

Идентификация видов рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) на основе нуклеотидной изменчивости ядерной рибосомной ДНК

Т.А. Полякова¹✉, Е.В. Банаев²✉, М.А. Томошевич²

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tat-polyakova@yandex.ru; alnus2005@mail.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ внутригеномного полиморфизма последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 ядерной рибосомной ДНК у 33 образцов, принадлежащих трем видам *Nitraria* – *N. schoberi*, *N. sibirica*, *N. komarovii*. Выявлена нуклеотидная изменчивость региона ITS у изученных видов *Nitraria* в виде однонуклеотидных замен (преимущественно транзиции) и однонуклеотидной делеции. Сведения о нуклеотидной изменчивости фрагментов приводятся впервые нами. Регион ITS1-5.8S-ITS2 у изученных видов *Nitraria* содержит 17 филогенетически информативных однонуклеотидных замен. В межгеномном спейсере ITS1 выявлено 11 однонуклеотидных замен – транзиции (C/T). Спейсер ITS2 содержит 273–274 п. н. и отличается большей консервативностью. Всего в ITS2 у изученных образцов выявлено пять филогенетически информативных однонуклеотидных замен (четыре транзиции: C/T, G/A, одна трансверсия: G/C), одна однонуклеотидная делеция (T/–). Среднее значение содержания G+C составляет 61.5 %. Величина содержания GC-состава ниже у *N. sibirica* (59.2 %), чем у *N. schoberi* и *N. komarovii* (62.7 %). В сравнении с полноразмерным фрагментом ITS, более короткий ITS2 является подходящим молекулярным маркером, дискриминирующим виды, из-за низкой межвидовой изменчивости и одновременно выраженной внутривидовой вариабельности. Филогенетические ML и BI деревья, построенные как отдельно по спейсерам ITS1 и ITS2, так и отдельно по полноразмерному ITS-региону и спейсеру ITS2, оказались конгруэнтны. Полученные результаты по внутривидовой дифференциации *N. sibirica* позволяют выделить среди образцов этого вида два основных риботипа: основной сибирский *sibirica*-риботип и основной казахстанский *sibirica*-риботип. Географические особенности распространения риботипов *N. sibirica*, а также наличие существенных различий между основными сибирским и казахстанским *sibirica*-риботипами (три однонуклеотидные замены) свидетельствуют о существенных межпопуляционных различиях и таксономической неоднородности *N. sibirica*. Вероятнее всего, в настоящее время продолжают процессы гомогенизации рибосомной ДНК образцов *N. sibirica*, происхождение которых связано с гибридизацией и видообразованием. Ключевые слова: *Nitraria*; *N. schoberi*; *N. sibirica*; *N. komarovii*; генетическая изменчивость; таксономия; молекулярная идентификация; ITS; транзиция.

Для цитирования: Полякова Т.А., Банаев Е.В., Томошевич М.А. Идентификация видов рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) на основе нуклеотидной изменчивости ядерной рибосомной ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):481-488. DOI 10.18699/VJ20.640

Identification of species in the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on nucleotide variability of nuclear ribosomal DNA

T.A. Poliakova¹✉, E.V. Banaev²✉, M.A. Tomoshevich²

¹ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tat-polyakova@yandex.ru; alnus2005@mail.ru

Abstract. Intragenomic polymorphism of ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal DNA sequences was analysed in 33 samples belonging to the *Nitraria* species *N. schoberi*, *N. sibirica*, and *N. komarovii*. The nucleotide variability of the ITS region was detected in the *Nitraria* species as single-nucleotide substitutions (mainly transitions) and single-nucleotide deletion. Information about the nucleotide variability of fragments is given for the first time by us. The ITS1-5.8S-ITS2 region contained 17 phylogenetically informative single-nucleotide polymorphisms. Eleven single-nucleotide substitutions (transitions, C/T) were detected in ITS1. The ITS2 spacer contained 273–274 bp and was more conservative. A total of 5 phylogenetically informative single-nucleotide polymorphisms (4 transitions: C/T, G/A, one transversion: G/C), one single-nucleotide deletion (T/–) were detected in ITS2. The average GC content was 61.5 %. The GC content was lower in *N. sibirica* (59.2 %) than in *N. schoberi* and *N. komarovii* (62.7 %). It has been shown that the shorter ITS2 is a suitable molecular marker separating these species, due to the low interspecific variability and simultaneous available intraspecific variability. Phylogenetic ML and BI trees constructed separately for the ITS1 and ITS2 spacers, as well as separately for the full-size ITS region and the ITS2 spacer, were congruent. The results obtained on the intraspecific differentiation of *N. sibirica* revealed two main ribotypes among the samples of this species: the main Siberian *sibirica*-ribotype and the

main Kazakh *sibirica*-ribotype. Geographical features of the distribution of *N. sibirica* ribotypes, as well as the presence of significant differences between the main Siberian and Kazakh *sibirica*-ribotypes (3 single-nucleotide substitutions) indicated significant inter-population differences and taxonomic heterogeneity of *N. sibirica*. Most likely, the processes of homogenization of nuclear ribosomal DNA of *N. sibirica* samples, the origin of which is associated with hybridization and speciation, are currently continuing.

Key words: *Nitraria*; *N. schoberi*; *N. sibirica*; *N. komarovii*; genetic variability; taxonomy; molecular identification; ITS; transition.

For citation: Poliakova T.A., Banaev E.V., Tomoshevich M.A. Identification of species in the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on nucleotide variability of nuclear ribosomal DNA. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):481-488. DOI 10.18699/VJ20.640

Введение

В настоящее время молекулярный подход становится общим аспектом таксономических исследований растений на различных уровнях. Наиболее перспективными последовательностями ДНК для идентификации (в том числе молекулярной) таксонов растений являются некодируемые участки внутренних транскрибируемых спейсеров ITS (internal transcribed spacers; ITS1, ITS2) ядерных рибосомных генов (CBOL, 2009; Шнеер, Родионов, 2018). Ядерные участки ITS1 и ITS2, наряду с другими фрагментами ДНК, признаны стандартными ДНК-штрихкодами (Hollingsworth, 2011; Li et al., 2011; Шнеер, Родионов, 2018). Точная идентификация растительных организмов установлена в 80 % случаев с использованием только ITS-маркера, что существенно выше общепринятых используемых локусов (Bolson et al., 2015). Несмотря на ограничения ITS, которые заключаются в наличии одновременно нескольких тысяч копий последовательностей, в том числе располагающихся на разных хромосомах (Song et al., 2012; Родионов и др., 2016), локус ITS признается наиболее значимым в исследованиях по молекулярной систематике близкородственных таксонов. Показана как высокая результативность целого региона ITS в идентификации видов, например для родов *Spiraea* (Полякова и др., 2015), *Uncaria* (Zhang et al., 2015), *Artemisia* (Wang et al., 2016), так и высокая эффективность отдельного спейсера ITS2 (Gao et al., 2010; Ren et al., 2010; Zhang et al., 2015; Feng et al., 2016). Успех использования спейсеров ITS связан, прежде всего, с эффективной амплификацией, оптимальным размером ампликонов для секвенирования и приемлемым для межвидовых сравнений уровнем дивергенции (Шнеер, 2009; Родионов и др., 2016). Показано, что дивергенция района ITS, как правило, коррелирует с направлением и темпами морфологического видообразования (Шнеер, 2009; Song et al., 2012; Родионов и др., 2016).

Виды рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) являются уникальным объектом для исследования путей и механизмов дивергенции благодаря полиморфизму биологических признаков и древности происхождения. Большинство видов слабо морфологически дифференцированы, поэтому крайние варианты фенотипических различий принимаются систематиками за отдельные виды, внутривидовые формы или экологические расы (Банаев и др., 2015; Kovtonyuk et al., 2019; Tomoshevich et al., 2019). Отдельный интерес представляют самые широко распространенные и полиморфные виды: *N. schoberi* L. и *N. sibirica* Pall. Эти виды не всегда удается различить, особенно затруднены определения гербарных образцов (Пешкова, 1996; Коропачинский, 2016).

Попытки разрешить таксономию сибирских видов рода *Nitraria* были предприняты на основе кариологических (Муратова и др., 2013; Banaev et al., 2018), фитохимических (Банаев и др., 2015) и морфологических (Банаев и др., 2017) признаков, однако молекулярные маркеры имеют ряд преимуществ перед ними, демонстрируя достоверные различия на генетическом уровне без участия факторов окружающей среды. Несмотря на то что секвенирование фрагментов ДНК остается до сих пор дорогостоящим методом анализа, оно дает не только точные, но и высокоинформативные данные об изменчивости геномов организмов.

Целью нашей работы был сравнительный анализ нуклеотидной изменчивости региона ITS и выявление его значимости в таксономии видов рода *Nitraria*.

Материал и методы

Материал для исследования был собран в 2011–2017 гг. в 19 популяциях *N. sibirica*, 12 популяциях *N. schoberi* и 2 популяциях *N. komarovii* Iljin & Lava ex Bobrov на территории России (Алтайский край, Новосибирская область, Республики Крым, Хакасия, Тыва), Казахстана, Таджикистана (табл. 1). Гербарные образцы хранятся в Гербарии лаборатории дендрологии Центрального сибирского ботанического сада СО РАН и NSK Collection (Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) and Digital Herbarium CSBG SB RAS (<http://herb.csbg.nsc.ru:8081>).

Выделение геномной ДНК, ПЦР-амплификация, секвенирование. ДНК выделяли из высушенных листьев по стандартным методикам для растительных тканей с применением СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990). Концентрацию и количество ДНК оценивали в 0.8 % агарозном геле, а также на спектрофотометре NanoPhotometer P-Class (P-360, Implen).

Для амплификации последовательностей региона ITS, включающего межгенные спейсеры ITS1, ITS2 и ген 5.8S, использовали праймеры ITS6 (5'-tcgtaacaaggtttccgtagg tga-3') и ITS9 (5'-ccgcttattgatatgcttaaac-3'), разработанные для восточноазиатских видов трибы Spiraeae (Potter et al., 2007) и синтезированные в ЗАО «Евроген» (Москва). Для ПЦР применяли готовый набор реагентов GenePak® PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Москва). Цикл амплификации включал: первичную элонгацию при 95 °C в течение 5 мин, денатурацию при 94 °C 1 мин, отжиг праймеров при 58 °C в течение 50 с и элонгацию при 72 °C 1 мин с числом циклов 30, финальную элонгацию при 72 °C в течение 5 мин. Качество полученных ПЦР-фрагментов проверяли в 1.5 % агарозном геле и очищали набором реагентов для быстрой элюции ДНК из агарозных

Таблица 1. Однонуклеотидные замены и однонуклеотидная делеция/инсерция в ITS2 у видов *Nitraria*

| Вид, образец | Происхождение | Риботип | Позиция с переменным нуклеотидом | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|---------|----------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 33 | 81 | 140 | 158 | 207 | 217 |
| <i>N. schoberi</i> Krim | Крым | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Kaspil | Казахстан | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Kulunda | Алтайский край | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Malinovie | » | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Bagan | Новосибирская область | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Koktal | Казахстан | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Balhash | » | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Aidarli | » | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Raz'ezd 47 | » | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Pyandzh | Таджикистан | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Sariozek | Казахстан | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. schoberi</i> Lepsi* | » | H6 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. komarovii</i> Balhash 1 | » | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. komarovii</i> Balhash 2 | » | H1 | G | C | A | G | C | – |
| <i>N. sibirica</i> Bele | Хакасия | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Kulunda | Алтайский край | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Rubtsovsk | » | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Noven'koe | » | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Veseloyarsk | » | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Balansor | » | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Kuchuk | » | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Shara-Nur | Тыва | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Koktal | Казахстан | H2 | A | C | A | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Karatal | » | H3 | A | T | G | C | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Balhash | » | H3 | A | T | G | C | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Kurgan | » | H3 | A | T | G | C | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Kainar | » | H3 | A | T | G | C | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Basshi | » | H3 | A | T | G | C | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Dzhira | Алтайский край | H4 | A | C | G | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Gornyak | » | H4 | A | C | G | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Bahar | Казахстан | H4 | A | C | G | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Raz'ezd 47 | » | H5 | A | T | G | G | T | T |
| <i>N. sibirica</i> Kurti** | » | H7 | A | T | G | C | T | T |

Примечание. Образец имеет уникальную замену: * в позиции 71; ** в позиции 201. Прочерк – однонуклеотидная делеция.

гелей Diatom DNA Elution (ООО «Лаборатория Изоген»). Секвенирование фрагментов проводили в обоих направлениях в ЗАО «Евроген».

Анализ данных. Сиквенсы были попарно выравнены в программе BioEdit v.7.1.9 (Hall, 1999), множественное выравнивание выполнено в программе ClustalW2 с последующей проверкой неоднозначных позиций на хроматограммах и редактированием вручную. Анализ выравненных последовательностей, подбор модели нуклеотидных замен, а также эволюционные построения

выполнены в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) на основе байесовского информационного критерия BIC (Guindon, Gascuel, 2003; Darriga et al., 2012). Эволюционные дистанции получены методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) с использованием 3-параметрической модели Тамура (Tamura, 1992), консенсусное ML дерево построено с бутстреп-поддержкой в 1000 репликаций (Felsenstein, 1985). Эволюционные построения выполнены также в программе MrBayes (BI), версия v.3.2.6 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al.,

Таблица 2. Содержание GC-состава (%) в последовательностях ITS-региона у видов *Nitraria*

| Вид | ITS1 | | ITS2 | | ITS | | G+C среднее |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|-------------|
| | G | C | G | C | G | C | |
| <i>N. schoberi</i> | 24.8 | 39.3 | 31.7 | 31.7 | 27.8 | 32.9 | 62.7 |
| <i>N. komarovii</i> | 24.8 | 39.3 | 31.7 | 31.7 | 27.8 | 32.9 | 62.7 |
| <i>N. sibirica</i> | 24.8 | 31.7 | 31.4 | 31.4 | 27.6 | 30.7 | 59.2 |

2012) на основе типа эволюционной модели – GTR с гамма-распределением для аппроксимации скорости замены нуклеотидов. Установленные параметры MCMC цепи: число поколений – 10000000 с частотой сэмпирования каждое тысячное поколение. ВІ деревья визуализированы в программе FigTree версии v. 1.4.3. В качестве внешней группы использован вид *Peganum harmala* L. (GenBank NCBI: KX282320), близкородственный роду *Nitraria*. Границы спейсера ITS2 определены путем сопоставления полученных нами последовательностей ITS с этими же фрагментами, депонированными в GenBank NCBI (*N. schoberi*: KP087771.1; *N. sibirica*: DQ267178.1).

Результаты и обсуждение

Для изучения генетической изменчивости фрагмента ITS проведен анализ 33 нуклеотидных последовательностей ITS *Nitraria*, принадлежащих трем видам – *N. schoberi*, *N. sibirica*, *N. komarovii*. Общая длина амплифицируемого фрагмента ITS после выравнивания составляет 577 п.н., из которых 558 п.н. консервативны, а 19 п.н. представляют собой полиморфные сайты или точечные мутации: 17 – филогенетически информативные, 2 – уникальные замены. Регион ITS видов рода *Nitraria* изучался ранее для решения вопросов филогении (Temirbayeva, Zhang, 2015), однако сведения о нуклеотидной изменчивости этих фрагментов приводятся впервые нами.

Регион ITS1-5.8S-ITS2 у изученных видов *Nitraria* содержит 17 однонуклеотидных замен (ОНЗ). В межгенном спейсере ITS1 выявлено 11 ОНЗ, все замены являются транзициями (С/Т). Ген 5.8S состоит из 157 п.н. и ожидается консервативен. Спейсер ITS2 содержит 273–274 п.н. и отличается большей консервативностью, чем ITS1. Всего в ITS2 у изученных образцов выявлено 5 филогенетически информативных ОНЗ (4 транзиции: С/Т, G/A, 1 трансверсия: G/C), 1 однонуклеотидная делеция/инсерция (Т/–), 2 уникальных замены (см. табл. 1). Среднее значение содержания G+C составляет 61.5 % и варьирует от 59.2 до 62.7 % (табл. 2). В целом величина содержания GC-состава ниже у *N. sibirica* (59.2 %), чем у *N. schoberi* и *N. komarovii* (62.7 %).

Все транзиции в ITS1 четко отделяют *N. sibirica* от видов *N. schoberi* и *N. komarovii*, при этом различий между *N. schoberi* и *N. komarovii* не выявлено; также в этой части генома у изученных образцов не наблюдается внутривидового полиморфизма. В ITS2 выявлены как видоспецифические полиморфизмы, отличающие *N. sibirica* от двух других видов, так и внутривидовая изменчивость образцов *N. sibirica*.

Известно, что спейсер ITS2 предлагается в качестве ДНК-баркода для идентификации растений (Feng et al.,

2016). В сравнении с полноразмерным фрагментом ITS, более короткий ITS2 является подходящим молекулярным маркером, дискриминирующим виды, из-за низкой межвидовой изменчивости и одновременно выраженной внутривидовой вариабельности. Полученные результаты показали, что межгенный спейсер ITS2 отличается у *N. sibirica* и *N. schoberi* и *N. komarovii* на 6 позиций (5 ОНЗ и 1 однонуклеотидная делеция/инсерция). Среднее генетическое расстояние (*p*-distance) между видами *N. schoberi* и *N. sibirica* по последовательностям ITS1 составляет 0.092, что сопоставимо с хорошо различимыми видами. Так, например, для подсекций и видов *Dendrobium* среднее значение *p*-distance, рассчитанное по региону ITS, варьирует от 0.069 до 0.112 (Srikulnath et al., 2015). Для *N. sibirica* и *N. schoberi* были выявлены также межвидовые различия по комплексу фенольных соединений (Банаев и др., 2015) и показана видоспецифичность метрических и качественных морфологических признаков (Банаев и др., 2017).

Филогенетические деревья, построенные как отдельно по спейсерам ITS1 и ITS2, так и отдельно по полноразмерному ITS-региону и спейсеру ITS2, оказались конгруэнтны. Полученные ML и ВІ филогенетические деревья имеют ветви с высокими бутстреп-индексами и в целом согласуются с морфологией и систематикой рода *Nitraria*. В то же время в ходе исследования филогении рода *Nitraria* на основе анализа объединенных данных последовательностей ITS и фрагментов хлоропластной ДНК (6 генов) (Temirbayeva, Zhang, 2015) виды *N. schoberi*, *N. sibirica* и *N. komarovii* сгруппировались в одну кладу вместе с австралийским видом *N. billardieri* DC. При этом более близко расположились *N. komarovii*, *N. billardieri* и *N. sibirica*.

В нашем исследовании сравнение топологий ML и ВІ деревьев (рис. 1 и 2) свидетельствует о сходстве *N. schoberi* и *N. komarovii* и о сложной внутривидовой дифференциации *N. sibirica*.

Виды *N. schoberi* и *N. komarovii*, имеющие одинаковые последовательности ITS, образуют одну отдельную кладу и, соответственно, один риботип – Н1 (см. табл. 1). Исключение составляет образец *N. schoberi* Lepsy из Казахстана, характеризующийся наличием уникальной замены в позиции 71 спейсера ITS2 (см. табл. 1).

Вид *N. sibirica* на ML дереве образует две субклады, а на ВІ дереве – три субклады. От образцов *N. schoberi* и *N. komarovii* один из риботипов (Н3) *N. sibirica* отличается шестью ОНЗ, что очевидно указывает на самостоятельный таксономический ранг этих популяций. Это же подтверждает и среднее межгрупповое генетическое расстояние, которое составляет 0.024 и одинаково как для группы Н1/Н2, так и для Н1/Н4. Риботипы Н2, Н3, Н4,

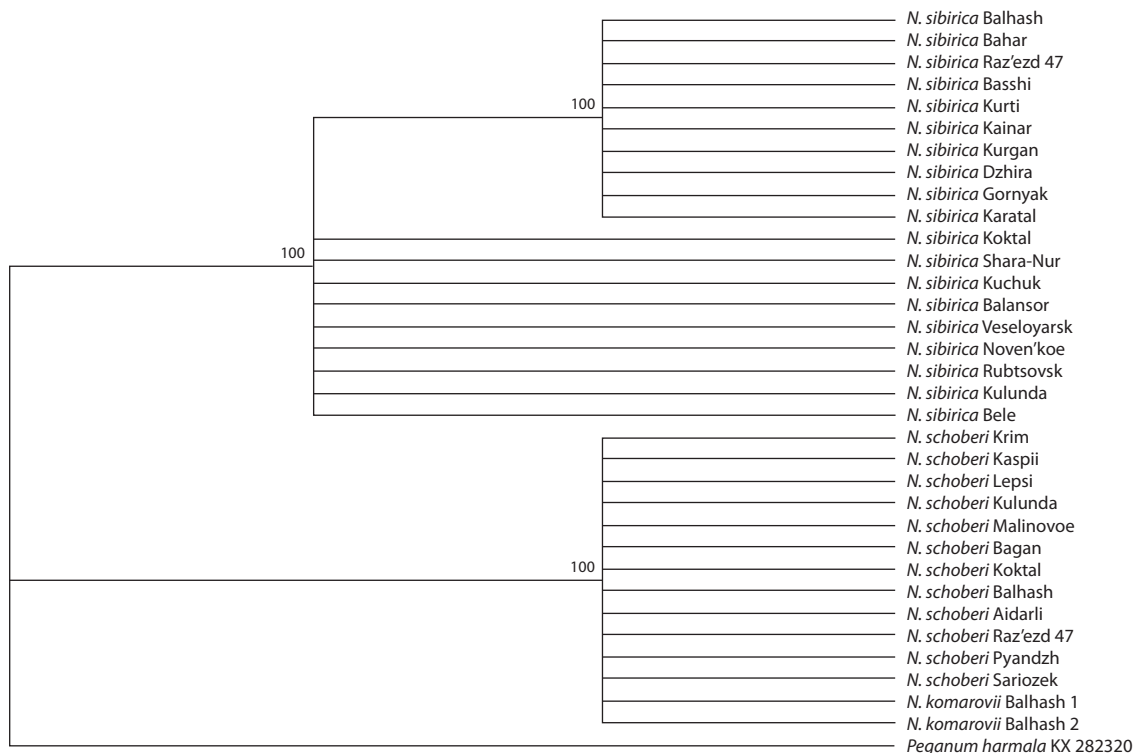


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения последовательностей спейсера ITS2 у образцов *Nitraria* методом максимального правдоподобия.

В ветвях указаны название вида и место сбора исследованного образца.

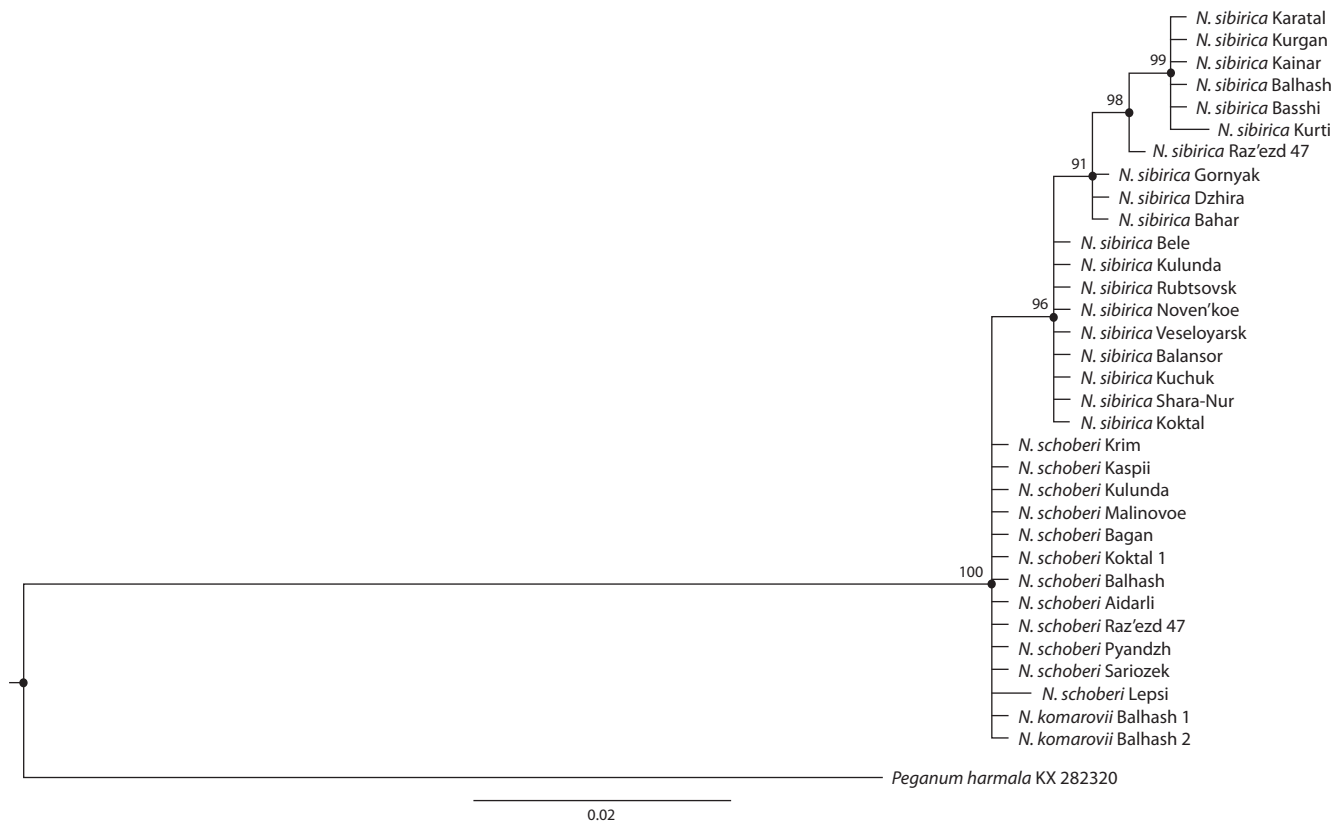


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения последовательностей спейсера ITS2 у образцов *Nitraria* байесовским (BI) методом.

В ветвях указаны название вида и место сбора исследованного образца.

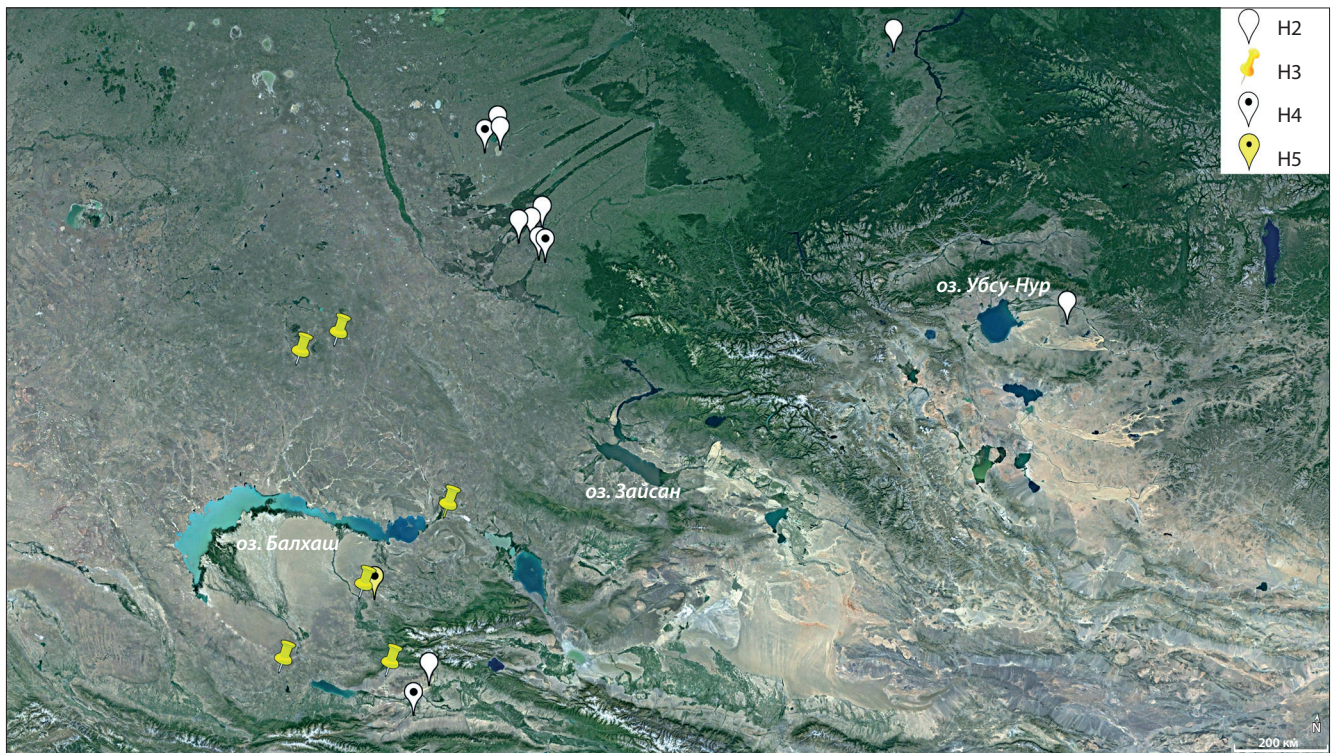


Рис. 3. Распространение риботипов *N. sibirica* (H2, H3, H4, H5).

принадлежащие *N. sibirica*, различаются между собой одной-тремя ОНЗ. Каждый из риботипов H5, H6, H7 имеет одну точечную мутацию.

Полученные результаты по внутривидовой дифференциации *N. sibirica* позволяют разделить образцы этого вида на два основных риботипа: основной сибирский *sibirica*-риботип (H2) и основной казахстанский *sibirica*-риботип (H3) (рис. 3).

Риботип H2 характерен для сибирских популяций *N. sibirica* – Алтайский край (Кулундинская степь), Хакасия и Тыва. Риботип H4, отличающийся одной однонуклеотидной заменой от основного сибирского *sibirica*-риботипа, тоже характерен для популяций, произрастающих преимущественно в Кулунде. Исключение составляют две популяции *N. sibirica* из Юго-Восточного Казахстана на границе с Китаем – Коктал и Бахар, где обнаружены сибирский *sibirica*-риботип (H2) и близкий к нему риботип H4.

Основной казахстанский *sibirica*-риботип (H3) распространен в Или-Балхашском регионе (бассейны рек Или, Каратал, Аягуз) и Казахском мелкосопочнике. Риботип H5, близкий к риботипу H3 (см. рис. 3), и риботип H7 (не приведен на рис. 3) обнаружены также в регионе распространения основного казахстанского *sibirica*-риботипа.

Географические особенности распространения риботипов *N. sibirica* и наличие существенных различий между основными сибирским и казахстанским *sibirica*-риботипами (три ОНЗ) свидетельствуют о существенных межпопуляционных различиях и таксономической неоднородности *N. sibirica*. Вероятнее всего, в настоящее время продолжаются процессы гомогенизации рибосомной ДНК образцов *N. sibirica*, происхождение которых связано с гибридизацией и видообразованием (Rauscher

et al., 2003; Xu et al., 2017; Ефимова и др., 2019). Более ранние исследования также показали, что популяции *N. sibirica* неоднородны и дифференцируются в отдельные группы согласно эколого-географическим особенностям и градиенту высоты над уровнем моря по комплексу фенольных соединений (Банаев и др., 2015).

Заключение

Полученные результаты сравнительного анализа нуклеотидной изменчивости региона ITS демонстрируют надежность спейсера ITS2 как молекулярно-генетического маркера в идентификации видов рода *Nitraria*. В случае сложной морфологической идентификации образцов *Nitraria* может быть достаточно проведения генетического анализа изменчивости короткого спейсера ITS2. Однако следует отметить, что регион ITS не всегда может полностью разрешить все таксономические вопросы. Так, в нашем исследовании виды *N. schoberi* и *N. komarovii* имеют идентичные последовательности ITS. Трудности в интерпретации полученных данных могут быть связаны и с множественными копиями ITS, являющимися паралогами или ортологами. Ответы на дальнейшие вопросы, связанные с таксономией и эволюцией видов рода *Nitraria*, можно получить выявлением этих гомологов путем клонирования фрагментов ITS, а также с привлечением дополнительных генетических маркеров хлоропластного генома. Кроме того, выявленные видоспецифические генетические полиморфизмы в регионе ITS у исследованных видов *Nitraria* позволят в дальнейшем подобрать рестриктазы и таким образом упростить и удешевить способ получения паттернов генетической изменчивости близкородственных таксонов *Nitraria*.

Список литературы / References

- Банаев Е.В., Воронкова М.С., Высочина Г.И., Томошевич М.А. Популяционная структура и дифференциация сибирских представителей рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) по составу и содержанию фенольных соединений в листьях. *Сиб. экол. журн.* 2015;6:890-898. DOI 10.15372/SEJ20150609.
- [Banaev E.V., Voronkova M.S., Vysochina G.I., Tomoshevich M.A. Population structure and differentiation of the Siberian representatives of the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on the composition and content of phenolic compounds in leaves. *Contemp. Probl. Ecol.* 2015;8(6):735-742. DOI 10.1134/S1995425515060025.]
- Банаев Е.В., Томошевич М.А., Ямтыров М.Б. Об изменчивости метрических и качественных признаков видов рода *Nitraria* L. в связи с эколого-климатическими условиями местообитаний Сибири. *Сиб. экол. журн.* 2017;6:746-757. DOI 10.15372/SEJ20170607.
- [Banaev E.V., Tomoshevich M.A., Yamtyrov M.B. Variability of metric and qualitative traits of *Nitraria* species in relation to ecological and climatic conditions of Siberian habitats. *Contemp. Probl. Ecol.* 2017;10(6):664-673. DOI 10.1134/S1995425517060038.]
- Ефимова А.П., Полякова Т.А., Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Политов Д.В. Морфологические и молекулярно-генетические свидетельства межвидового гибрида *Salix* × *zhataica* (Salicaceae) из Центральной Якутии. *Генетика.* 2019;55(5):524-530. DOI 10.1134/S0016675819050059.
- [Efimova A.P., Poliakova T.A., Belokon M.M., Belokon Y.S., Politov D.V. Morphological and molecular genetic verification of interspecific hybrid *Salix* × *zhataica* (Salicaceae) from Central Yakutia. *Russ. J. Genet.* 2019;55(5):551-556. DOI 10.1134/S1022795419050053.]
- Коропачинский И.Ю. Арборифлора Сибири. Новосибирск, 2016. [Koropachinskii I.Y. Tree Flora of Siberia. Novosibirsk, 2016. (in Russian)]
- Муратова Е.Н., Горячкина О.В., Банаев Е.В. Кариологическое изучение сибирских видов *Nitraria* L. (Nitrariaceae). *Turczaninowia.* 2013;16(4):50-54. DOI 10.14258/turczaninowia.16.4.9.
- [Muratova E.N., Goryachkina O.V., Banaev E.V. Karyological studies on Siberian species of *Nitraria* L. (Nitrariaceae). *Turczaninowia.* 2013;16(4):50-54. DOI 10.14258/turczaninowia.16.4.9. (in Russian)]
- Пешкова Г.А. Семейство Nitrariaceae – Селитрянковые. В: Флора Сибири. Новосибирск, 1996;10:34-35.
- [Peshkova G.A. Family Nitrariaceae. In: Flora of Siberia. Novosibirsk, 1996;10:34-35. (in Russian)]
- Полякова Т.А., Шатохина А.В., Ширманов М.В., Бондаренко Г.Н. Оценка таксономических отношений у сибирских представителей секции *Chamaedryon* Ser. рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) на основе анализа нуклеотидного полиморфизма ITS-региона. В: Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. науч. статей по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф., 25–29 мая 2015 года, г. Барнаул. Барнаул, 2015;353-358.
- [Polyakova T.A., Shatokhina A.V., Shirmanov M.V., Bondarenko G.N. Assessment of taxonomy relationships among the Siberian representatives of *Spiraea* L. (section *Chamaedryon* Ser., Rosaceae Juss.) based on the ITS sequence polymorphism. In: Problems of Botany of South Siberia and Mongolia: Proceedings of the 14th Scientific and Practical Conference, May 25–29, 2015, Barnaul. Barnaul, 2015;353-358. (in Russian)]
- Родионов А.В., Гнутиков А.А., Коцинин А.Р., Коцеруба В.В., Носов Н.Н., Пунина Е.О., Райко М.П., Тюпа Н.Б., Ким Е.С. Последовательность ITS1–5.8S рДНК–ITS2 в генах 35S рРНК как маркер при реконструкции филогении злаков (сем. Poaceae). *Успехи соврем. биологии.* 2016;136(5):419-437.
- [Rodionov A.V., Gnutikov A.A., Kotsinyan A.R., Kotscheruba V.V., Nosov N.N., Punina E.O., Raiko M.P., Tyupa N.B., Kim E.S. Sequence ITS1–5.8S rDNA–ITS2 in 35S rRNA genes as a marker in grass (Poaceae) molecular phylogeny. *Uspekhi Sovremennoy Biologii* = *Advances in Current Biology.* 2016;136(5):419-437. (in Russian)]
- Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений. *Генетика.* 2009;45(11):1436-1448.
- [Schneyer V.S. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russ. J. Genet.* 2009;45(11):1267-1278. DOI 10.1134/S1022795409110027.]
- Шнеер В.С., Родионов А.В. ДНК-штрихкоды растений. *Успехи соврем. биологии.* 2018;138(6):531-538. DOI 10.7868/S0042132418060017.
- [Schneyer V.S., Rodionov A.V. Plant DNA barcodes. *Uspekhi Sovremennoy Biologii* = *Advances in Current Biology.* 2018;138(6):531-538. DOI 10.7868/S0042132418060017. (in Russian)]
- Banaev E.V., Tomoshevich M.A., Ak-Lama T.A. Nitrariaceae. In: Marhold K., Breitwieser I. IAPT Chromosome Data 27. *Taxon.* 2018; 67(5):1042. DOI 10.12705/675.24.
- Bolson M., Smidt E.C., Brotto M.L., Silva-Pereira V. ITS and *trnH-psbA* as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143049. DOI 10.1371/journal.pone.0143049.
- CBOI Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106:12794-12797.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772. DOI 10.1038/nmeth.2109.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12:12-15.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783-791.
- Feng Sh., Jiang M., Shi Yu., Jiao K., Shen Ch., Lu J., Ying Q., Wang H. Application of the ribosomal DNA ITS2 region of *Physalis* (Solanaceae): DNA barcoding and phylogenetic study. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1047. DOI 10.3389/fpls.2016.01047.
- Gao T., Yao H., Song J., Zhu Y., Liu C., Chen S. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evol. Biol.* 2010;10:324. DOI 10.1186/1471-2148-10-324.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 1999;41:95-98.
- Hollingsworth P.M. Refining the DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(49):19451-19452. DOI 10.1073/pnas.1116812108.
- Guindon S., Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 2003;52: 696-704.
- Kovtonyuk N.K., Tomoshevich M.A., Banaev E.V. Typification of the name *Nitraria komarovii* (Nitrariaceae). *Bot. Pac.* 2019;8(2):115-118. DOI 10.17581/bp.2019.08210.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096.
- Li D.Z., Gao L.M., Li H.T., Wang H., Ge X.J., Liu J.Q., Chen Z.D., Zhou S.L., Chen S.L., Yang J.B., Fu C.X., Zeng C.X., Yan H.F., Zhu Y.J., Sun Y.S., Chen S.Y., Zhao L., Wang K., Yang T., Duan G.W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(49):19641-19646. DOI 10.1073/pnas.1104551108.
- Potter D., Still S.M., Grebenc T., Ballian D., Božič G., Franjčič J., Kraigher H. Phylogenetic relationships in tribe *Spiraeae* (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data. *Plant Syst. Evol.* 2007;266:105-118. DOI 10.1007/s00606-007-0544-z.
- Rauscher J.T., Doyle J.J., Brown A.H.D. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Gly-*

- cine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex. *Mol. Ecol.* 2003; 11(12):2691-2702. DOI 10.1046/j.1365-294X.2002.01640.x.
- Ren B.Q., Xiang X.G., Chen Z.D. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Mol. Ecol. Resour.* 2010;10(4):594-605. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02815.x.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19(12):1572-1574. DOI 10.1093/bioinformatics/btg180.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 2012;61(3):539-542. DOI 10.1093/sysbio/sys029.
- Song J., Shi L., Li D., Sun Y., Niu Yu., Chen Z., Luo H., Pang X., Sun Z., Liu Ch., Lv A., Deng Y., Larson-Rabin Z., Wilkinson M., Chen Sh. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *PLoS One.* 2012;7(8):e43971. DOI 10.1371/journal.pone.0043971.
- Srikulnath K., Sawasdichai S., Jantapanon T.K., Pongtongkam P., Peyachoknagul S. Phylogenetic relationship of *Dendrobium* species in Thailand inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *Hort. J.* 2015. DOI 10.2503/hortj.MI-028.
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 1992;9:678-687.
- Temirbayeva K., Zhang M.-L. Molecular phylogenetic and biogeographical analysis of *Nitraria* based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Plant Syst. Evol.* 2015;301:1897-1906. DOI 10.1007/s00606-015-1202-5.
- Tomoshevich M.A., Banaev E.V., Ak-Lama T.A. *Nitraria komarovii* Iljin & Lava ex Bobrov (Nitrariaceae), a new record for the flora of Kazakhstan. *Check List.* 2019;15(5):891-897. DOI 10.15560/15.5.891.
- Wang X.-Y., Zheng S.-H., Liu Y., Han J.-P. ITS2, a better DNA barcode than ITS in identification of species in *Artemisia* L. *Chin. Herb. Med.* 2016;8(4):352-358. DOI 10.1016/S1674-6384(16)60062-X.
- Xu B., Zeng X.-M., Gao X.-F., Jin D.-P., Zhang L.-B. ITS non-concerted evolution and rampant hybridization in the legume genus *Lespedeza* (Fabaceae). *Sci. Rep.* 2017;7:e40057. DOI 10.1038/srep40057.
- Zhang Zh.-L., Song M.-F., Guan Y.-H., Li H.-T., Niu Y.-F., Zhang L.-X., Ma X.-J. DNA barcoding in medicinal plants: testing the potential of a proposed barcoding marker for identification of *Uncaria* species from China. *Biochem. Syst. Ecol.* 2015;60:8-14. DOI 10.1016/j.bse.2015.02.017.

ORCID ID

T.A. Poliakova orcid.org/0000-0002-8258-127X
E.V. Banaev orcid.org/0000-0003-1314-8429
M.A. Tomoshevich orcid.org/0000-0002-0307-5919

Благодарности. Исследование выполнено в рамках проекта VI.52.1.2 «Анализ внутривидовой структуры ресурсных растений Азиатской России, отбор и сохранение генофонда» (номер государственной регистрации АААА-А17-117012610054-6) и по теме государственного задания «Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции» (№ 0112-2020-0001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.04.2020. После доработки 10.06.2020. Принята к публикации 29.06.2020.