

ИЗУЧЕНИЕ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ РОДА *ACHILLEA* L. ФЛОРЫ СИБИРИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

STUDY OF CLOSELY RELATED SPECIES OF THE GENUS *ACHILLEA* L. FLORA OF SIBERIA BY MOLECULAR GENETIC METHODS

**Yu. Kulemin
A. Kuprijanov**

Summary. There are 12 species of the genus *Achillea* L. in the flora of Siberia. Many of them have high polymorphism and weak differentiation in most diagnostic morphological features. The species *A. sergievskiana* Schauo et Shmakov, *A. schauloi* Stepanov, *A. kuprijanovii* Stepanov included in *Achillea* aggr. *asiatica* are particularly difficult to diagnose. To distinguish them, molecular genetic methods were used with the allocation of informative ISSR primers. To detect DNA polymorphism, samples of the lower stem leaves were taken from 22 samples of *A. asiatica*; 5 samples of *A. kuprijanovii*, three samples of *A. sergievskiana* and *A. schauloi*. These species are characterized by different ecology of their growing places: *A. asiatica* — plain meadow species; *A. schauloi* — meadow-steppe species; *A. kuprijanovii* — medium mountain species (1100–1500 m above sea level); *A. sergievskiana* — a high-altitude species (1900–2200 m. Computer analysis of molecular genetic polymorphism of DNA showed a high degree of isolation of *A. sergievskiana* and *A. schauloi* and insufficient isolation of *A. kuprijanovii* from *A. asiatica*.

Keywords: Flora of Siberia, *Achillea* L., *Achillea sergievskiana* Schauo et Shmakov, *Achillea schauloi* Stepanov, *Achillea kuprijanovii* Stepanov, molecular genetic methods.

Кулемин Юрий Евгеньевич

Мл. научн. сотр., «Кузбасский ботанический сад»
Федерального исследовательского центра угля
и углехимии СО РАН, г. Кемерово
kulemin_y@mail.ru

Куприянов Андрей Николаевич

Д-р биол. наук, профессор, «Кузбасский
ботанический сад» Федерального исследовательского
центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово
kupr-42@yandex.ru

Аннотация. Во флоре Сибири насчитывается 12 видов рода *Achillea* L. Многие из них обладают высокой полиморфностью и слабой разграниченностью по большинству диагностических морфологических признаков. Особенно сложно диагностируются виды *A. sergievskiana* Schauo et Shmakov, *A. schauloi* Stepanov, *A. kuprijanovii* Stepanov, входящие в *Achillea* aggr. *Asiatica*. Для их разграничения применены молекулярно-генетические методы с выделением информативных ISSR-праймеров. Для выявления полиморфизма ДНК были отобраны образцы нижних стеблевых листьев у 22 образцов *A. asiatica*; 5 образцов *A. kuprijanovii*, по три образца *A. sergievskiana*, *A. schauloi*. Эти виды характеризуются различной экологией мест произрастания: *A. asiatica* — равнинный луговой вид; *A. schauloi* — лугово-степной вид; *A. kuprijanovii* — среднегорный вид (1100–1500 м. над у.м.); *A. sergievskiana* — высокогорный вид (1900–2200 м. над у. м.). Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК показал высокую степень обособленности *A. sergievskiana*, и *A. schauloi* и недостаточную обособленность *A. kuprijanovii* от *A. asiatica*.

Ключевые слова: Флора Сибири, *Achillea* L., *Achillea sergievskiana* Schauo et Shmakov, *Achillea schauloi* Stepanov, *Achillea kuprijanovii* Stepanov, молекулярно-генетические методы.

Введение

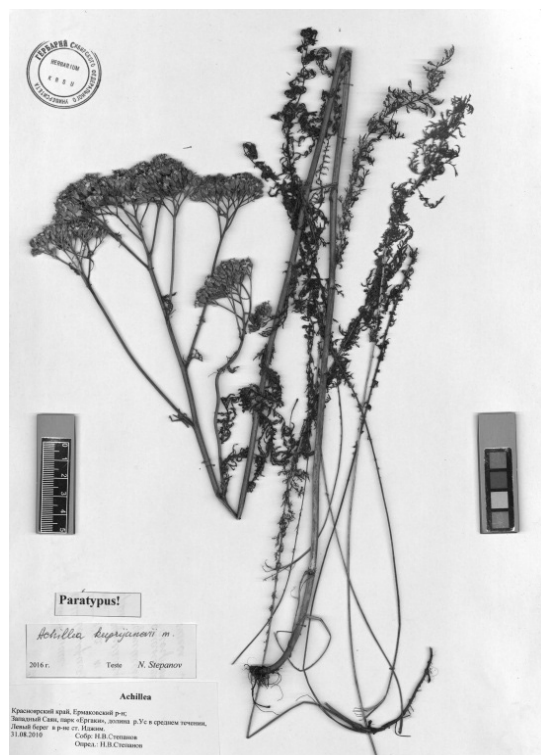
Род *Achillea* L. содержит около 150 видов, произрастающих в странах северного полушария; наиболее многочисленны в странах Европы, Средней Азии и в Северной Америке [1–3].

Первое номенклатурное описание рода *Achillea* в современном его понимании было дано К. Линнеем

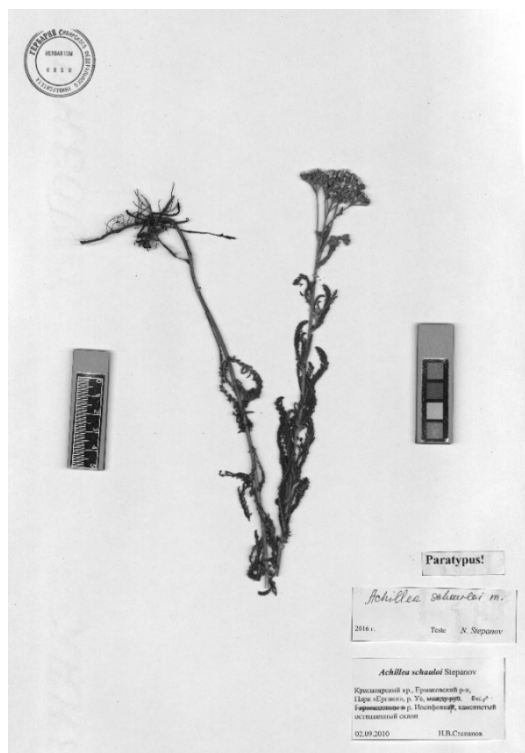
[4: 867–872]. Он включил в состав рода девятнадцать видов. Для разграничения видов К. Линней использовал морфологические показатели, которые используются и в настоящее время: форму листовых пластинок, её расчленение, опушение листа и его симметричность, характер окончания листа и форму сегментов листа или его зубцов. Изначально первые сведения о видах *Achillea* L. Сибири привел К. Ледебур [5] во флоре Алтая. Он приводит описание 3 видов (без видов рода *Ptarmica*): *A.*



А



Б



В



Г

Рис. 1. Типы изученных видов: А — *A. asiatica* Serg.: А.— голотип; Б — *A. kuprijanovii* Stepanov — паратип; В — *A. schauloi* Stepanov — паратип; С — *A. sergievskiana* Schaulo et Shmakov — голотип.

Таблица 1. Места отбора проб для проведения молекулярно-генетического анализа

№№	Образцы
<i>Achillea asiatica</i> Serg.	
103	Красноярский край, Казачинский р-он, село Вороновка, мельничный бугор, 10.08.2016
104	Красноярский край, Ирбейский район, д. Юдино. На лесных полянах и опушках. 25.07.2014
191	Окр. г. Барнаул, пос. Южный, окр. ЮСБС. 53.2050°с.ш 83°46'27" в.д. 28.09.21
193	Кемеровская обл., Новокузнецкий р-он, Подкатунская грива, 58,218908° с.ш. 87.25119° в.д. 02.07.21.
198	Кемеровская обл., Тисульский р-он, придорожный водоем, возле пос. Городок 55.62155°с.ш. 88.38589° в.д. 09.08.21.
205	Окр. г. Кемерово, Серебряный Бор, сосновый лес, 55,2115°с.ш. 86,0523° в.д. 25.07.21
210	Красноярский край, Ермаковский р-он, окр. пос. Танзыбей. 53.14152°с.ш. 92,94696° в.д. луга. 27.07.21.
211	Красноярский край, Новоселовский р-н, окр. пос. Новоселово, 55,0059°с.ш. 90,5812° в.д., берег водохранилища. 26.07.21
214	Хакасия, окр. пос. Карчалык, березовый лес, 54,50312° с.ш. 90,86097° в.д., 452 м над у.м. 27.07.2021.
224	Красноярский край, Новоселовский р-н, окр. пос. Новоселово, 55,0059°с.ш. 90,5812° в.д., берег водохранилища. 26.07.21
225	Якутия, склон сопки с редкими лиственницами. 62,29943° с.ш. 129.82518° в.д. 14.07.2021.
237	Якутия, склон сопки с редкими лиственницами. 62,29943° с.ш. 129.82518° в.д. 14.07.2021.
238	Якутия, Булгуннях-бугор, образованный мерзлотным вспучиванием, 6–7 м поросший редкими лиственницами, между которыми солонцы и даже солончаки. 62,44489°с.ш. 129,77862° в.д., 196 м над у.м. 14.07.21.
240	Кемеровская обл., Яйский р-он, с. Улановка, березовый лес, 53,44267° с.ш. 86,16421° в.д. 23.08.2021
241	Кемеровская обл., Кемеровский р-он, окр. с. Сухая речка, 55,23915° с.ш. 86,13303° в.д. 26.08.21
242	Томская обл., Асиновский р-он, окр. с. Больше-Дорохово, пойма р. Кия, берег. 56.38021°с.ш. 86,20470°в.д. 19.08.2021.
243	Томская обл., Зырянский р-он, окр. с. Чердаты, пойма р. Чулым, луг. 56,93864° с.ш. 86,90219° в.д. 20.08.21
244	Томская обл., Зырянский р-он, окр. с. Чердаты, пойма р. Чулым, 56,95430° с.ш. 86,89107° в.д. 20.08.21
245	Томская обл., Асиновский р-он, окр.с. Больше-Дорохово, пойма р. Кия, берег. 56.38021°с.ш. 86,20470°в.д. 19.08.2021.
246	Томская обл., окр. с. Чумашкино, покос. 14.08.2021
<i>Achillea kuprijanovii</i> Stepanov	
1	Красноярский край, природный парк «Ергаки», админист. корпус. 52,5000° с.ш. 093,2100° в.д. 09.09.2019.
5	Тыва, заповедник «Азас», возле избы, лиственнич в верх. реки Туланогин. 50,79317° с.ш. 094.51775° в.д., 1735 м над у.м. 07.09.2019.
21	Красноярский край, природный парк «Ергаки», 52,5000° с.ш. 093,2100° в.д. 09.09.2019.
22	Красноярский край, природный парк «Ергаки», возле админист. корпуса 52,5000° с.ш. 093,2100° в.д. 09.09.2019.
23	Тыва, заповедник «Азас», ерниковая тундра с разреженными лиственничком, верх. реки Туланогин. 50.79317° с.ш. 094.51775° в.д., 1735 м над у.м. 07.09.19.
<i>Achillea schauloi</i> Stepanov	
102	Красноярский край, Ермаковский р-н, парк Ергаки, р. Ус, м/у руч. Герасимовым и р. Иосифовкой, каменистый остепненный склон. 02.09.2010
120	Хакасия, Бейский р-он, близ деревни Бея, луг. 25.06.1983
134	Красноярский край, Ирбейский р-он, д. Юдино. На лесных полянах и опушках. 25.07.2014.
<i>Achillea sergievskiana</i> Shaulo & Shmakov	
105	Красноярский край, Ермаковский р-он, парк Ергаки, верховья р. Ус, окр. Черного озера, субальпийский низкотравный луг. 12.08.2020
135	Тува, Джун-Хемчинский район, северный склон, «Танну-Ола», опушка лиственного леса, h=1440 м над у.м. 30.06.1947
139	Якутская ССР, пойма реки Пеледуй (левый приток Лены) в высоком овраге. 24.06.1947.
159	Северо-западное побережье оз. Байкал, «Черная падь», луг, 08.07.1958.

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных в ISSR-PCR

Название	Последовательность (5'->3')	Кол-во амплифицированных фрагментов
17898A	(CA) ₆ AC	11
17898B	(CA) ₆ GT	13
17899A	(CA) ₆ AG	10
17899B	(CA) ₆ GG	10

	17898A_1	17898A_2	17898A_3	17898A_4	17898A_5	17898A_6	17898A_7	17898A_8	17898A_9	17898A_10	17898A_11	178988_1	178988_2	178988_3	178988_4
serg-105	+	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
serg-135	+	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
serg-159	+	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
schau-102	□	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
schau-120	□	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
schau-134	□	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
kupr-1	×	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
kupr-5	×	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
kupr-21	×	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
kupr-22	×	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
kupr-23	×	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
as-242	●	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-237	●	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
as-238	●	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-240	●	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
as-244	●	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
as-243	●	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
as-203	●	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
as-211	●	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
as-224	●	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-225	●	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
as-193	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-191	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
as-164	●	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-163	●	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-250	●	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-249	●	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
as-246	●	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
as-245	●	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
as-241	●	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
as-214	●	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
as-210	●	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
as-205	●	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
as-198	●	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Рис. 2. Фрагмент матрицы построенной в программе PAST 4.08.

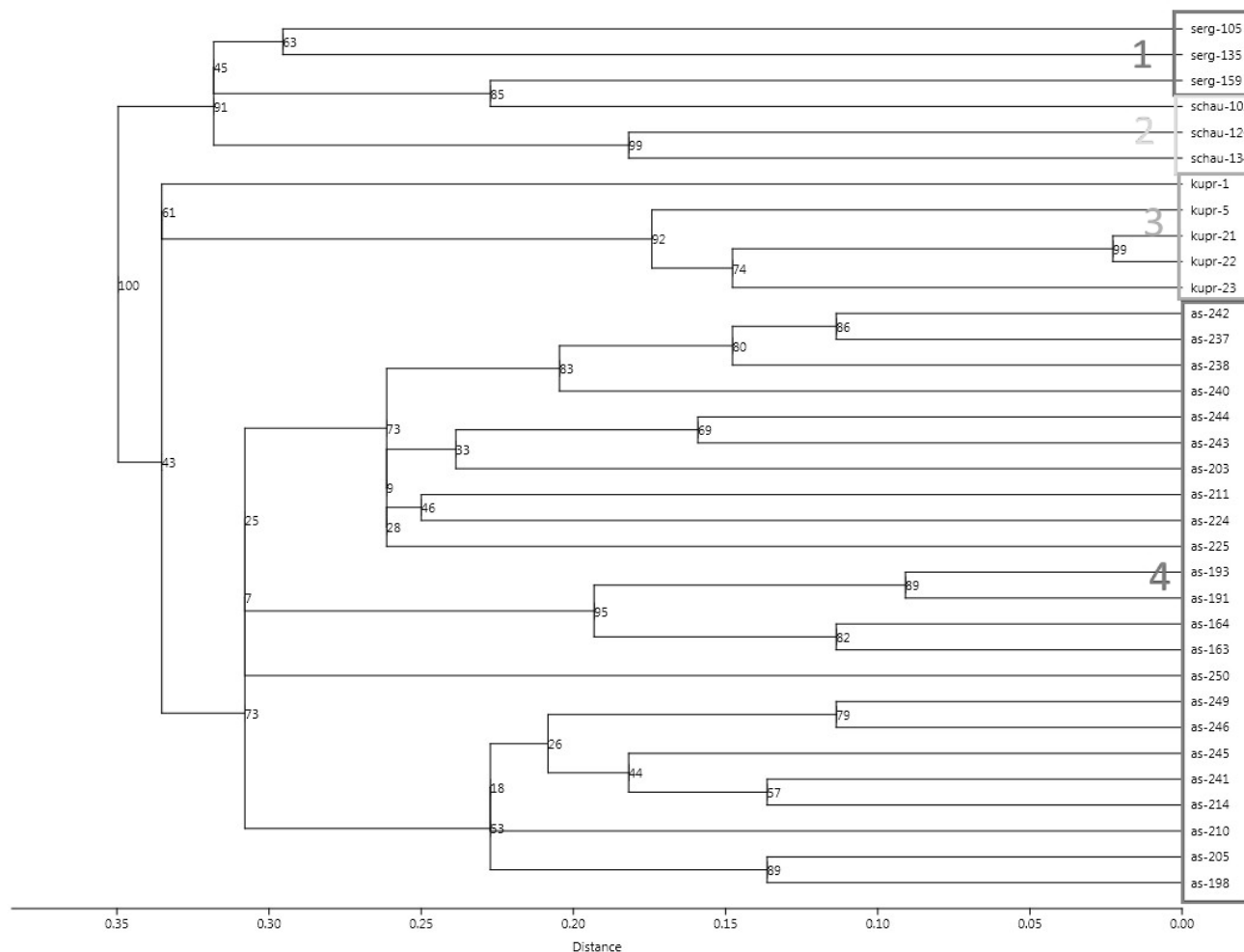


Рис. 3. UPGMA дендрограмма построенная на основе ISSR данных для видов *A. sergievskiana* Schaulo et Shmakov (1), *A. schauloi* Stepanov (2), *A. kuprijanovii* Stepanov (3) и *A. asiatica* Serg. (4) с использованием коэффициента Gower.

millefolium L., *A. magna* L. и *A. nobilis* L. Д.Н. Шауло [6] во «Флоре Сибири» для территории Сибири приводит 5 видов: *A. asiatica*, *A. millefolium*, *A. nobilis*, добавляя европейский вид *A. inundata* Kondr. и аркто-полярный *A. nigrescens* (E. Mey.) Rydb. В Конспекте флоры Азиатской России [7] В.В. Зуев приводит 8 видов, относящихся к трем секциям: Sect. *Micranthae* Klok. et Krytzka: *A. micrantha* Willd., *A. biebersteinii* Afan.; Sect. *Nobilia* Klok. et Krytzka: *A. nobilis* L.; Sect. *Millefolium* (Mill.) Koch: *A. asiatica* Serg., *A. inundata* Kondr., *A. millefolium* L., *A. nigrescens* (E. Mey) Rydb., *A. schmakovii* A. Kuprijanov, *A. setacea* Waldst. et Kit. В последнее десятилетие описано четыре вида: *A. kuprijanovii* Stepanov, *A. schauloi* Stepanov, *A. sergievskiana* Schaulo et Shmakov, *A. jennisseensis* Stepanov

Виды рода *Achillea* L., особенно секции *Millefolium* (Mill.) Koch, обладают высокой полиморфностью, а также слабой разграниченностью по большинству диагностических морфологических признаков [8]. Особенно сложно диагностируются виды *A. sergievskiana*, *A. schauloi*, *A. kuprijanovii*, входящие в *Achillea* aggr. *asiatica*. Целью данного сообщения является использование молекулярно-генетических маркеров для выявления внутривидового генетического разнообразия близкородственных видов.

Объекты и методы исследования

Для выявления полиморфизма ДНК рода *Achillea* были отобраны образцы нижних стеблевых листьев

у 22 образцов *A. asiatica*; 5 образцов *A. kuprijanovii*, по три образца *A. sergievskiana*, *A. schauloi*, которые характеризуют распространение видов на территории Сибири (табл. 1). Эти виды характеризуются не только морфологическими признаками, но также экологией мест произрастания: *A. asiatica* — равнинный луговой вид; *A. schauloi* — лугово-степной вид по склонам каменистых сопок; *A. kuprijanovii* — среднегорный вид, обитающий в пределах 1100–1500 м. над у.м.; *A. sergievskiana* — высокогорный вид, обитающий в пределах 1900–2200 м. над у.м.

Для выявления полиморфизма ДНК рода *Achillea* был произведен выбор наиболее информативных ISSR-праймеров производства компании «СИНТОЛ», Москва. Для этого было протестировано 32 ISSR-праймера, из которых четыре показали наилучшие результаты для дальнейшего анализа (табл. 2). Каждый праймер индивидуально анализировали с помощью ПЦП на использовании ISSR-метода с геномной ДНК.

Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле и 0,5 М ТАЕ-буфере в присутствии бромистого этидия при 80 В в течение 2,0 часов в горизонтальной электрофорезной камере Sub Cell GTSytem (Bio-Rad, США) [9]. После электрофореза гели были сфотографированы в системе гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США). Для компьютерной обработки полученные результаты были представлены в виде матрицы бинарных данных. ISSR-профили анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле (Рис. 2). Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью компьютерных программ PAST 4.08. Для построения филогенетических деревьев на основе данных фрагментного анализа использовали UPGMA-метод [10].

В изученных образцах было выявлено 74 амплифицированных фрагментов ДНК. Число фрагментов ДНК в общей выборке растений варьирует от 10 (17899А,

17899В) до 13 (17898В). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 11 фрагментов ДНК.

Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании данных ISSR-маркеров оказался достаточно информативным методом, благодаря которому удалось различить близкородственные виды рода *Achillea* и построить дендрограмму генетического сходства исследуемого материала (Рис. 3).

Кластерный анализ (UPGMA) выявил несколько основных групп. В первую группу вошли образцы *A. sergievskiana* Schaulo et Shmakov, во вторую *A. schauloi* Stepanov, третью и четвертую составили *A. kuprijanovii* Stepanov и *A. asiatica* Serg. Хотя величина бутстреп поддержек в некоторых случаях получилась низкой, для поставленных нами целей это не имеет значения. На дереве выделяются те же клады, что и при разграничении по морфологическим исследованиям.

Интересный случай встречается в группах с видами *A. sergievskiana* (образец № 159) и *A. schauloi* (образец № 102), они находятся в одной кладе, имея высокую бутстреп поддержку (индекс бутстреп равен 85%). Возможной причиной этого является неверное изначальное определение вида, которое при генетическом исследовании дал такой артефакт.

A. kuprijanovii Stepanov и *A. asiatica* Serg. располагаются в одной кладе, данные виды являются более близкими по морфологическим признакам, что подтверждает генетический анализ. *A. kuprijanovii* отличается от *A. asiatica* широко расположенными долями первого порядка, узкими линейными конечными долями с крупными шипами [11].

Таким образом, применение новых молекулярно-генетических методов диагностики, позволяет решить такие проблемы, в которых требуется более точная идентификация видов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цвелев Н.Н. *Achillea L.* // Флора европейской части СССР. СПб.: Наука, 1994. Т. 7. С. 117–12
2. Anderberg A.A., Baldwin B.G., Bayer R.G. [et al.]. *Compositae // The families and genera of vascular plants. Vol. VIII. Flowering plants. Eudicots. Asterales.* — edited by K. Kubitzki; volume editors J.W. Kadereit and C. Jeffrey. Berlin: Springer, 2007. P. 61–588.
3. Ehrendorfer F., Guo Y.P. Changes in the circumscription of the genus *Achillea* (Compositae-Anthemideae) and its subdivision // *Willdenowia* 35(1). 2005. P. 49–54.
4. Linne C. *Species Plantarum: in 9 v. 1753. 1 v.* P. 867–872.
5. Ledebour C.F. *Flora Altaica: T IV.* Beroline. 1833. P. 334.
6. Шауло Д.Н. *Achillea L.* // Флора Сибири. Новосибирск: «Наука», Т. 13. С. 65–70.
7. Зуев В.В. *Asteraceae // Конспект флоры Азиатской России. Сосудистые растения / под ред. К.С. Байкова.* Новосибирск. 2012. С. 302–360.
8. Борский М.Н. Внутривидовая систематика и полиморфизм *Achillea millefolium L.* // Актуальные проблемы биологической и химической экологии. М. 2014. С. 9–14.

9. Rohlf F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis systems // Exeter Software, Applied Biostatistics. New York. 1992. 225 p.
10. Miller M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.
11. Степанов Н.В. Разнообразие тысячелистников (род *Achillea* L. — Asteraceae) в Приенисейских Саянах // Вестник КрасГАУ, 2016, 6 (117). С. 31–38.

© Кулемин Юрий Евгеньевич (kulemin_y@mail.ru), Куприянов Андрей Николаевич (kupr-42@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



г. Кемерово