leonov, Yu.I. Vysotski
Educational Establishment «Vitebsk State P.M. Masherov University»

Data on genetic heterogeneity of plant samples from *Heracleum* L., *Solidago* L., *Impatiens* L., genii selected on the territory of Vitebsk Region of the Republic of Belarus are presented in the article.

The purpose of the article is to study genetic heterogeneity of samples of species from the genii of *Heracleum* L., *Solidago* L., *Impatiens* L.

Material and methods. Samples of vegetative organs of species, which are identified according to morphological features as *Heracleum sosnowskyi* Manden, *Impatiens glandulifera* Royle, *Solidago virgaurea* L., collected within Vitebsk Region of the Republic of Belarus, were the study material. Molecular and genetic research methods were used. The work was conducted on the base of the Research Laboratory of PCR analysis at Vitebsk State P.M. Masherov University.

Findings and their discussion. Inner-species and inter-species genetic heterogeneity among the samples within every studied sample complex was identified. The degree of genetic heterogeneity of the biomaterial is discussed considering morphological and ecological characteristics of the samples.

Conclusion. *Heracleum* spp. complex samples are characterized by interspecies genetic differences: three distinct sample groups of interspecies difference are singled out. *Solidago* spp. group is characterized by smooth modification of morphologic features of vegetative organs with singling out three groups of interspecies heterogeneity. *Impatiens* spp. complex has distinct interspecies genetic differences: a sample with distinct morphological and interspecies genetic differences was identified.

Key words: invasive species, genetic heterogeneity, *Heracleum* spp., *Solidago* spp., *Impatiens* spp., RAPD diagnostics, Euclid distance.

Значительные проблемы с инвазивными заносными видами – это относительно недавний феномен. Наибольшее число местообитаний в мире подверглось воздействию таких проблем только в последние пятьдесят лет своего существования. Некоторые наиболее заметные примеры распространения инвазий датируются еще более ранними временами, хотя в большинстве случаев мы имеем мало или вообще не имеем информации об этом [1].

XX столетие характеризуется тем, что наибольшее количество видов было добавлено в списки инвазивных. Преобладающее число беспокоящих инвазий активно воздействует на природные экосистемы и на все биоразнообразие в целом [1].

В настоящее время инвазии чужеродных видов признаны глобальной экологической проблемой. Проникновение чужеродных видов имеет целый ряд негативных последствий экологического, экономического и социального характера. По заключениям международных экспертов инвазии чужеродных видов в глобальном масштабе являются второй по значимости (после антропогенного загрязнения среды) причиной вымирания аборигенных видов и потери биоразнообразия. Многие из чужеродных видов характеризуются высокой пластичностью, что помогает им внедряться в новые для них экосистемы, высокой скоростью размножения, позволяющей быстро наращивать свою численность, и высокой конкурентной способностью, приводящей к подавлению или вытеснению аборигенных видов [2].

Шестьдесят пять видов рода *Heracleum* L. (Apiaceae) распространено в умеренной зоне Европы, Азии, Африки и Северной Америки [3]. Наибольшее видовое разнообразие наблюдается в Китае (29 видов), затем на Кавказе (26 видов) [4; 5]. Флора Европы насчитывает восемь аборигенных видов, наиболее обычный из которых *Heracleum sphondylium* L. [6]. Некоторые виды с большой биомассой культивируются как декоративные или ранее использовались для производства фуража. Небольшая группа борщевиков, которая была интродуцирована в Европе, называется «большими, толстыми или гигантскими» борщевиками [7]. Три вида из таких интродуцентов стали инвазивными в Европе: *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier, *Heracleum sosnowskyi* Manden и *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer [1]. Достоверно, по литературным источникам, известно время начала интродукции (1940-е годы) в Беларуси, странах Балтии, Украине и ГДР одного из трех больших борщевиков: *Heracleum sosnowskyi* Manden. В северо-западной России этот вид был интродуцирован в 1947 году как сельскохозяйственное растение [7].

Heracleum mantegazzianum Sommier & Levier в центральной и восточной Европе давно является ярким примером инвазии [8], однако генетические взаимосвязи этого вида с другими гигантскими борщевиками стали изучаться только сейчас [7; 9].

В Европе была использована техника «Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)» для изучения генетических родственных связей между инвазивными таксонами рода борщевик. Результатом этих исследований является доказательство наличия трех видов: *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier, *Heracleum sosnowskyi* Manden и *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer [9].

Три вида из рода *Impatiens* L. известно в Беларуси: *Impatiens glandulifera* Royle, *Impatiens noli-tangere* L., *Impatiens parviflora* DC. Из этих видов только один относится к аборигенным: *Impatiens noli-tangere* L. [10].

В северо-западной России встречается, но пока очень редко, еще один инвазивный вид: *Impatiens nevskii* Pobed., который отличается светло-розовыми или лиловыми цветками [11; 12].

Природный ареал *Impatiens glandulifera* Royle – западные Гималаи. Благодаря человеку вид *Impatiens glandulifera* Royle распространился по всей Евразии, проник в Северную Америку. В Европе появился в 1838 г. (Англия). Натурализовался в конце XIX – начале XX века. Расширение ареала активизировалось после Второй

мировой войны. Литва – 1959 г., Польша – 1960-е годы. Проник в горные ландшафты – обнаружен в Альпах, Татрах, Пиренеях. В Северной Америке *Impatiens glandulifera* Royle интродуцирован в 1906 г. В естественную растительность по берегам рек и по влажным местообитаниям стал внедряться в 1960-е гг. На территории России интродуцирован в конце XIX века. Активная натурализация началась в 1960–1970-х гг. В настоящее время *Impatiens glandulifera* Royle считается агрессивным чужеродным видом в умеренном поясе Европы, Азии, Северной Америки и Новой Зеландии. Наиболее северные популяции достигли полярного круга. Распространяется из садов и населенных мест. Одним из главных путей распространения *Impatiens glandulifera* Royle считаются реки. *Impatiens glandulifera* Royle внедряется в природные и природно-антропогенные местообитания: влажные луга и леса, канавы, берега рек и озер, старые парки, обочины дорог, зоны подтопления и т.д. [13].

Виды рода *Impatiens* L. считаются в той или иной степени полиморфными: существуют различные морфотипы вегетативных органов. Нет достоверных молекулярно-генетических доказательств полиморфизма различных внутривидовых комплексов представителей этого рода на территории Беларуси.

На территории нашей республики произрастает три вида из рода *Solidago* L.: *Solidago virgaurea* L., *Solidago gigantea* Ait., *Solidago canadensis* L. [10]. Из них только *Solidago virgaurea* L. типичный абориген. Остальные виды – интродуценты. Для северо-западной России указаны те же виды, но отмечено, что *Solidago virgaurea* L. является полиморфным, в пределах которого может быть выделено несколько подвидов, отличающихся преимущественно величиной корзинок, количеством стеблевых листьев, временем цветения и экологической приуроченностью [11]. В литературных источниках указаны ключи для определения подвидов *Solidago virgaurea* L. на территории северо-западной России [11], или даже выделяют отдельные виды, обозначенные на основании анализа полиморфности *Solidago virgaurea* L. [12]. Для природных локалитетов Беларуси *Solidago virgaurea* L. приводится без разделения на подвиды [10].

Solidago virgaurea L. не является типичным интродуцентом местной флоры. Морфологическая гетерогенность образцов, существующие экологические особенности популяции внутри таксона дают повод к проведению молекулярно-генетических исследований этого вида.

Цель исследования – изучить генетическую гетерогенность образцов видов из родов *Heracleum* L., *Solidago* L., *Impatiens* L.

Задачи: выделить тотальную ДНК из биоматериала, амплифицировать ее с использованием неспецифических праймеров из группы ОРА, выполнить статистический анализ полученных результатов после стадии визуализации в агарозном геле.

Материал и методы. Материалом послужили образцы вегетативных органов видов, идентифицированных по морфологическим признакам, как *Heracleum sosnowskyi* Manden, *Impatiens glandulifera* Royle, *Solidago virgaurea* L., собранные в пределах Витебской области Республики Беларусь. Использовались молекулярно-генетические методы исследований.

Поступившие образцы, идентифицированные до видового уровня по морфологическим признакам, нами именовались следующим образом: комплексы образцов *Heracleum spp.*, *Solidago spp.*, *Impatiens spp.*

Все работы проведены на базе научно-исследовательской лаборатории ПЦР-анализа Витебского государственного университета имени П.М. Машерова в рамках ГПНИ «Природопользование и экология», п/п 2 «Биоразнообразие, биоресурсы, экология», задание 2.05 «Оценка угроз и разработка системы рисков от внедрения инвазивных видов в нативные сообщества как элемент экологической безопасности Республики Беларусь».

Биоматериал поступал в зону приемки с присвоением индивидуального порядкового номера с занесением в базу данных основных характеристик образца и его фотографии. Выделение ДНК из образцов производили в лабораторных условиях с использованием коммерческого набора «Нуклеосорб С» фирмы «Праймтех» (Беларусь) согласно прилагаемому протоколу, а также с применением фенольного метода выделения тотальной ДНК из растительного материала [14] и с помощью СТАВ (гексадецилтриметиламмоний бромид) метода, адаптированных для конкретных условий, поступающего биоматериала и поставленных задач. Очистку от РНК осуществляли в конце протоколов: фенольного и СТАВ методов.

Для амплификации использовались неканонические праймеры из группы ОРА. Амплификацию проводили с применением стандартных для использования праймеров ПЦР-протоколов [15–17].

Электрофорез амплифицированных образцов проводился в 2% агарозном геле с применением красителя бромистого этидия. Визуализация профилей осуществлялась в системе гель-документирования BIO-RAD Gel DOC™ XR+ в ультрафиолетовом спектре.

Статистический анализ полученных полос в паттернах производился с использованием пакета программ STATISTICA7.

Результаты и их обсуждение. Первичная экстракция и очистка нуклеиновых кислот с помощью набора реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» фирмы Праймтех (Беларусь) проходила только из свежего материала, поскольку амплифицированные фрагменты ДНК из гербарного материала не были видны при визуализации в ультрафиолетовом спектре. Концентрация выделенных нуклеиновых кислот в растворе количественно измеря-

лась при помощи спектрофотометра «Nanophotometer P330» и составляла в пределах 40–280 нг/мкл. Чистота образцов определялась по отношению оптических плотностей при 260 и 280 нм (A260/A280) и варьировала в пределах 1.7–1.9, а иногда и 2.0, что соответствует общепринятым стандартам и говорит об отсутствии критических белковых загрязнений. Дополнительной очистки тотальная ДНК после выделения коммерческим набором «Нуклеосорб» фирмы Праймтех (Беларусь) не требовала.

Использование фенольной методики [14] и СТАВ (гексадецилтриметиламмоний бромид) [16] требовало адаптации к существующим условиям, биоматериалу и поставленным задачам. В результате экспериментов была получена адаптированная версия протоколов проведения эксперимента.

Адаптированная фенольная методика выделения тотальной ДНК из растительного материала содержит следующие этапы:

1. Гомогенизация растительного материала с добавлением 500 мкл экстракционного буфера. Активное перемешивание.
2. Образцы помещают в термостат на 30 минут при температуре 40°C. Экстракт перемешивается каждые 10–15 минут, чтобы не было осадка.
3. Ледяная баня биоматериала в течение 5 минут.
4. Приливаем в каждый образец по 500 мкл фенол-хлороформа (1:1) и перемешиваем 2–3 минуты. Центрифугируем 10 минут при 10000 об./мин. Отбираем верхнюю фазу в новую пробирку на 1,5 мл.
5. Приливаем 500 мкл хлороформ-изоамилового спирта (1:24) и интенсивно перемешиваем переворачиванием 2–3 минуты. Центрифугируем 10 минут при 10000 об./мин. Отбираем верхнюю фазу.
6. Приливаем двойной объем 96% этилового спирта (–20°C). Образуется «медуза» или мелкодисперсная взвесь. Центрифугируем 5 минут при 6000 об./мин.
7. Сливаем надосадочную жидкость. Приливаем 500 мкл 70% этилового спирта (–20°C). Перемешиваем на Vortex. Центрифугируем 5 минут на 6000 об./мин.
8. Сливаем надосадочную жидкость и высушиваем ДНК в термостате при 30°C.
9. Растворяем осадок в 100 мкл ТЕ буфера и перемешиваем.

В ходе работы было установлено, что фенольный метод выделения тотальной ДНК обладает высокой лабильностью, что позволяет адаптировать данную методику под специфичность выделения из разных растительных образцов. Также к преимуществам фенольного метода можно отнести низкий расход реактивов, лабораторного пластика и большой объем выделенной тотальной ДНК в сравнении с коммерческим набором. Особенностью реакции амплификации в конкретном случае является необходимость сильного разбавления первичной тотальной ДНК перед добавлением в реакционную смесь.

Адаптированная методика выделения тотальной ДНК с помощью СТАВ (гексадецилтриметиламмоний бромид) из растительного материала содержит следующие этапы:

1. Поместить биоматериал в пробирку на 1,5 мл.
2. Добавить 600 мкл 2% СТАВ лизис буфера и размолоть до гомогената.
3. Поместить пробирку в термостат при температуре 65°C на 40–60 минут. (Прим.: здесь температуру инкубации взять лучше 40°C, поскольку фермент при 65°C разрушается).
4. Центрифугировать пробирку при 13000 оборотов в мин в течение 5 минут. (Прим.: на практике лучше центрифугировать при 10000 оборотов в минуту и 10 минут).
5. Переместить верхнюю фазу в новую пробирку.
6. Добавить 600 мкл хлороформа и перемешать до коллоидной суспензии.
7. Центрифугировать при 13000 оборотов в минуту в течение 15 минут.
8. Переместить верхнюю фазу в новую пробирку на 1,5 мкл.
9. Осадить ДНК изопропиловым спиртом (примерно 750 мкл). Хорошо перемешать.
10. Поместить образцы в морозильник на 30 минут при –20°C (Прим.: можно оставить на ночь).
11. Отцентрифугировать образцы при 13000 оборотов в минуту в течение 30 минут.
12. Слить верхнюю фазу (Прим.: остается «медуза» на дне пробирки).
13. Добавить к осадку «в виде медузы» 200 мкл 70% ледяного этанола для промывки ДНК.
14. Отцентрифугировать образцы при 7000 оборотов в минуту в течение 5 минут.
15. Убрать верхнюю фазу и образец высушить в термостате в течение 5 минут при 30°C.
16. Растворить образец ДНК в 50 мл ТЕ буфера (или в стерильной дисциллированной воде).

В конце каждого протокола существует необходимость очистки ДНК продукта от РНК. Для этого используется маточный раствор РНК-азы в SSC-буфере, который готовится непосредственно перед употреблением [18]. На 1 мл раствора тотальной ДНК мы добавляем 70 мкл раствора РНК-азы в SSC-буфере. В термостате экспозиция составляет два часа при 37°C. Очистка ДНК после экспозиции в термостате осуществляется способом, который прописан в протоколах с использованием хлороформ-изоамила.

После очистки от РНК раствор тотальной ДНК хранят при (–20°C).

Свежие образцы, вегетативные органы, *Heracleum spp.*, подвергались гомогенизации. Визуализация амплифицированной ДНК проводилась в ультрафиолетовом свете. Результат электрофореза изображен на рис. 1.

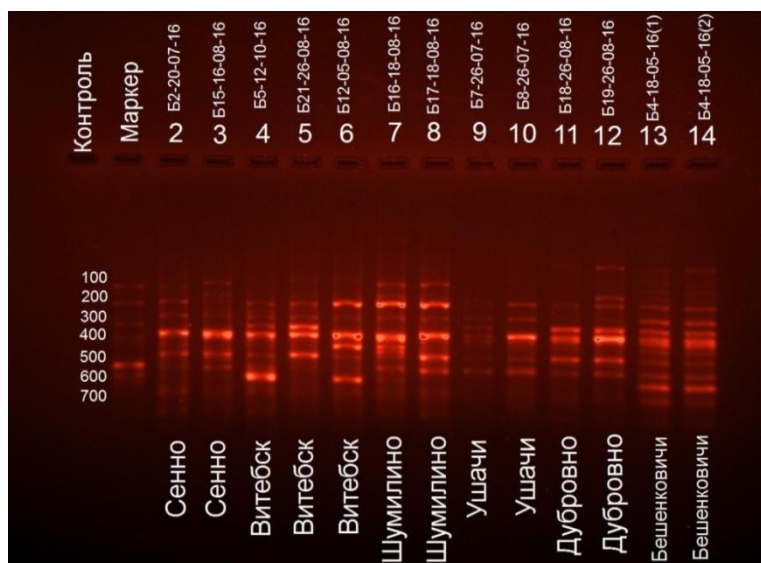


Рис. 1. Профили продуктов RAPD-ПЦР для ДНК *Heracleum spp.*

Результат отбора полос по интенсивности изображен в табл. 1.

Таблица 1

Результат отбора полос по интенсивности для фрагментов ДНК *Heracleum spp.*

Маркер bp	№ фрагмента	Б2-20-07-16	Б15-16-08-16	Б5-12-10-15	Б21-26-08-16	Б12-05-08-16	Б16-18-08-16	Б17-18-08-16	Б7-26-07-16	Б8-26-07-16	Б18-26-08-16	Б19-26-08-16	Б4-18-05-16(1)	Б4-18-05-16(2)
<100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5
100	2	0,5	0,5	0	0,5	0	1	1	0	0	0	0	0	0
200	3	0,5	0	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
300	4	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0,5	0,5
350	5	0	0	0,5	1	0	0	0	0,5	0	1	1	1	1
400	6	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1
450	7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0,5	0,5
500	8	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
550	9	0	0,5	0,5	0	0	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
600	10	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
700	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5
		Сенно	Сенно	Витебск	Витебск	Витебск	Шумилино	Шумилино	Ушачи	Ушачи	Дубровно	Дубровно	Бешенковичи	Бешенковичи

Примечание: 0 – фрагмент ДНК отсутствует; 0,5 – фрагмент бледный; 1 – фрагмент насыщенный.

Дендрограмма на рис. 2 построена по методу полной связи. Качество меры близости – евклидово расстояние.

Метод полной связи определяет расстояние между кластерами как наибольшее расстояние между любыми двумя объектами в различных кластерах (т.е. «наиболее удаленными соседями»).

Мера близости, устанавливаемая евклидовым расстоянием, является геометрическим расстоянием в n-мерном пространстве и вычисляется следующим образом:

$$d(x,y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$$

Использование кластер-анализа для решения данной задачи наиболее эффективно. В общем случае кластер-анализ предназначен для объединения некоторых объектов в классы (кластеры) таким образом, чтобы в один класс попадали максимально схожие, а объекты различных классов максимально отличались друг от друга. Количественный показатель сходства рассчитывается заданным способом на основании данных, характеризующих объекты.

Евклидово расстояние между изучаемыми живыми объектами указано в табл. 2 и на рис. 2.

Таблица 2

Метод полной связи. Числовые значения евклидова расстояния

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0,00	3,42	3,22	2,95	3,99	3,85	4,72	4,36	2,22	4,34	4,90	5,25	5,25
2	3,42	0,00	3,94	4,52	5,84	5,15	5,24	4,92	3,18	3,69	4,34	5,73	5,73
3	3,22	3,94	0,00	3,83	3,77	4,69	4,79	4,16	2,33	3,87	4,49	3,88	3,88
4	2,95	4,52	3,83	0,00	4,96	4,85	4,72	4,83	3,69	3,18	3,91	5,25	5,25
5	3,99	5,84	3,77	4,96	0,00	3,77	5,91	5,62	4,18	5,60	6,05	4,98	4,98
6	3,85	5,15	4,69	4,85	3,77	0,00	3,77	5,53	4,07	5,52	5,97	5,71	5,71
7	4,72	5,24	4,79	4,72	5,91	3,77	0,00	5,62	4,18	4,77	5,29	6,34	6,34
8	4,36	4,92	4,16	4,83	5,62	5,53	5,62	0,00	3,75	4,86	5,37	5,69	5,69
9	2,22	3,18	2,33	3,69	4,18	4,07	4,18	3,75	0,00	3,73	4,37	4,76	4,76
10	4,34	3,69	3,87	3,18	5,60	5,52	4,77	4,86	3,73	0,00	2,28	5,27	5,27
11	4,90	4,34	4,49	3,91	6,05	5,97	5,29	5,37	4,37	2,28	0,00	4,76	4,76
12	5,25	5,73	3,88	5,25	4,98	5,71	6,34	5,69	4,76	5,27	4,76	0,00	0,00
13	5,25	5,73	3,88	5,25	4,98	5,71	6,34	5,69	4,76	5,27	4,76	0,00	0,00

Примечание: 1 – Б2-20-07-16; 2 – Б15-16-08-16; 3 – Б5-12-10-15; 4 – Б21-26-08-16; 5 – Б12-05-08-16; 6 – Б16-18-08-16; 7 – Б17-18-08-16; 8 – Б7-26-07-16; 9 – Б8-26-07-16; 10 – Б18-26-08-16; 11 – Б19-26-08-16; 12 – Б4-18-05-16(1); 13 – Б4-18-05-16(2).

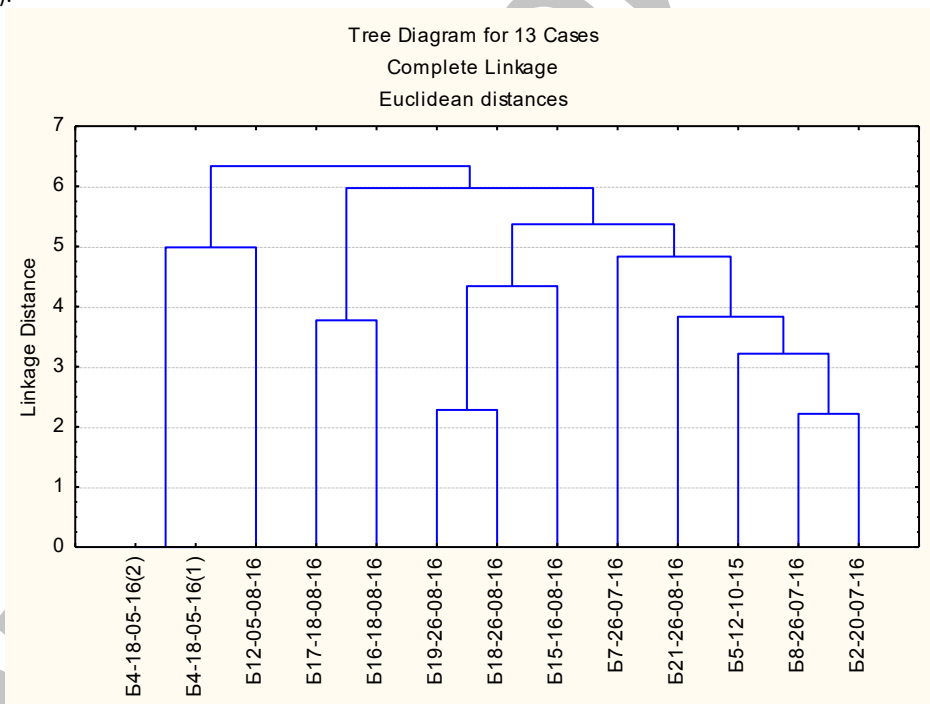


Рис. 2. Дендрограмма сходства образцов *Heracleum spp.*

Биоматериал рода *Heracleum* L. отличается по морфологическим признакам вегетативных органов: особенно степенью изрезанности листовой пластинки. Поступившие образцы представляют собой три генетически обособленные группы (евклидово расстояние больше 5), которые, вероятнее всего, отличаются друг от друга не только морфологическими, но и экологическими характеристиками. Генетическая гетерогенность материала является межвидовой, поскольку евклидово расстояние больше 2.

На молекулярном уровне было обнаружено генетическое разнообразие в комплексе *Solidago spp.* На рис. 3 представлены RAPD-профили выделений ДНК из образцов, собранных на территории Витебской области с одновременным отбором по интенсивности полос.

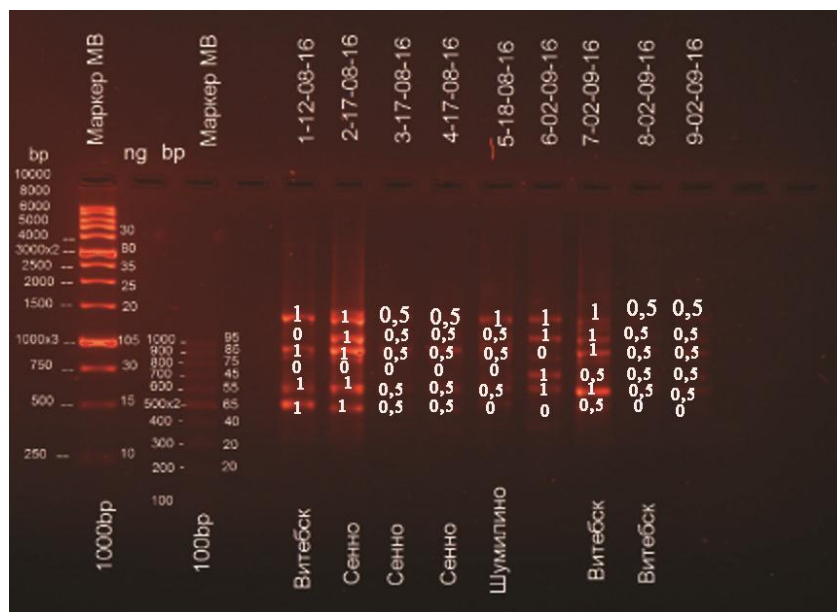


Рис. 3. Профили продуктов RAPD-ПЦР для ДНК *Solidago spp.*

Евклидово расстояние между изучаемыми живыми объектами указано на рис. 4 и в табл. 3.

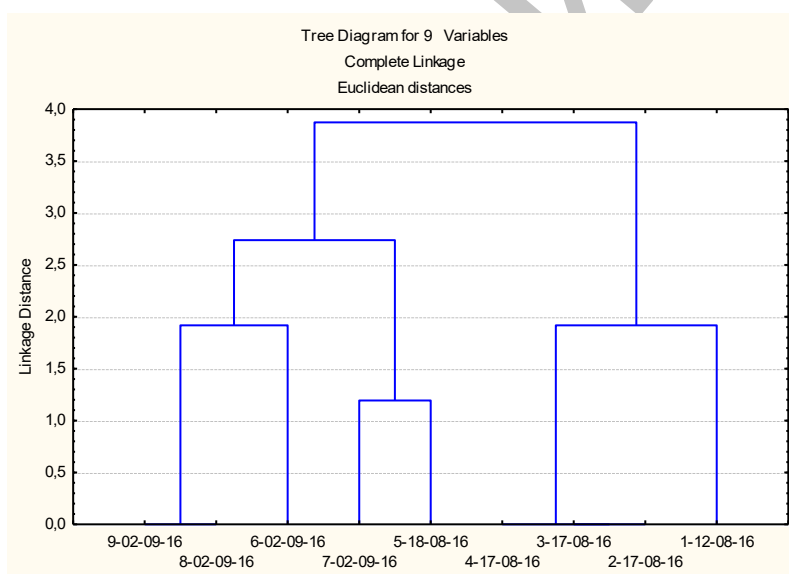


Рис. 4. Дендрограмма сходства образцов *Solidago spp.*

Таблица 3

Метод полной связи. Числовые значения евклидова расстояния

	1-12-08-16	2-17-08-16	3-17-08-16	4-17-08-16	5-18-08-16	6-02-09-16	7-02-09-16	8-02-09-16	9-02-09-16
1-12-08-16	0,00	1,92	1,92	1,92	2,56	3,87	2,74	3,63	3,63
2-17-08-16	1,92	0,00	0,00	0,00	2,14	3,63	1,92	3,46	3,46
3-17-08-16	1,92	0,00	0,00	0,00	2,14	3,63	1,92	3,46	3,46
4-17-08-16	1,92	0,00	0,00	0,00	2,14	3,63	1,92	3,46	3,46
5-18-08-16	2,56	2,14	2,14	2,14	0,00	2,56	1,19	2,14	2,14
6-02-09-16	3,87	3,63	3,63	3,63	2,56	0,00	2,74	1,92	1,92
7-02-09-16	2,74	1,92	1,92	1,92	1,19	2,74	0,00	1,92	1,92
8-02-09-16	3,63	3,46	3,46	3,46	2,14	1,92	1,92	0,00	0,00
9-02-09-16	3,63	3,46	3,46	3,46	2,14	1,92	1,92	0,00	0,00

На дендрограмме (рис. 4) чётко выделяются три группы, отличающиеся по межвидовой генетической гетерогенности, где евклидово расстояние больше 2. Комплекс *Solidago spp.* слабо дифференцируется по своей морфологии: варьирование признаков вегетативных органов происходит плавно в изучаемой выборке.

На рис. 5 изображены RAPD-профили амплифицированной неспецифическими праймерами ДНК, выделенной из вегетативных органов *Impatiens spp.*

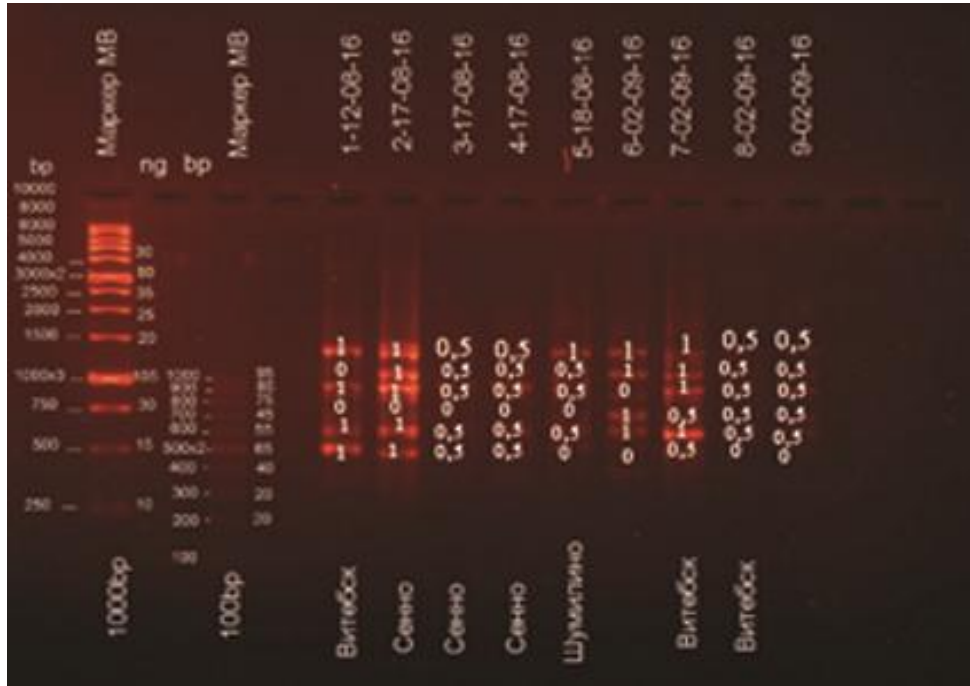


Рис. 5. Профили продуктов RAPD-ПЦР для ДНК *Impatiens spp.*

Евклидово расстояние между изучаемыми живыми объектами указано на рис. 6 и в табл. 4.

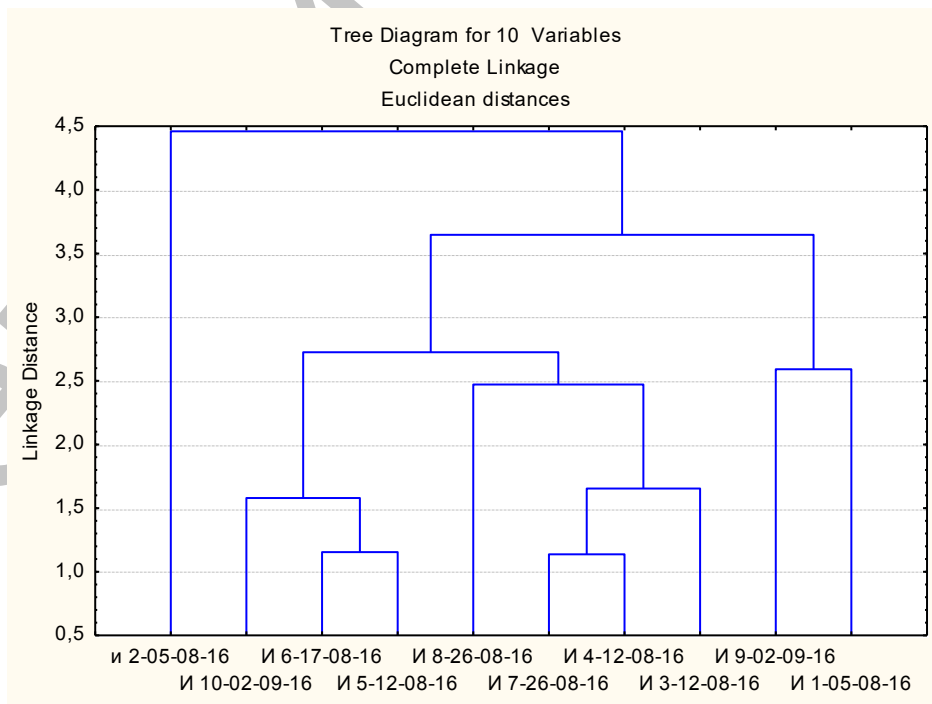


Рис. 6. Дендрограмма сходства образцов *Impatiens spp.*

Метод полной связи. Числовые значения евклидова расстояния

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,00	3,26	3,65	3,31	2,53	2,91	2,66	2,72	2,59	2,45
2	3,26	0,00	4,43	4,00	3,55	3,52	4,00	3,55	4,46	3,15
3	3,65	4,43	0,00	1,15	2,10	2,56	1,65	2,47	3,30	2,72
4	3,31	4,00	1,15	0,00	1,70	2,10	1,14	1,79	3,61	2,25
5	2,53	3,55	2,10	1,70	0,00	1,15	1,14	2,47	3,12	1,58
6	2,91	3,52	2,56	2,10	1,15	0,00	1,65	2,47	3,30	1,38
7	2,66	4,00	1,65	1,14	1,14	1,65	0,00	1,89	3,29	1,67
8	2,72	3,55	2,47	1,79	2,47	2,47	1,89	0,00	3,51	1,91
9	2,59	4,46	3,30	3,61	3,12	3,30	3,29	3,51	0,00	3,37
10	2,45	3,15	2,72	2,25	1,58	1,38	1,67	1,91	3,37	0,00

Примечание: 1 – И 1-05-08-16; 2 – И 2-05-08-16; 3 – И 3-12-08-16; 4 – И 4-12-08-16; 5 – И 5-12-08-16; 6 – И 6-17-08-16; 7 – И 7-26-08-16; 8 – И 8-26-08-16; 9 – И 9-02-09-16; 10 – И 10-02-09-16.

На дендрограмме (рис. 6) выделяются три группы по межвидовой генетической гетерогенности среди изученных образцов *Impatiens spp.*, где евклидово расстояние больше 3. Образец И 2-05-08-16 по евклидовому расстоянию и внешним морфологическим характеристикам вегетативных органов значительно отличается от других образцов (евклидово расстояние больше 4).

Заключение. По результатам анализа морфологических признаков вегетативных органов и изучения степени генетического полиморфизма поступившего биоматериала родов *Heracleum L.*, *Solidago L.*, *Impatiens L.* можно сделать следующие выводы:

- биоматериал рода *Heracleum L.* отличается по морфологическим признакам вегетативных органов. Поступившие образцы представляют собой три генетически обособленные группы (евклидово расстояние больше 5), которые, вероятнее всего, отличаются друг от друга не только морфологическими, но и экологическими характеристиками. Генетическая гетерогенность материала является межвидовой, поскольку евклидово расстояние больше 2;
- комплекс *Solidago spp.* по характеристике вегетативных органов является слабо разделяемым на отдельные явно обособленные группы ввиду плавно изменяющихся морфологических характеристик, что вызывает затруднения в определении четких обособленных таксономических групп. Различимы три кластера с межвидовой гетерогенностью с евклидовым расстоянием более 2;
- комплекс *Impatiens spp.* характеризуется тремя группами по межвидовой генетической гетерогенности среди изученных образцов, где евклидово расстояние равно более 3. Образец с лиловыми лепестками венчика отстоит по генетическим характеристикам от основной группы поступившего биоматериала со значительной разницей в евклидовом расстоянии, что характеризует образец с четко выраженной межвидовой гетерогенностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pyšek, P. Ecology and Management of Giant Hogweed (*Heracleum mantegazzianum*) / P. Pyšek, M.J.W. Cock, W. Nentwig, H.P. Ravn. – Wallingford: CABI, 2007. – 352 p.
2. Инвазивные и чужеродные виды на территории Республики Беларусь: официальный сайт города Новополоцка [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.novopolotsk.by/content/view/1289/>. – Дата доступа: 08.11.2017.
3. Pimenov, M.G. The Genera of the Umbelliferae / M.G. Pimenov, M.V. Leonov // *Nomenclator*. – Royal Bot. Gard. Kew, Moscow University, 1993.
4. Манденова, И.П. Кавказские виды рода *Heracleum L.* / И.П. Манденова. – Тбилиси: АН Грузинской ССР, 1950. – 103 с.
5. Fading, P. *Heracleum* / P. Fading, M.F. Watson // *Flora of China Editorial Committee (eds) Flora of China (Apiaceae through Ericaceae)*. – St. Louis: Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press. – 2005. – Vol. 14. – 194 p.
6. Brummitt, R.K. *Heracleum L.* / R.K. Brummitt // *Flora Europaea. Rosaceae to Umbelliferae*. – Cambridge: Cambridge University Press. – 1968. – Vol. 2. – P. 364–366.
7. Nielsen, C. The Giant Hogweed Best Practice Manual. Guidelines for the Management and Control of an Invasive Alien Weed in Europe / C. Nielsen, H.P. Ravn, M. Cock, W. Nentwig. – Hørsholm: Forest and Landscape Denmark, 2005. – 44 p.
8. Pyšek, P. *Heracleum mantegazzianum* in the Czech Republic: dynamics of spreading from the historical perspective / P. Pyšek // *Flora Geobotanica & Phytotaxonomica*. – 1991. – № 26. – P. 439–454.
9. Jahodova, Š. Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history / Š. Jahodova, S. Trybush, P. Pyšek, M. Wade, A. Karp // *Diversity and Distributions*. – 2007. – № 13. – P. 99–114.
10. Сауткина, Т.А. Определитель высших растений Беларуси / Т.А. Сауткина, Д.И. Третьяков, Г.И. Зубкевич и др. – Минск: Дизайн ПРО, 1999. – 472 с.
11. Аверьянов, Л.В. Иллюстрированный определитель Ленинградской области / Л.В. Аверьянов [и др.]. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 799 с.

12. Цвелев, Н.Н. Определитель сосудистых растений северо-западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области) / Н.Н. Цвелев. – СПб.: СПХФА, 2000. – 781 с.
13. Инвазии: недотрога железистая (*Impatiens glandulifera* Royle): бальзамин железистый, бальзамин железистоностный, бальзамин [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://subscribe.ru/group/pole-chudes/13918523/>. – Дата доступа: 14.12.2017.
14. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1996. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
15. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
16. Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство / В.А. Великов. – Саратов, 2013. – 84 с.
17. Юрченко, Е.О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК. Практическое руководство / Е.О. Юрченко, М.Г. Синявская. – Минск: Право и экономика, 2007. – 101 с.
18. Приготовление и прописи растворов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.molbiol.ru/>. – Дата доступа 20.11.2017.

REFERENCES

1. Pyšek P. Ecology and Management of Giant Hogweed (*Heracleum mantegazzianum*) / P. Pyšek, M.J.W. Cock, W. Nentwig, H.P. Ravn. – Wallingford: CABI. – 2007. – 352 p.
2. *Invasivniye i chuzherodniye vidi na territorii Respubliki Belarus: Ofitsialni sait goroda Novopolotska* [Invasive and Alien Species on the Territory of the Republic of Belarus: Official site of the City of Novopolotsk], Available at: <http://www.novopolotsk.by/content/view/1289/>. (Accessed 08.11.2017).
3. Pimenov M.G. The Genera of the Umbelliferae / M.G. Pimenov, M.V. Leonov. Royal Bot. Gard. Kew, 1993.
4. Mandenova I.P. *Kavkazskiy vidi roda Heracleum L.* [Caucasus Species of *Heracleum L.* Genus], Tbilisi, AN Gruzinskoi SSR, 1950, 103 p.
5. Fading P. *Heracleum* / P. Fading, M.F. Watson // Flora of China Editorial Committee (eds) Flora of China (Apiaceae through Ericaceae). – St. Louis: Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press. – 2005. – Vol. 14. – 194 p.
6. Brummitt R.K. *Heracleum L.* / R.K. Brummitt // Flora Europaea. Rosaceae to Umbelliferae. – Cambridge: Cambridge University Press. – 1968. – Vol. 2. – P. 364–366.
7. Nielsen C. The Giant Hogweed Best Practice Manual. Guidelines for the Management and Control of an Invasive Alien Weed in Europe / C. Nielsen, H.P. Ravn, M. Cock, W. Nentwig. – Hørsholm: Forest and Landscape Denmark. – 2005. – 44 p.
8. Pyšek P. *Heracleum mantegazzianum* in the Czech Republic: dynamics of spreading from the historical perspective / P. Pyšek // Flora Geobotanica & Phytotaxonomica. – № 26. – 1991. – P. 439–454.
9. Jahodova Š. Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history / Š. Jahodova, S. Trybush, P. Pyšek, M. Wade, A. Karp // Diversity and Distributions. – № 13. – 2007. – P. 99–114.
10. Sautkina T.A., Tretyakov D.I., Zubkevich G.I. *Opredelitel vysshikh rastenii Belarusi* [Directory of Higher Plants of Belarus], Minsk, Disain PRO, 1999, 472 p.
11. Averyanov L.V., Budantsev A.L., Geltman D.V. *Illustrirovanni opredelitel Leningradskoi oblasti* [Illustrated Directory of Leningrad Region], Moscow, Tovarishchestvo nauchnikh izdaniy KMK, 2006, 799 p.
12. Tselev N.N. *Opredelitel sosudistikh rastenii severo-zapadnoi Rossii (Leningradskaya, Pskovskaya i Novgorodskaya oblasti)* [Directory of Vessel Plants of North-Western Russia (Leningrad, Pskov and Novgorod Regions)], St. Petersburg, SPKhFA, 2000, 781 p.
13. *Invasii: nedotroga zhelezistaya (Impatiens glandulifera Royle): balzamin zhelezistii, balzamin zhelezistonostnii, balzamin* [Invasions: *Impatiens glandulifera Royle*], Available at: <https://subscribe.ru/group/pole-chudes/13918523/> (Accessed 14.12.2017).
14. Dorokhov D.B., Kloke E. *Genetika* [Genetics], 1996, 33(4), pp. 443–450.
15. Maniatis T., Fritch E., Samburuk J. *Molekuliarnoye klonirovaniye* [Molecular Cloning], Moscow, Mir, 1984, 480 p.
16. Velikov V.A. *Molekuliarnaya biologiya. Prakticheskoye rukovodstvo* [Molecular Biology. Guidelines], 2013, Saratov, 84 p.
17. Yurchenko E.O., Siniavskaya M.G. *Osnovi molekuliarnogo markirovaniya gribnoi DNK. Prakticheskoye rukovodstvo* [Basics of Molecular Marking of Fungus DNA. Guidelines], 2007, Minsk, Pravo i ekonomika, 101 p.
18. *Prigotovleniye i propisi rastvorov* [Preparing and Prescribing Solutions], Available at: <http://www.molbiol.ru/>. (Accessed 20.11.2017).

Поступила в редакцию 15.01.2018

Адрес для корреспонденции: e-mail: pavel_kolmakov@list.ru – Колмаков П.Ю.