

Изучение генетической гетерогенности гигантских борщевиков в инвазивных популяциях на востоке Витебской области

Высоцкий Ю. И., Колмаков П. Ю.

Витебский государственный университет имени П. М. Машерова

Резюме. В публикации изложены первые результаты молекулярно-генетического изучения инвазивных популяций гигантских борщевиков в восточной части Витебской области. Для 16 разных морфологических форм получены были электрофореграммы, формирующие RAPD-профили. С помощью полнозвеньевой группировки получена дендрограмма, которая отражает гетерогенность поступивших образцов борщевиков. Анализ максимальных расстояний между объектами четко показал три группы исследованных объектов. Проводилась ПЦР ампликонов с использованием праймеров ITS1/ITS4, но виды борщевика по данному региону рДНК неразличимы. Потом был выбран другой маркерный регион рДНК: межгенный спейсер IGS. По данному ДНК-маркеру виды борщевика достоверно различимы. Сиквенс *Heracleum sosnowskyi* по видоспецифическому региону IGS отсутствует в международном геномном банке NCBI.

The study of the genetic heterogeneity of *Heracleum* giant (Hogweed giant) in invasive populations in the east of the Vitebsk region. Vysotskiy Yu. I., Kolmakov P. Yu. **Summary.** The publication contains the first results of molecular genetic studies of invasive populations of giant hogweeds in the eastern part of the Vitebsk region. Electrophoregrams, that form RAPD — profiles, have been obtained for 16 different morphological forms. A dendrogram, representing the heterogeneity of received samples of giant hogweeds, has been derived with the help of the full-length grouping. The analysis of maximum distances between objects clearly specified three groups of investigated objects. PCR (polymerase chain reaction) of amplicons was performed using primers ITS1 / ITS4, but the species of the hogweed (*Heracleum*) in this rDNA region are indistinguishable. A different marker region of rDNA was selected: an IGS intergenic spacer. Under this DNA — marker, the species of hogweed (*Heracleum*) is definitely distinguishable.

The sequence of *Heracleum sosnowskyi* according to the species-specific IGS region is absent in the international NCBI genetic bank.

В естественных условиях *Heracleum sosnowskyi* произрастает только на территории Кавказа и является эндемичным видом флоры этого региона. В 70–80 годы XX века несколько видов были введены в агрокультуру как новые кормовые растения [1].

Молекулярно-генетические исследования инвазивных видов рода *Heracleum* в Европе с использованием метода AFLP подтвердили наличие вида *Heracleum sosnowskyi* в Бельгии, Дании и Польше, а инвазионные популяции *Heracleum sosnowskyi* обнаружили отчетливые отличия от природных кавказских [2,3,4].

Сильно различаются экологические предпочтения европейских и кавказских популяций *Heracleum sosnowskyi*. На Кавказе этот вид произрастает в лесу и на полянах, европейский предпочитает открытые места с плодородной почвой.

В Беларуси более 20 лет испытывалось 26 видов рода *Heracleum*. По причине большого внутривидового разнообразия и способности создавать спонтанные межвидовые гибриды, се-

годня нет точных сведений по видовому составу натурализовавшихся популяций видов рода *Heracleum*. В популяциях видов рода *Heracleum* могут присутствовать: Борщевик Лемана, Борщевик шероховато-окаймленный, Борщевик Персидский и Борщевик Мантегацци, который наиболее распространён в европейских странах [5,6].

В Беларуси, России, Литве начаты научные работы по поиску эффективных современных методов по четкой идентификации видов с использованием современных методов исследований. В настоящее время наибольшую популярность в идентификации образцов морфологически трудно различимых видов приобретают методы молекулярных исследований, основанных на реакции амплификации и секвенирования. В молекулярных методах исследований, в идентификации биоматериала, важно правильно выбрать внутренние транскрибируемые спейсеры, по которым можно было бы выполнить идентификацию. В ряде публикаций представлены попытки использовать для сравнения транскрибируемые спейсеры ITS региона ядерной рибосомальной ДНК. Существуют данные об использовании для сравнения стабильные интронные участки пластидной ДНК [7].

Использование молекулярных методов исследований позволит предложить альтернативную классификацию видового состава рода *Heracleum* классификации Drude [8].

В результате экспериментов с образцами *Heracleum sp.*, отобранных из Витебского, Ушачского, Дубровенского, Сенненского районов Витебской области, были получены электрофореграммы, формирующие RAPD-профили. Для того, чтобы иметь достаточно данных об уровне вариации RAPD-паттернов было заложено ряд экспериментов с несколькими повторностями каждого образца, для того чтобы выявить уникальный ДНК-фингерпринт, набор вариабельных полос электрофореграмм, полученных в результате RAPD [9].

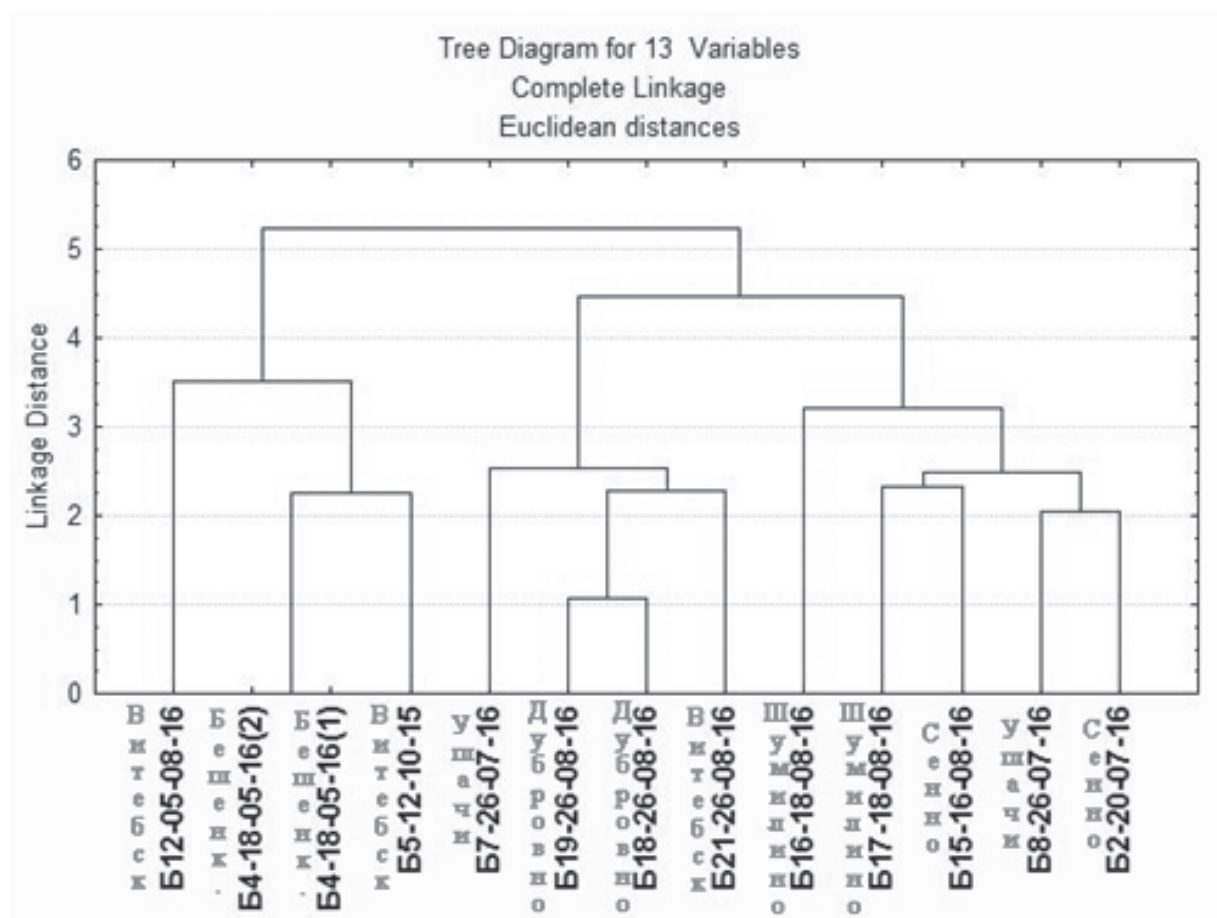


Рис. 1. Дендрограмма генетической гетерогенности образцов *Heracleum sp.*

Было обнаружено генетическое разнообразие среди борщевиков, произрастающих в пределах Витебской области. На рис. 1 представлена дендрограмма генетической гетерогенности исследуемых образцов *Heracleum sp.*

При анализе материала, полученного при RAPD маркировании, был использован индекс подобия — квадрат евклидова расстояния. С помощью полнозвеньевой группировки получена дендрограмма, которая отражает гетерогенность поступивших образцов борщевиков. Анализ максимальных расстояний между объектами четко показал три группы исследованных объектов [10].

На определенном этапе исследования проводилась ПЦР двух образцов ампликонов из Ушачского района Витебской области с использованием праймеров ITS1/ITS4 (регион рДНК, включающий внутри транскрибируемые спейсеры, характеризующиеся полиморфизмом между видами). Однако согласно данным генного банка NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США) [11], виды борщевика по данному региону рДНК неразличимы. В связи с этим был выбран другой маркерный регион рДНК: межгенный спейсер IGS. По данному ДНК-маркеру виды борщевика достоверно различимы. В ходе ПЦР фрагмента межгенного спейсера IGS отмечалась положительная амплификация.

Сиквенс *Heracleum sosnowskyi* по видоспецифическому региону IGS отсутствует в международном генном банке NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США), поэтому удалось выявить только ближайшие родственные виды рода *Heracleum*:

99% сходства по исследованному IGS региону рДНК с *Heracleum mantegazzianum* и *Heracleum raphlagonicum*, но не является одним из них. 96% сходства по исследованному региону рДНК: *Heracleum yunggingense*, *Heracleum franchetii*, *Heracleum wenchuanense*, *Heracleum hemsleyanum*, *Heracleum vicinum*, *Heracleum souliei*.

Выражаем благодарность за помощь в постановке эксперимента сотрудникам ГНУ «Институт леса» Национальной академии наук Беларуси, заведующему лабораторией генетики и биотехнологии, доктору биологических наук, член-корреспонденту НАН Беларуси Падутову В. Е. и ведущему научному сотруднику лаборатории генетики и биотехнологии, кандидату биологических наук, доценту Баранову О. Ю.

Список литературы

1. 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.
2. Виноградова, Ю. К., Майоров С. Р., Хорун Л. В. Черная книга флоры Средней России (Чужеродные виды растений в экосистемах Средней России). Москва, ГЕОС, 2009. 494 с.
3. Jahodova, Š., Trybush S., Pysek P., Wade M., Karp. A. Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history. *Divers. Distrib.*, 2007, Vol. 13, № 1., P. 99–114.
4. Pysek P., Cock M. J. W., Nentwig W., Ravn H. P. Ecology and management of giant hohweed (*Heracleum mantegazzianum*). Wallingford, CABI Publ., 2007. 352 p.
5. Ламан Н. А., Прохоров В. Н., Масловский О. М. Гигантские борщевики — опасные инвазивные виды для природных комплексов и населения Беларуси. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 2009. 40 с.
6. Meltem Maras An ITS DNA Sequence-Based Phylogenetic Study of Some *Heracleum* L. (Umbelliferae) Species From Turkey's Partial Flora. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2008, 33 (4), 163–168.
7. Stephen R. Downie., Seemanti Ramanath., Deborah S., Katz-Downie., and Esmeralda Llanas Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoC1* intron sequences. *American Journal of Botany*, 1998, 85 (4), 563–591.
8. Drude C. G. O. Umbelliferae, In Engler A., Prantl K. Die natürlichen Pflanzenfamilien, vol. 3 (8)? 63–250.

9. Колмаков П. Ю., Высоцкий Ю. И., Мержвинский Л. М. Использование RAPD-маркирования для анализа генетической гетерогенности *Heracleum sp.* в Белорусском Поозерье. Экологическая культура и охрана окружающей среды: II дорофеевские чтения. Материалы международной научно-практической конференции. Витебск, 29–30 ноября 2016, 49–51.
10. Колмаков П. Ю., Высоцкий Ю. И., Бавтуто А. В., Кисова А. С. Экстракция ДНК и выявление полиморфизма *Heracleum sp.* с помощью RAPD-диагностики. Наука — образованию, производству, экономике. Витебск, ВГУ имени П. М. Машерова, Т. 1, 2017. 72–73.
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>