


Внутри- и межвидовая изменчивость *Mentha arvensis* L. и *M. canadensis* L.

М.В. Семёнова , О.Л. Енина, О.В. Шелепова

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, Россия

 e-mail: lab-physiol@mail.ru

При идентификации представителей рода *Mentha* L. часто возникают сложности из-за значительного внутривидового полиморфизма, активной межвидовой гибридизации, а также изменений в пloidности растений. В настоящей работе предпринята попытка комплексного подхода к изучению различных параметров растений двух трудно разделяемых видов с перекрывающимися признаками: *Mentha arvensis* L. и *M. canadensis* L. Исследованы представители восьми географически разобщенных популяций *Mentha*, собранные в разных регионах: европейская часть, Хакасия и Дальний Восток России, Западная Украина и Индокитай. Изучены диагностические для этих видов морфологические признаки, состав компонентов эфирного масла и проведен фрагментный анализ ДНК с использованием ISSR-маркеров. Полученные данные обработаны статистически с помощью кластерного анализа, метода главных компонент и метода главных координат. По результатам анализа количественных характеристик чашечки и листьев четко разделяются европейская и азиатская группы образцов, а в определении принадлежности дальневосточных растений к той или иной группе есть расхождения при использовании разных методов обработки данных и, соответственно, затруднено определение их таксономического положения с использованием только морфологических признаков. По составу эфирного масла и ISSR-фрагментов выделена группа наиболее генетически, морфологически и фитохимически близких растений, в которую вошли представители популяций Московской, Владимирской, Калужской областей, Республики Коми и Хакасии. Все они относятся к виду *M. arvensis*. Растения, собранные в природной флоре Дальнего Востока, по компонентному составу эфирного масла и составу ISSR-фрагментов имели большее сходство с *M. arvensis* из европейской части, чем с коллекционными образцами из флоры Индокитая, которые, согласно полученным данным, относятся к *M. canadensis*. Комплексное изучение морфологических признаков растений, состава эфирного масла и фрагментного ISSR-анализа ДНК позволяет уточнить видовую принадлежность, а также оценить полиморфизм и степень родства между популяциями. Выявлена корреляция между данными молекулярно-генетического анализа и составом эфирного масла для растений *M. arvensis* и *M. canadensis* и, в некоторой степени, с морфологическими признаками растений.


Ключевые слова: *Mentha arvensis*; *Mentha canadensis*; полиморфизм; ДНК; ISSR; молекулярные маркеры; компонентный состав эфирного масла.

Для цитирования: Семёнова М.В., Енина О.Л., Шелепова О.В. Внутри- и межвидовая изменчивость *Mentha arvensis* L. и *M. canadensis* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):1067-1075. DOI 10.18699/VJ19.582

Intra- and interspecific variability of *Mentha arvensis* L. and *M. canadensis* L.

M.V. Semenova , O.L. Enina, O.V. Shelepova

Tsitsin Main Botanical Garden, RAS, Moscow, Russia

 e-mail: lab-physiol@mail.ru

The identification of plants of the genus *Mentha* is often difficult due to significant intraspecific polymorphism, intense interspecific hybridization, and ploidy changes. An attempt was made to apply an integrated approach to the study of different parameters of two species: *Mentha arvensis* L. and *M. canadensis* L. Eight geographically dispersed populations of *Mentha* in different regions (European Russia, Khakassia and Far East, Western Ukraine, and Indochina) were studied. Diagnostic morphological characters and compositions of essential oil components were examined, and DNA was analyzed with ISSR markers. The data obtained were statistically processed by cluster, principal component, and principal coordinate analyses. The European and Asian groups of samples were clearly distinguished by the analysis of quantitative parameters of the calyx and leaves, but different methods of data processing produced different results in determining the belonging of the Far Eastern plants to a particular group. Therefore, their taxonomic positions can hardly be determined on morphological grounds. According to the composition of essential oil and ISSR fragments, a group of the genetically, morphologically, and phytochemically closest plants was identified, which included representatives of the populations of the Moscow oblast, Vladimir oblast, Kaluga oblast, the Komi Republic, and Khakassia. All these plants belonged to *M. arvensis*. Plants collected in the natural flora of the Russian Far East showed a greater resemblance in essential oil composition and ISSR markers to the European group of *M. arvensis*.

than to plants from Indochina, which, according to the data obtained, belonged to *M. canadensis*. It was shown that a comprehensive study of plant morphological characters, the compositions of essential oil, and ISSR fragments allows one to clarify the species identity and to assess their polymorphism and the degree of kinship between populations. A certain correlation between the data of molecular analysis and the composition of essential oil and, to a lesser extent, their correlation with morphological characters of plants was revealed.

Key words: *Mentha arvensis*; *Mentha canadensis*; polymorphism; DNA; ISSR; molecular markers; composition of essential oil.

For citation: Semenova M.V., Enina O.L., Shelepova O.V. Intra- and interspecific variability of *Mentha arvensis* L. and *M. canadensis* L. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(8):1067-1075. DOI 10.18699/VJ19.582 (in Russian)

Введение

Виды *Mentha* L. обладают значительным ресурсным потенциалом благодаря содержанию эфирного масла в надземной части растений. Мята используется в медицине в качестве спазмолитического, успокоительного, желудочного, желчегонного средства. Кроме того, она находит применение в пищевой и парфюмерной промышленности. В южных регионах Азии ее культивируют для получения технического эфирного масла, при специальной обработке которого получают ментол, входящий в состав многих важных лекарственных препаратов.

По данным различных источников, род *Mentha* L. включает от 18 видов и 11 гибридов (Tucker, Naczi, 2007) до 27 видов и 15 гибридов (WCSP, 2019). При этом исследователи не могут прийти к единому мнению относительно объемов и границ морфологически сходных между собой, но в то же время полиморфных видов. Отличительной особенностью рода является значительный полиморфизм внутри видов и одновременно сходство (перекрывание) ряда морфологических признаков между видами. В связи с этим в качестве дополнительного признака для характеристики вида целесообразно использовать фитохимические особенности растений, в частности состав эфирного масла. Компонентный состав эфирного масла у всех видов *Mentha* генетически детерминирован, и при оптимальных условиях синтез компонентов протекает до полного набора терпеновых соединений, характерных для вида. В неблагоприятных условиях произрастания синтез этих веществ останавливается на более ранних стадиях, вследствие чего в качественном составе эфирного масла появляются более «простые» соединения (Gouyon et al., 1986). Это приводит к трудностям в таксономическом разделении близких видов и в полной мере относится к двум исключительно полиморфным и сложно разделяемым видам *M. arvensis* L. и *M. canadensis* L.

Mentha arvensis произрастает в Европе и Азии, на территории России распространена в европейской части, Предкавказье и в Сибири (Губанов и др., 2004). Ареал *M. canadensis* в нашей стране включает Сибирь и Дальний Восток (Доронькин, 1997), в мире – Северную Америку и Восточную Азию (Tucker, Naczi, 2007).

Mentha arvensis L. (мята полевая) – широко распространенный и очень изменчивый по морфологическим признакам вид. Габитус растений значительно меняется в зависимости от условий произрастания. Так, в тенистых сырых местах формируются высокорослые растения с приподнимающимися или лежащими стеблями и крупными зелеными или светло-зелеными листьями и бледно-лиловыми, иногда почти белыми цветками. На

более сухих участках растения становятся низкорослыми, с прямостоячим стеблем, сближенными между собой листьями, на которых появляется красно-фиолетовый антоциановый оттенок, цветки приобретают ярко-лиловую окраску.

Mentha canadensis L. (мята канадская) была описана К. Линнеем (Linne, 1753), это родственник *M. arvensis* и сложно идентифицируемый вид. От *M. arvensis* отличается более высоким неветвистым, сильно опушенным стеблем, вдвое более узкими и острыми глубокопильчатыми листьями, а также формой чашечки. Для разделения этих видов по морфологическим признакам используют различные критерии. В.М. Доронькин (1997) предложил разделять их по форме чашечки и строению зубцов: у *M. arvensis* чашечки колокольчатые, зубцы короткие, широкотреугольные, тогда как у *M. canadensis* чашечки трубчатые, зубцы длинные, тонко заостренные до почти шиловидных, реже короткие, но тоже заостренные. Другие исследователи в приводимом ими ключе разделяют виды по форме листьев и аромату, однако эти признаки не могут быть надежным критерием (Tucker, Naczi, 2007).

К числу морфологических признаков, вызывающих затруднения в процессе идентификации рассматриваемых двух видов, можно отнести такие изменчивые внутривидовые и в то же время перекрывающиеся признаки, как: тип ветвления и степень ветвистости, форма и размеры листа, опушенность побегов. Все эти признаки сильно варьируют в зависимости от условий произрастания (особенно у *M. arvensis*), но очень важны в определении вида.

В разделении и определении границ двух видов исследователи часто расходятся во мнении. Так, ряд авторов рассматривали *M. canadensis* не как самостоятельный вид, а как разновидность, форму или подвид *M. arvensis*. Е. Holmes (1882) описал мяту, произрастающую в Японии, как *M. arvensis* f. *piperascens* Malinv. ex Holmes. J. Briquet (1894) выделял мяту из Северной Америки как *M. arvensis* var. *canadensis*, а мяту из Азии – как *M. arvensis* var. *haplocalyx*. Н. Hara (1956) описывал ее как *M. arvensis* ssp. *piperascens* (Malinv. ex Holmes) Н. Hara. В настоящее время *M. canadensis* выделяют в самостоятельный вид, хотя для его обозначения и сохранились многочисленные синонимы, наиболее полно представленные в World Checklist of Selected Plant Families (WCSP, 2019).

Возможно, *M. canadensis* является амфидиплоидом, возникшим в результате межвидовой гибридизации *M. arvensis* и *M. longifolia* (Tucker, Chambers, 2002). В литературе имеются сведения об изучении хлоропластных последовательностей ДНК, которые свидетельствуют также о том, что *M. arvensis* может быть родительским видом,

выступавшим в качестве материнского растения (источника женских гамет) для образовавшегося в процессе межвидовой гибридизации вида *M. canadensis* (Bunsawat et al., 2004). На основании комплексного анализа данных проточной цитометрии и ISSR-анализа было выдвинуто предположение, что *M. canadensis* – это аллополиплоид, возникший в результате цитомиксиса между представителями родительских видов с различной ploidy (Jedrzejczyk, Rewers, 2018).

Целью настоящей работы было изучение внутри- и межвидовой изменчивости и дифференциации *M. arvensis* и *M. canadensis* из нескольких, в разной степени удаленных друг от друга популяций. Ранее нами рассмотрен полиморфизм в популяциях *M. arvensis* на основе морфологических и молекулярно-генетических исследований (Шелепова и др., 2016б), а также предпринята попытка дифференцировать два близких вида с использованием морфологического и фитохимического анализа (Шелепова и др., 2016а), однако результаты этих исследований не дали полной картины. Для изучения межвидовых и популяционных различий в роде *Mentha* в ряде работ успешно используется комплексная оценка образцов по морфологическим признакам, составу эфирного масла и ISSR-маркеров (Hua et al., 2011; Rodrigues et al., 2013; Шелепова и др., 2017). В связи с этим для выполнения поставленной задачи нами проведено комплексное исследование ряда морфологических признаков, а также компонентного состава эфирного масла и молекулярно-генетических данных с помощью ISSR-маркеров ДНК у растений двух видов мяты.

Материалы и методы

Отбор проб в популяциях. В исследование были включены растения из восьми популяций *M. arvensis* и *M. canadensis*, собранные в четырех значительно удаленных друг от друга регионах (табл. 1).

Для изучения морфологических признаков и проведения ISSR-анализа ДНК в природных популяциях были взяты 5–8 побегов с типичных растений, собранные через каждые 10–200 м (в зависимости от размера популяции), в культивируемых на экспериментальном участке образцах – побеги с 1–3 растений. В предварительном исследовании установлено, что выборки из природных популяций отличались большим разнообразием амплифицированных фрагментов и, следовательно, значительным разнообразием генотипов в пределах одной популяции, а растения из коллекции практически не различались между собой по составу ISSR-фрагментов и представляли собой один клон. В качестве внешнего стандарта использовали вид *Mentha spicata* L. Для анализа компонентного состава эфирного масла в популяциях отбирали от 1 до 5 проб растений одновременно со сбором гербарных образцов (в фазу массового цветения) с площадки размером 0.2 м². Гербарные образцы хранятся в лаборатории физиологии и иммунитета растений и в гербарии ГБС РАН (МНА).

Изучение морфологических признаков. Растения были определены до уровня вида. Большая часть образцов отнесена к *M. arvensis*, а растения из природной флоры Дальнего Востока и коллекционные образцы из флоры Индокитая предварительно определены как *M. canadensis*.

Исследованы следующие количественные признаки: длина чашечки цветка, длина зубцов чашечки, ширина зубцов чашечки в основании, отношение длины зубца к ширине, отношение длины чашечки к длине зубцов, отношение длины трубки к длине зубцов; длина и максимальная ширина листа, расстояние от основания до максимальной ширины листа; количество секреторных желез на нижней и верхней поверхности листа на 1 см², отношение количества секреторных желез на нижней и верхней поверхности листа. Строение чашечки исследовали с помощью светового стереомикроскопа при увеличении 400×. Для сравнительного анализа растений по этому признаку были сделаны фотографии с помощью видеокамеры Lumenera Infinity 2 и обработаны в программе Infinity Analyses 5.0.2. Количество секреторных желез определяли по ранее опубликованной методике (Шелепова и др., 2012).

Методы изучения состава эфирного масла. Эфирное масло получали из измельченного воздушно-сухого материала методом гидродистилляции (Гинзберг, 1932). Для этого использовали среднюю пробу из наземной массы растений (смесь соцветий и листьев). Эфирное масло растений состоит из смеси природных соединений – монотерпенов, дитерпенов, гемитерпенов, сесквитерпенов и др., а также их окислов. Вопросы классификации, биосинтеза и детальной проработки каждого класса соединений подробно рассмотрены в работе (Племенков, 2007). Качественный состав масла определяли газохроматографически в ЦКП ФИЦ «Биотехнология» РАН (RFMEFI62114X0002) на газовом хроматографе Shimadzu GS 2010 с масс-детектором GCMS-QP 2010 по описанной нами ранее методике (Шелепова и др., 2017).

Выделение ДНК и проведение ПЦР. ДНК выделяли из сухих листьев, взятых с гербарных образцов, с применением СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). Для исследования полиморфизма ДНК использовали ISSR (inter simple sequence repeat) маркеры. Праймеры для ПЦР-анализа были синтезированы и очищены в РААГ фирмой Syntol Ltd (Москва, Россия). После предварительной проверки отобраны восемь праймеров (табл. 2). Проведены две серии ПЦР для 46 и 42 проб, причем часть образцов была включена в схему постановки ПЦР повторно. ISSR–ПЦР и разделение ПЦР-продукта выполняли по опубликованной ранее методике (Шелепова и др., 2016б, 2017).

Анализ молекулярных данных и статистическая обработка. Профили полос полученных ISSR-фрагментов в агарозном геле сравнивали с помощью визуальной оценки и программы CrossChecker. Учитывались только яркие и четкие фрагменты, неясные полосы считались отсутствующими. Каждый амплифицированный фрагмент, который был визуализирован в виде полосы в электрофоретическом геле, рассматривался как счетный признак и использовался в виде двоичного кода для составления матрицы присутствия/отсутствия фрагментов. Затем полученные результаты анализировали в программе PAST с использованием кластерного анализа и метода главных компонент и главных координат (Hammer et al., 2001). Для оценки стабильности полученных дендрограмм был проведен бутстреп-анализ с 1000 реплик.

Таблица 1. Описание исследованных образцов *Mentha* и точек сбора проб

Название образца	Кол-во образцов	Местонахождение популяции	Геогр. координаты места сбора
M-1,2	2	Москва, территория Главного ботанического сада РАН. Сухое русло ручья на левом берегу Лихоборки	55°50'35.7" N, 37°36'52.3" E
M-3	1	Московская область, усадьба «Знаменское Садки», берег пруда над р. Битца	55°34'44.8" N, 37°33'19.3" E
M-4	1	Московская область, первая речная терраса р. Битца, 3 км ниже по течению от усадьбы «Знаменское Садки»	55°34'38.1" N, 37°33'47.1" E
M-5	1	Московская область, 1.5 км на юго-запад от дер. Марьино, Красногорский район. У кромки воды запруды на р. Синичка	55°51'07.6" N, 37°18'35.6" E
M-6	1	Московская область, Валуевский лесопарк, окрестности дер. Мешково	55°35'03.5" N, 37°18'31.6" E
M-7	1	Москва, природный заказник «Воробьевы горы»	55°42'33.4" N, 37°33'16.6" E
H	5	Хакасия, Алтайский район, правый высокий берег р. Абакан, около 1.5 км к западу от пос. Изыхские Копи, на галечниковой отмели, 5 растений	53°33'4.54" N, 91°14'38.15" E
F	5	Владимирская область, Ковровский район, пойма р. Клязьма, 5 растений	56°24'59.1" N, 41°23'06.0" E
K	2	Калужская область, Жуковский район, окраина дер. Огороково, 2 растения	55°03'57.3" N, 36°42'55.5" E
Komi	3	Коллекционный участок лаборатории физиологии и иммунитета растений ГБС РАН, получено из Сыктывкара, природная флора Коми, 3 растения	55°50'06.5" N, 37°35'17.4" E
Ind1-5	5	Коллекционный участок лаборатории физиологии и иммунитета растений ГБС РАН, получено из Вьетнама, природная флора Индокитая, 3 растения	55°50'06.5" N, 37°35'17.4" E
<i>Mentha spicata</i>	1	Коллекционный участок лаборатории физиологии и иммунитета растений ГБС РАН, получено из Никитского ботанического сада, Ялта	55°50'06.5" N, 37°35'17.4" E
U-1	1	Украина, Львов, в черте города, парк Погулянка, заболоченная низина рядом с источником под склоном букового леса	49°49'11.0" N, 24°02'14.3" E
U-2	1	Украина, Львов, парк Погулянка, край болота	49°49'22.9" N, 24°03'52.4" E
U-3,4	2	Украина, северо-западная окраина Львова, пос. Белогорща, торфяник	49°50'28.0" N, 23°55'02.5" E
U-5	1	Украина, Ивано-Франковская область, Галицкий район, с. Тустань, пойма р. Гнилая Липа	49°08'00.0" N, 24°45'20.4" E
U-6	1	Украина, Ивано-Франковская область, Галицкий район, между селами Водники и Дубовцы, старица р. Днестр	49°04'33.1" N, 24°47'53.1" E
DV-1-5,8	6	Приморский край, Хасанский район, бухта Витязь	42°35'36" N, 131°11'13" E
DV-6,7	2	Приморский край, Хасанский район, бухта Астафьева	42°37'7" N, 131°11'54" E
DV-9,10	2	Приморский край, Лазовский район, база «Заповедное»	42°50'27" N, 133°41'56" E

Таблица 2. Список ISSR-праймеров, использованных для постановки ПЦР

Праймер	Последовательность	Температура отжига праймеров, °C	Кол-во полиморфных ISSR-фрагментов
M2	(AC) ₈ (C/T)G	50.0	12
M3	(GA) ₈ (C/T)C	52.7	17
M4	(AG) ₈ YC	50.0	17
M7	(CAG) ₅	52.7	16
M8	(GTG) ₅	52.7	13
M12	(CA) ₆ (A/G)(C/T)	50.0	13
UBC 840	(GA) ₈ AYT	50.0	12
UBC855	(AC) ₈ CYT	50.0	17

Результаты

Анализ количественных морфологических признаков с помощью метода главных компонент показал, что исследуемые образцы разделяются на две основные группы (рис. 1, а). В одну из них вошли все образцы из европейской части, Республики Коми, Хакасии, Дальнего Востока России, а также из Украины и один образец из Индокитая (Ind2). Дальневосточные растения расположены близко друг к другу и являются частью общего смешанного облака, сформированного остальными образцами. В отдельное облако попали растения из Индокитая, которые были определены как *M. canadensis*. При обработке тех же данных методом кластерного анализа с использованием дистанции Говера (см. рис. 1, б) были получены два основных кластера с несколько различающимся составом образцов внутри кластеров. В первом кластере все растения Дальнего Востока и Индокитая, во втором – европейские и растения из Хакасии.

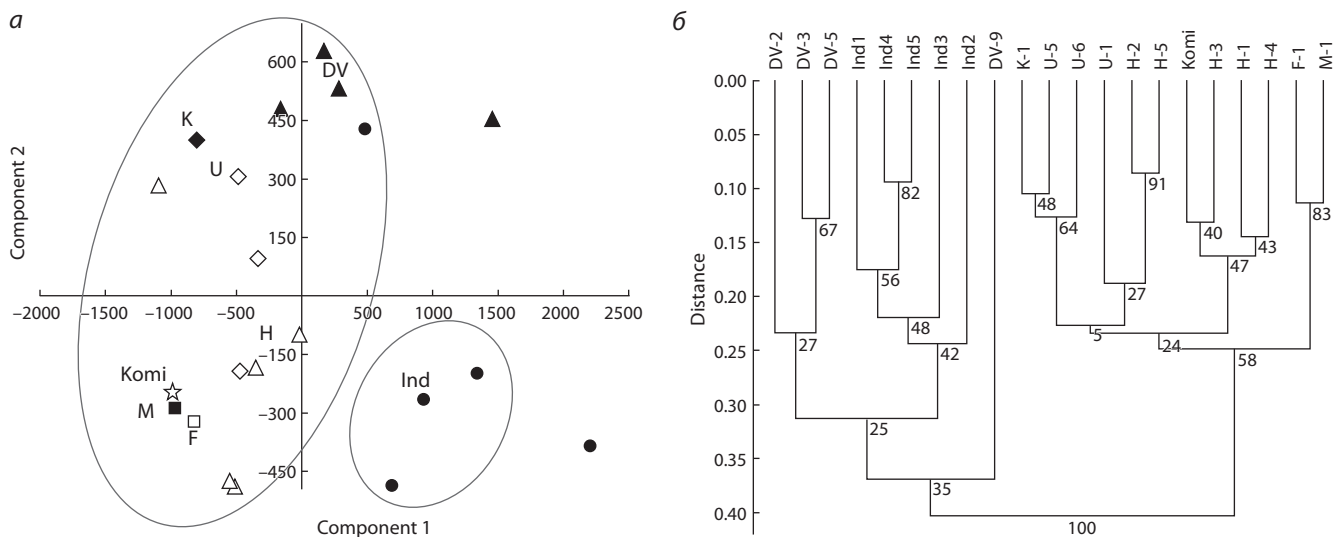


Рис. 1. Распределение образцов на основании результатов статистической обработки морфологических признаков растений *M. arvensis* и *M. canadensis*: а – метод главных компонент; б – кластерный анализ.

Условные обозначения: ■ – Московская область (М-6); ◆ – Калужская область (К-1); □ – Владимирская область (F); △ – Республика Хакасия (H); ▲ – Дальний Восток (DV); ☆ – Республика Коми; ◇ – Украина (U-2); ● – Индокитай (Ind1-5).

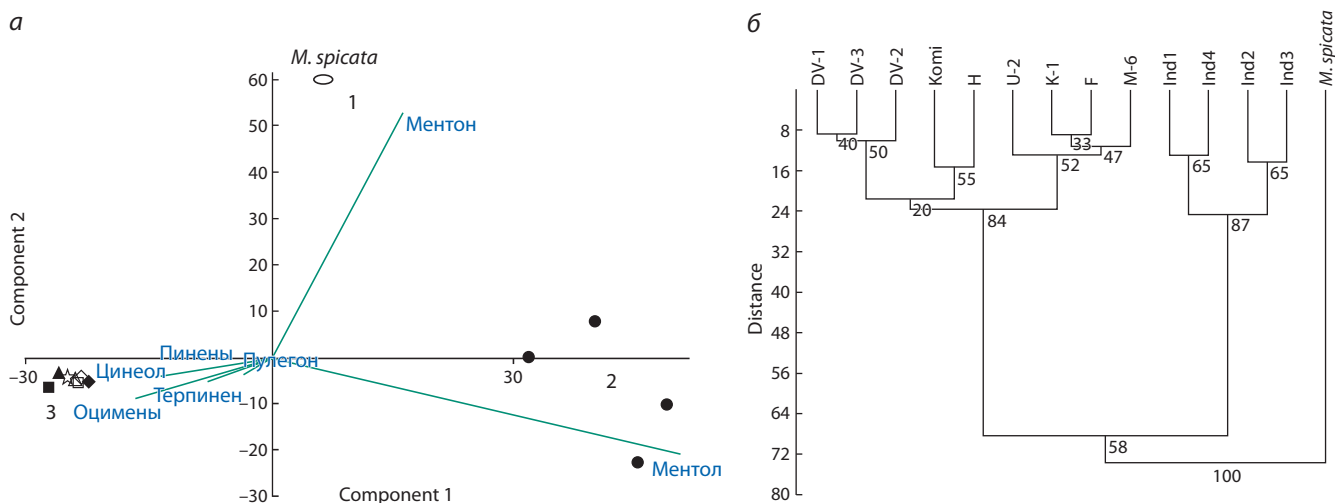


Рис. 2. Распределение образцов на основании результатов анализа состава эфирного масла в надземной части растений *M. arvensis*, *M. canadensis* и *M. spicata*: а – метод главных компонент; б – кластерный анализ.

Усл. обозн. см. рис. 1.

Самостоятельным критерием идентификации включенных в исследование растений *Mentha* может служить компонентный состав эфирного масла. В его составе обнаружено до 47 компонентов. Все компоненты с содержанием более 0.1 % от общей суммы легко идентифицировались по времени удерживания и масс-спектрам. Соотношение отдельных компонентов в составе эфирного масла значительно варьирует у растений из разных регионов.

По составу эфирного масла образцы распределились в целом сходным с морфологическими данными образом, но для растений из флоры Дальнего Востока отмечено более четкое и стабильное положение среди остальных образцов, независимо от методов статистической обработки (рис. 2). При использовании метода главных компонент (см. рис. 2, а) образцы разделились на три основные группы: 1 – *M. spicata* (основной компонент – ментол);

2 – индоазиатские растения (ментол); 3 – большая группа образцов, куда вошли растения Московской, Калужской и Владимирской областей, Дальнего Востока, Коми, Хакасии и Украины (для этой группы преобладающими компонентами были *транс*- и *цис*- β -оцимены, γ -терпинен, 1,8-цинеол, α - и β -пинены и пулегон).

Кластерный анализ (с использованием евклидова расстояния) компонентного состава эфирного масла разделил образцы на два кластера с высокой степенью поддержки (уровень бутстреп-поддержки 84–87 %) (см. рис. 2, б). *M. spicata*, взятая в качестве внешней группы, заняла базальное положение по отношению к двум кластерам, доминирующим соединением в компонентном составе ее эфирного масла был ментол (67.9 %) (табл. 3). В первый кластер вошли растения из Индокитая, для них было характерно накопление ментола (46.9–67.7 %) и его про-

Таблица 3. Компонентный состав эфирного масла растений *Mentha*

Наименование компонента	Содержание компонентов, % от цельного эфирного масла													
	<i>M. spicata</i>	M-6	K-1	F	H	Komi	U-2	DV-1	DV-2	DV-3	Ind1	Ind2	Ind3	Ind4
α-Пинен	0.53	2.20	1.15	1.91	2.04	2.86	0.98	5.24	3.85	4.19	0.25	0.41	0.95	0.45
β-Пинен	0.02	4.51	1.59	2.19	1.44	6.36	3.75	7.08	6.82	7.84	0.26	0.47	1.00	0.48
Сабинен	1.01	2.46	1.00	0.90	4.36	3.73	1.84	6.03	7.84	6.79	0.23	0.20	0.32	0.21
β-Мирцен	0.61	3.18	3.68	2.33	6.68	1.13	4.68	t*	6.16	2.85	0.39	0.36	0.73	0.39
Лимонен	0.69	0.65	2.09	1.02	1.88	0.82	6.05	1.24	1.30	1.19	1.99	0.93	2.04	2.13
1,8-Цинеол	3.62	13.89**	3.28	8.87	12.75	24.73	15.28	20.06	28.82	20.15	0.20	0.31	0.41	0.20
<i>транс</i> -β-оцимен	0.08	11.17	8.98	2.01	7.59	5.91	7.26	10.85	8.85	6.62	0.02	t	0.02	0.15
<i>цис</i> -β-оцимен	0.04	12.61	11.73	2.19	9.73	6.18	8.54	13.12	9.51	8.95	t	0.28	0.01	0.06
γ-Терпинен	1.11	21.81	19.32	13.59	4.23	3.21	11.79	0.74	0.52	3.54	0.01	t	t	t
Терпинолен	0.19	1.97	13.46	5.72	3.46	0.12	3.15	0.30	0.20	0.78	0.01	t	0.01	0.01
Линалоол	0.08	0.45	1.02	2.79	2.60	1.20	1.02	0.45	0.78	0.51	0.92	0.28	0.02	0.011
Ментол	3.16	0.58	1.60	1.81	0.21	0.58	0.98	0.42	0.63	0.71	46.92	67.67	67.32	52.96
α-Терпинеол	0.32	1.58	1.65	1.79	3.19	1.72	2.74	2.81	1.84	1.21	0.17	t	0.12	t
Ментон	67.88	0.22	0.56	0.85	0.37	0.56	0.64	t	t	t	19.25	3.11	16.36	30.33
Изоментон	4.68	0.48	0.11	0.27	0.43	0.44	0.36	0.19	0.28	0.12	22.69	6.29	5.90	2.33
Изопулегон и пулегон	1.17	0.98	3.13	0.79	21.14	15.51	1.63	0.87	0.56	0.61	2.54	5.79	0.49	0.28
Метилацетат	0.36	0.11	0.63	0.81	0.47	0.10	0.72	0.39	0.21	0.78	8.94	7.05	0.42	1.95
Изоментол	1.03	0.21	0.22	0.25	0.18	0.18	0.22	0.38	0.42	0.73	0.38	1.03	0.04	1.51
β-Кариофиллен	1.69	2.99	1.55	1.96	2.29	7.96	6.97	5.24	2.60	2.41	0.61	0.55	0.65	0.40
Гермекрен D	1.08	4.38	5.07	3.22	3.84	5.28	3.45	0.98	0.80	1.47	0.60	0.93	0.94	0.32
Пиперитон	0.70	0.12	0.13	0.36	0.10	0.06	5.25	1.03	0.55	0.54	0.84	0.68	0.46	2.77

* Компонент отсутствует в составе эфирного масла.

** Полу жирным курсивом выделены мажорные компоненты эфирного масла.

изводных – ментона (3.11–30.3 %) и изоментона (2.33–22.7 %) (см. табл. 3).

Во второй кластер вошли все остальные образцы: растения из средней полосы, Коми, Хакасии и Дальнего Востока. Второй кластер (бутстреп-поддержка <84 %) делится в свою очередь на три хорошо поддержанных субкластера. Выделяется субкластер, состоящий из растений *M. arvensis* Московской (M-6), Калужской (K-1) и Владимирской (F) областей и Украины (U-2). Два самостоятельных хорошо поддержанных сестринских подкластера образованы мятами Дальнего Востока (DV), Республики Коми (Komi) и Хакасии (H).

Как видно из табл. 3, популяции M-6, K-1, F и U-2 выделяются преимущественно по содержанию суммы *транс*- и *цис*-β-оцименов (4.2–23.8 %) и γ-терпинена (11.8–21.8 %), популяции DV, Komi и H – 1,8-цинеола (20.1–28.8 %) и суммы *транс*- и *цис*-β-оцименов (15.6–24.0 %), а в популяциях Komi и H, кроме 1,8-цинеола (24.7 и 12.8 %) и суммы *транс*- и *цис*-β-оцименов (12.1 и 17.3 %), зафиксированы пулегон и его предшественник изопулегон (15.5 и 21.1 % соответственно). Парные тесты Хотеллинга свидетельствуют о достоверном различии ($p < 0.02$ с применением коррекции Бонферрони) всех популяций. Таким образом, выявленные различия между исследованными растениями *Mentha* позволяют выделить следующие хемотипы: менто-

ловый (растения из Индокитая); *транс*- и *цис*-оцименовый и γ-терпиненовый (растения *M. arvensis* из Московской, Калужской и Владимирской областей и Украины), цинеоловый и *транс*- и *цис*-оцименовый (растения Дальнего Востока) и условно пулегоновый (растения из Республики Коми и Хакасии).

Для более полного изучения и выявления степени генетического сходства популяций исследовался состав ISSR-фрагментов ДНК. ПЦР проводили по двум схемам. В первую входили растения из Индокитая, Хакасии, европейской части России и Западной Украины, а также *M. spicata* в качестве внешнего стандарта. Во вторую схему опыта были добавлены образцы из флоры Дальнего Востока.

В первой схеме ПЦР была получена матрица, состоящая из 117 полиморфных фрагментов. При анализе данных методом главных координат с использованием расстояния Дайса исследуемые образцы распределились на две основные группы (рис. 3, а). Одна из этих групп включает растения из флоры Индокитая, во вторую вошли все образцы из европейской части России и Хакасии. Обособленное положение заняли *M. spicata* и расположенный рядом образец Ind1 флоры Индокитая (показан серым цветом). Образцы из Украины сформировали группу, почти не обособленную от других европейских и хакасских образцов.

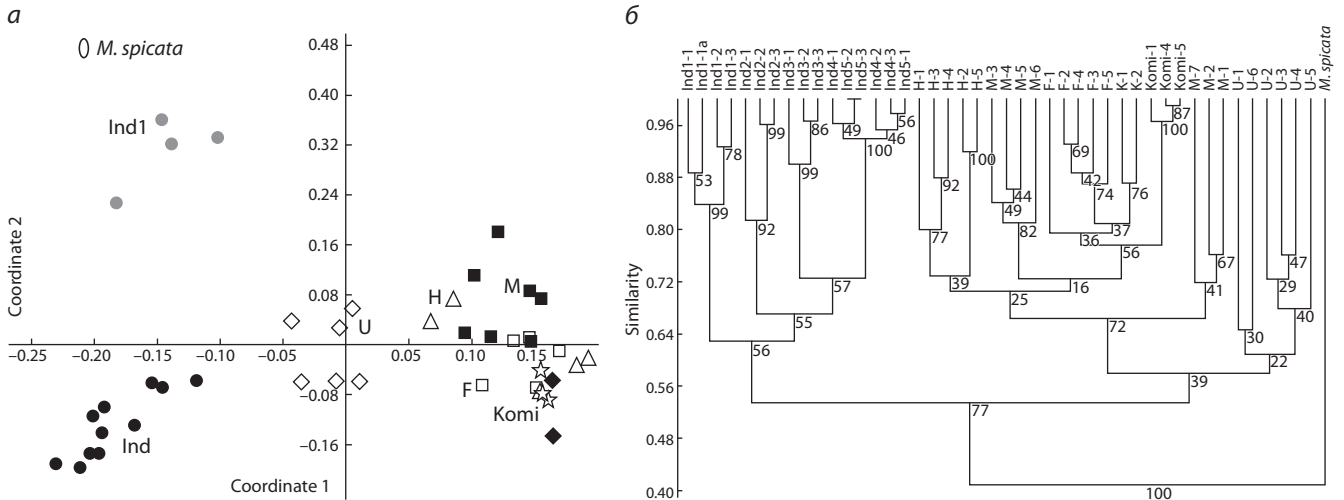


Рис. 3. Распределение образцов на основании результатов анализа состава ISSR-фрагментов ДНК в растениях *M. arvensis*, *M. canadensis* и *M. spicata*: а – метод главных координат; б – кластерный анализ.

Усл. обозн. см. рис. 1.

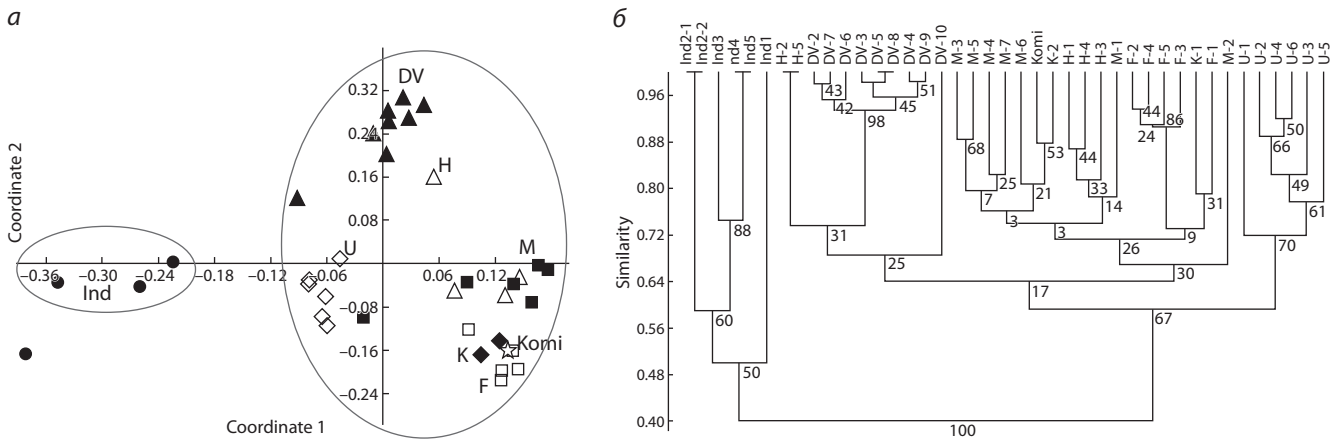


Рис. 4. Распределение образцов на основании результатов анализа состава ISSR-фрагментов ДНК в растениях *M. arvensis* и *M. canadensis*: а – метод главных координат; б – кластерный анализ.

Усл. обозн. см. рис. 1.

Кластерный анализ (см. рис. 3, б) также позволил выделить две большие группы растений со средним уровнем бутстреп-поддержки (39–56 %) и достаточно высокой мерой подобия (0.6): в первой находятся индоазиатские растения, во второй – европейские и хакасские.

По результатам второй схемы ПЦР была составлена матрица на основе 80 полиморфных фрагментов. После обработки полученных данных методом главных координат и кластерного анализа с использованием критерия Дайса растения тоже разделились на две группы (рис. 4). Первую составили растения из Индокитая, во вторую вошли все остальные растения, причем часть из них образовала общее облако/кластер, а другие сформировали отдельные группы, примыкающие к общей. Для образцов из Индокитая характерно наличие специфических для всей группы ампликонов, которые отсутствовали у остальных растений, в том числе у образцов с Дальнего Востока.

Внутри сборной второй группы популяции разделились на несколько подгрупп. Растения из Московской, Влади-

мирской и Калужской областей, а также Республики Коми и Хакасии образовали общее облако, в котором образцы из разных популяций практически неразделимы, что свидетельствует о значительном генетическом сходстве между ними. К этой смешанной группе примыкают две относительно обособленные группы образцов, одна из которых образована популяцией Дальнего Востока вместе с двумя растениями из Хакасии, а вторая – образцами из Западной Украины, которые формируют облако, соприкасающееся с растениями из европейской части России. Все растения, собранные на Дальнем Востоке, имели очень высокую меру подобия (0.9) и бутстреп-поддержку кластера (98 %), что говорит о близком родстве изученных локальных популяций Дальнего Востока.

Обсуждение

В результате анализа количественных диагностических характеристик чашечки и листьев четко определяются европейская и индоазиатская группы образцов. В случае

же установления принадлежности дальневосточных растений к той или иной группе есть расхождения при использовании разных методов обработки данных, и, соответственно, затруднено определение их таксономического положения только по морфологическим признакам. Дополнительным критерием для разделения *M. arvensis* и *M. canadensis* может служить такой качественный показатель, как ультраструктура поверхности семян (Шелепова и др., 2016а), однако у растений из Индокитая семена отсутствовали, поскольку при выращивании этих образцов в условиях средней полосы России завязывание и созревание семян происходит редко.

По составу эфирного масла в надземной части растений все образцы распределились на разные хемотипы, что обусловлено генетическими особенностями растений. В литературе как для *M. arvensis*, так и для *M. canadensis* упоминается очень много хемотипов, выделенных на основе компонентов, присутствующих в количестве более 10 % (Tucker, Chambers, 2002). Для *M. arvensis* среди девяти хемотипов упоминаются такие, как лимоненовый, пулегоновый и 1.8-цинеоловый и/или β -пиненовый. В составе эфирного масла проанализированных нами растений *M. arvensis* доминировали транс- и цис- β -оцимены и γ -терпинен. Это ациклические предшественники лимонена и циклические промежуточные продукты терпеноидов. Известно, что лимонен через ряд биохимических реакций с участием гидро-, дегидроксилаз и редуктазы трансформируется в изопулегон, который, в свою очередь, является предшественником пулегона (Бугаенко, 2011), что и зафиксировано у растений *M. arvensis* из Коми и Хакасии (условно пулегоновый хемотип).

Для *M. canadensis* из Северной Америки выделяют среди прочих 1.8-цинеоловый и β -оцименовый, а для *M. canadensis* из Азии характерны многочисленные хемотипы, преимущественно с преобладанием ментола и ментона (Tucker, Chambers, 2002). Аналогичные результаты получены и в наших исследованиях: ментоловый хемотип у растений *M. canadensis* из Индокитая и цинеоловый и транс- и цис-оцименовый – у растений Дальнего Востока.

Анализируя состав ISSR-фрагментов, можно заключить, что растения *M. arvensis* из различных популяций европейской части России обладают значительным генетическим сходством и друг от друга почти не дифференцированы. Украинская и дальневосточная популяции, напротив, хорошо обособлены от остальных. Растения, произрастающие на Дальнем Востоке, согласно данным ISSR-анализа, хотя и образуют четко обособленную от европейских популяций группу, но все же находятся с ними в одном кластере/облаке. Растения из флоры Индокитая по составу ISSR-фрагментов значительно отличаются от остальных образцов и относятся к другому виду.

Между результатами молекулярно-генетического анализа, составом эфирного масла для растений *M. arvensis* и *M. canadensis* и, в некоторой степени, морфологическими признаками растений прослеживается сходный характер распределения образцов, т. е. наблюдается корреляция между молекулярными, фитохимическими и морфологическими параметрами. Таким образом, можно выделить группу наиболее генетически, морфологически и фитохимически близких растений, в которую вошли

представители популяций Московской, Владимирской, Калужской областей, Республики Коми и Хакасии. Все они относятся к *M. arvensis*.

Заключение

Согласно полученным данным, как по компонентному составу эфирного масла, так и по составу ISSR-фрагментов растения, собранные в природной флоре Дальнего Востока, имели большее сходство с *M. arvensis* из европейской части, чем с коллекционными образцами из флоры Индокитая. В то же время для растений дальневосточной популяции отмечено определенное сходство с *M. canadensis* по некоторым морфологическим признакам (длина зубцов чашечки была промежуточной между *M. arvensis* из европейской части России и *M. canadensis* из Индокитая), по отдельным компонентам эфирного масла, которые характерны для *M. canadensis* из Северной Америки, кроме того, выявлена генетическая обособленность от остальных растений *M. arvensis*. Возможно, дальневосточная популяция представлена растениями гибридного происхождения и имеет более тесное родство с *M. arvensis*, чем с растениями из Индокитая, которые, по всей вероятности, относятся к *M. canadensis*. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что комплексный анализ морфологических, фитохимических и молекулярных данных позволяет наиболее полно исследовать полиморфизм видов и уточнить видовую принадлежность растений.

Список литературы / References

- Бугаенко Л.А. Генетические закономерности биосинтеза терпеноидов у мяты. Симферополь: Бизнес-Информ, 2011.
[Bugaenko L.A. Genetic Patterns of Terpenoid Biosynthesis in Mint. Simferopol: Business Inform Publ., 2011. (in Russian)]
- Гинзберг А.С. Упрощенный способ определения эфирного масла в эфирносоках. Хим.-фармацевт. промышленность. 1932;8(9): 326-329.
[Ginsberg A.S. A simple method for essential oil assay in essential-oil-bearing plants. Khimiko-Farmatsevticheskaya Promyshlennost = Chemical-Farm. Industry. 1932;8(9):326-329. (in Russian)]
- Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. *Mentha arvensis* L. s. l. – Мята полевая. Иллюстрированный определитель растений Средней России. М.: Т-во науч. изданий КМК; Ин-т технол. исследований, 2004;3:133.
[Gubanov I.A., Kiseleva K.V., Novikov V.S., Tikhomirov V.N. *Mentha arvensis* L. s. l. – Field Mint. Illustrated Guide to Plants of Central Russia. Moscow: KMK Publ.; Institute of Technological Research, 2004;3:133. (in Russian)]
- Доронькин В.М. *Mentha* L. В: Флора Сибири. Под ред. Л.И. Малышева. Новосибирск: Наука, 1997;11:222-225.
[Doron'kin V.M. *Mentha* L. In: Malyshev L.I. (Ed.) Flora of Siberia. Novosibirsk: Nauka Publ., 1997;11:222-225. (in Russian)]
- Племенков В.В. Химия изопреноидов. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2007.
[Plemenkov V.V. Chemistry of Terpenoids. Barnaul: Altay University Publ. 2007. (in Russian)]
- Шелепова О.В., Воронкова Т.В., Смирнова И.М., Енина О.Л. Особенности железистого аппарата растений *Mentha arvensis* L. разного географического происхождения. Изв. Самар. НЦ РАН. 2012;14(1):1884-1887.
[Shelepova O.V., Voronkova T.V., Smirnova I.M., Enina O.L. Features of the glandular apparatus of *Mentha arvensis* L. plants from different geographical regions. Izvestiya Samarskogo Nauchnogo Tsentra Rossiyskoy Akademii Nauk = Proceedings of the

- Samara Research Center of the Russian Academy of Sciences. 2012;14(1):1884-1887. (in Russian)]
- Шелепова О.В., Семенова М.В., Воронкова Т.В., Олехнович Л.С., Бидюкова Г.Ф. Анатомо-морфологические и фитохимические отличия *Mentha canadensis* L. и *Mentha arvensis* L. Бюл. Ботан. сада-института ДВО РАН. 2016а;15:89-92.
[Shelepova O.V., Semenova M.V., Voronkova T.V., Olekhovich L.S., Bidyukova G.F. Anatomical, morphological and phytochemical differences between *Mentha canadensis* L. and *Mentha arvensis* L. Bulletin Botanicheskogo Sada-Institutu DVO RAN = Bulletin of the Botanical Garden-Institute, Far-Eastern Branch of the RAS. 2016a;15:89-92. (in Russian)]
- Шелепова О.В., Семенова М.В., Шанцер И.А., Степанова Н.Ю. Генетические и морфологические особенности южно-сибирских популяций *Mentha arvensis* L. В: Материалы XV Международ. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул. 2016б;15:446-450.
[Shelepova O.V., Semenova M.V., Schantser I.A., Stepanova N.Yu. Genetic and morphological features of South Siberian *Mentha arvensis* L. populations. In: Proc. of the XV Int. practical and sci. conf. "Problems of Botany of South Siberia and Mongolia". Barnaul, 2016b;15:446-450. (in Russian)]
- Шелепова О.В., Семенова М.В., Енина О.Л., Шанцер И.А. Генетический, фенотипический и фитохимический полиморфизм восточноевропейских популяций *Mentha arvensis* L. Генетика. 2017;53(1):54-62. DOI 10.7868/S0016675816120134.
[Shelepova O.V., Semenova M.V., Enina O.L., Schantser I.A. Genetic, phenotypic and phytochemical polymorphism of Eastern European populations *Mentha arvensis* L. Russ. J. Genet. 2017; 53(1):59-66. DOI 10.1134/S1022795416120139.]
- Briquet J. Fragmenta monographiae Labiatarum. Fascicule troisieme. Decades Mentharum novarum. Bull. Herb. Boiss. 1894;2:691-709.
- Bunsawat J., Elliott N., Hertweck K., Lawrence A. Phylogenetics of *Mentha* (Lamiaceae): evidence from chloroplast DNA sequences. Syst. Bot. 2004;29(4):959-964. DOI 10.1600/0363644042450973.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19:11-15.
- Gouyon P.H., Vernet Ph., Guillem J.L., Valdeyron G. Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. Heredity. 1986;57:59-66.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica. 2001;4(1):4. Available at: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hara H. Contributions to the study of variations in the Japanese plants closely related to those of Europe or North America. Part 2. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo Sect. 3, Bot. 1956;6:343-391.
- Holmes E.M. The Japanese peppermint plant. Pharm. J. Trans. 1882; 13:381-382.
- Hua C.X., Wang G.R., Lei Y. Evaluation of essential oil composition and DNA diversity of mint resources from China. Afr. J. Biotechnol. 2011;10(74):16740-16745. DOI 10.5897/AJB11.1428.
- Jedrzejczyk I., Rewers M. Genome size and ISSR markers for *Mentha* L. (Lamiaceae) genetic diversity assessment and species identification. Ind. Crops Prod. 2018;120:171-179. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.04.062.
- Linne C. *Mentha*: Species Plantarum. Holmaiae, 1753.
- Rodrigues L., Póvoa O., Van den Berg C., Figueiredo A.C., Moldão M., Monteiro A. Genetic diversity in *Mentha cervina* based on morphological traits, essential oils profile and ISSRs markers. Biochem. Syst. Ecol. 2013;51:50-59. DOI 10.1016/j.bse.2013.08.014.
- Tucker A.O., Chambers H.L. *Mentha canadensis* L. (Lamiaceae): a relict amphidiploid from the Lower Tertiary. Taxon. 2002;51(4): 703-718.
- Tucker A.O., Naczi R.F.C. *Mentha*: an overview of its classification and relationships. In: Lawrence B.M. (Ed.). *Mint. The Genus Mentha*. CRC Press, 2007;3-39.
- WCSP. 2019. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: <http://apps.kew.org/wcsp/Retrieved>

ORCID ID

M.V. Semenova orcid.org/0000-0002-4627-0802
O.L. Enina orcid.org/0000-0002-8971-6384
O.V. Shelepova orcid.org/0000-0003-2011-6054

Благодарности. Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН № 118021490111-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.02.2019. После доработки 17.07.2019. Принята к публикации 22.07.2019.