

УДК 575.222.72

О.В. Уварова
А.И. Шмаков

O.V. Uvarova
A.I. Shmakov

**ВЫЯВЛЕНИЕ ГИБРИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ASPLENium* L.
С ПОМОЩЬЮ RAPD-PCR-МЕТОДА**

**DETECTION OF HYBRID ORIGIN OF *ASPLENium* SPECIES
WITH RAPD-PCR METHOD**

Аннотация. Для подтверждения гибридной природы образцов рода *Asplenium* L. с Алтая, морфологически промежуточных между *A. altajense* (Kom.) Grub. и *A. tenuicaule* Hayata, было проведено исследование с помощью RAPD-PCR. Полученные результаты показали чёткое различие между *A. altajense* и *A. tenuicaule*, а также низкий уровень генетической вариабельности обоих видов. Образцы, сочетающие признаки обоих видов, оказались генетически значительно более гетерогенными и заняли промежуточное положение между предполагаемыми родительскими видами на филогенетическом дереве. Таким образом, метод RAPD пригоден для выявления межвидовых гибридов в роде *Asplenium*. На основании анатомических, морфологических и представленных молекулярных данных предложено описание нового гибридогенного вида *A. altajense* × *A. tenuicaule*.

Ключевые слова: *Asplenium*, RAPD-PCR-анализ, гибридогенный вид.

Summary. RAPD-PCR method has been applied to confirm the hybrid origin of morphologically intermediate forms between two *Asplenium* L. species, *A. altajense* (Kom.) Grub. and *A. tenuicaule* Hayata, from Altai. Obtained data showed the distinctness of *A. altajense* from *A. tenuicaule* and low level of genetic variability within each species. Morphologically intermediate samples exhibited higher level of genetic variability and also took intermediate position on the phylogenetic tree. Thus, RAPD-method is suitable for detecting the interspecies hybrids in *Asplenium*. On the basis of anatomical, morphological characters and data of RAPD-analysis, the description of a new hybrid species *A. altajense* × *A. tenuicaule* is suggested.

Key words: *Asplenium*, RAPD-PCR-analysis, hybrid species.

Сложный в таксономическом плане и полиморфный род *Asplenium* L. насчитывает около 700 видов. В роде обычны гибридизационные процессы и локальный эндемизм. На Алтае и в Сибири наиболее сложной и интересной является ser. *Variantia* (Chind et S.H. Wu) Schmakov из секции *Composita* (Diels) Fomin ex Schmakov, где широко представлены вышеуказанные явления. До недавнего времени для Южной Сибири приводилось всего три вида из данной

Южно-Сибирский ботанический сад, Алтайский государственный университет, пр-т
Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия; e-mail: bot@asu.ru
South-Siberian Botanical Garden, Altai State University; Lenina st., 61, Barnaul, 656049, Russia

Поступило в редакцию 11.02.2010 г.

Submitted 11.02.2010

серии: *A. altajense*, *A. nesii* (под названием *A. exiguum* Bedd.) и *A. sajanense*. Во время экспедиционных работ 2004–2005 гг. в долине р. Катунь (Алтай) нами был обнаружен новый вид для Алтая – *A. tenuicaule* Hayata (Шмаков, Виане, 2005). В коллекциях гербариев Сибири он не дифференцировался от *A. altajense*, хотя представлен достаточно многочисленными сборами, часто в одном сборе с настоящим *A. altajense* (Viane, 2003). Анализ гербарных материалов ЦСБС (LE), ТГУ (ТК), АлтГУ (АЛТВ) показал довольно широкое распространение *A. tenuicaule* по территории Алтая (Флора Алтая, 2005). Кроме того, как в природе, так и в коллекциях выявлено наличие промежуточных форм между *A. altajense* и *A. tenuicaule*. Местобитанием обоих видов являются притененные, обычно карбонатные скалы. Для подтверждения гибридогенной природы промежуточных форм между указанными видами мы использовали RAPD-PCR метод.

Материалы и методы. Результаты RAPD-PCR метода можно использовать для проведения целого ряда исследований: выяснение родственных отношений внутри и между видами, определение гибридов, филогеографические вопросы и целый ряд других.

Для анализа было отобрано 17 образцов 13-ти видов р. *Asplenium*. В качестве out-group был взят вид *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newm. (табл. 1).

Для выделения ДНК использовался гербарный и живой материал. ДНК выделялась из листьев с гербарных образцов и листьев, высушенных в силикагеле. Выделение проводилось из 100 мг живой ткани или 20–30 мг сухой ткани с помощью набора DiamontDNA (ООО «АБТ»).

RAPD PCR проводилась в 25 мкл смеси (14,6 мкл H₂O; 2 мкл ДНК; 2,5 мкл 10X буфер; 2,5 мкл 25 mM MgCl₂; 2 мкл 10 mM праймера; 1,2 мкл 20 mM dNTPs; 0,2 мкл Taq-полимеразы) на термальном циклере MyCycler BioRad с использованием реактивов производства ООО «Медиген». Амплификация проводилась по следующей программе (Куцев, 2008): 6 циклов: 95°C – 30 сек, 35°C – 45 сек, 72°C – 80 сек; 36 циклов: 94°C – 45 сек, 36°C – 40 сек, 72°C – 70 сек; завершающая стадия: 72°C – 10 мин, охлаждение при 4°C.

Предварительно на 3-х образцах ДНК из имеющегося набора коммерческих декамерных праймеров Carl Roth GmbH Co. опытным путем были выявлены те, которые дают воспроизводимый полиморфный результат. В ходе анализа полученных RAPD-спектров было отобрано 5 праймеров (табл. 2).

После этого ПЦР проводилась с 17 образцами. Разделение амплифицированных RAPD-фрагментов производилось в 1,5% агарозном геле и 0,5 M TAE-буфере при 2,5 В/см в горизонтальной электрофорезной камере Pharmacia LKB-GNA 200. После электрофореза гель окрашивался раствором ЕВ в концентрации 2,5 мг/л и фотографировался в проходящем УФ-излучении. Для определения длин фрагментов ДНК использовался маркер молекулярной массы 1Кб (ООО «Медиген», Новосибирск).

Обсуждение. В результате проведенных исследований выявлено 86 RAPD-маркеров длиной 400–2500 пар нуклеотидов (bp). Число амплифицированных фрагментов ДНК в суммарной выборке варьировало в зависимости от

Таблица 1

Исследованные образцы р. *Asplenium* L.

№	Название вида	Место и дата сбора	Коллекторы
1	<i>A. pesii</i> Christ.	РОССИЯ, Республика Алтай, левый берег р. Чулышман, близ устья р. Утукая. 50°59'52" N 88°03'48" E, H=608 м. 07.09.2008 г.	Шмаков А.И., Кечайкин А.А., Зубов Р.А., Боровиков В.С.
2	<i>A. sajanense</i> Gudoshchn. et Krasnob.	РОССИЯ, Красноярский край, хр. Борус, перевал из басс. р. Бол. Шушь в р. Бол. Берёзовая, южный макросклон, H=1130 м, травянистый склон с выходами серпентинита, 52°56' с.ш., 92°06,3'в.д. 26.VII.2005г.	Шмаков А.И., КуцевМ.Г., Ваганов А.В., Костюков С.А.
3	<i>A. ruta-muraria</i> L.	РОССИЯ, Республика Алтай, левый берег р. Чулышман, близ устья р. Кендир. 51°00'24" N 88°01'39" E, H=580 м. 07.09.2008 г.	Шмаков А.И., Кечайкин А.А., Зубов Р.А., Боровиков В.С.
4	<i>A. septentrionale</i> (L.) Hoffm.	РОССИЯ, Республика Алтай, левый берег р. Чулышман, близ устья р. Кендир. 51°00'24" N 88°01'39" E, H=580 м. 07.09.2008 г.	Шмаков А.И., Кечайкин А.А., Зубов Р.А., Боровиков В.С.
5	<i>A. viride</i> Huds.	РОССИЯ, Красноярский край, хр. Борус, перевал из басс. р. Бол. Шушь в р. Бол. Берёзовая, южный макросклон, H=1130 м, травянистый склон с выходами серпентинита, 52°56' с.ш., 92°06,3'в.д. 26.VII.2005г.	Шмаков А.И., КуцевМ.Г., Ваганов А.В., Костюков С.А.
6	<i>A. trichomanes</i> L.	РОССИЯ, Республика Алтай, левый берег р. Чулышман, близ устья р. Утукая. 50°59'52" N 88°03'48" E, H=608 м. 07.09.2008 г.	Шмаков А.И., Кечайкин А.А., Зубов Р.А., Боровиков В.С.
7		Республика Алтай, Чемальский р-н, долина р. Кагунь, правый берег, окр. с. Чемал, 51°22,5' с.ш., 86°0,05' в.д. 26.08.2007 г.	Шмаков А.И., Ваганов А.В. Уварова О.В.
8	<i>A. altajense</i> (Kom.) Grub.	РОССИЯ, Республика Алтай, левый берег р. Чулышман, близ устья р. Утукая. 50°59'52" N 88°03'48" E, H=608 м. 07.09.2008 г.	Шмаков А.И., Кечайкин А.А., Зубов Р.А., Боровиков В.С.
9		РОССИЯ, Республика Алтай, левый берег р. Чулышман, близ устья р. Саратин. 50°59'46" N 88°04'04" E, H=655 м. 07.09.2008 г.	Шмаков А.И., Кечайкин А.А., Зубов Р.А., Боровиков В.С.

Продолжение таблицы 1

№	Название вида	Место и дата сбора	Коллекторы
10	<i>A. adiantum-nigrum</i> L.	Belgium, Walloon Region, Marcourt, valley of Lounthe near the mouth of Rau de Nahiai, 50°13'19" N 05°31'15" E 07.10.2005 г.	Shmakov A.I., Smirnov S.V., Kutzev M.G., Vaganov A.V.
11	<i>A. tenuicaule</i> Hayata	Республика Алтай, Улаганский р-н, Айгулакский хр., долина р. Чуя, окр. водопада, 5 км ниже устья р. Айгулак, 50°21' с.ш., 87°13' в.д. 09.08. 2003 г.	Смирнов С.В., Наумов И.В., Зубов Р.А.
12		Республика Алтай, Чемальский р-н, долина р. Катунь, левый берег урочища Аккая, 51°08' с.ш., 86°52' в.д. 22.07.2004 г.	Шмаков А.И., Ваганов А.В., Герман Д.А., Костюков С.А.
13	<i>A. altajense</i> × <i>tenuicaule</i> A.×(182)	Республика Алтай, Чемальский р-н, долина р. Катунь в 4 км ниже с. Еланда, правый берег, 51°19,8' с.ш., 86°01,2' в.д. 26 августа 2007 г.	Шмаков А.И., Ваганов А.В., Уварова О.В.
14	<i>A. altajense</i> × <i>tenuicaule</i> A.×(183)	Республика Алтай, Чемальский р-н, долина р. Катунь в 4 км ниже с. Еланда, правый берег, 51°19,8' с.ш., 86°01,2' в.д. 26 августа 2007 г.	Шмаков А.И., Ваганов А.В., Уварова О.В.
15	<i>A. altajense</i> × <i>tenuicaule</i> A.×(184)	Республика Алтай, Чемальский р-н, долина р. Катунь в 4 км ниже с. Еланда, правый берег, 51°19,8' с.ш., 86°01,2' в.д. 26 августа 2007 г.	Шмаков А.И., Ваганов А.В., Уварова О.В.
16	<i>A. incisum</i> Thunb.	Дальний Восток, культивируется в оранжерее ЮСБС АлтГУ	
17	<i>Phyllitis scolopendrium</i> (L.) Newm.	Культивируется в оранжерее ЮСБС АлтГУ	

праймера от 15 (А-12) до 21 (А-04). Для количественной оценки степени полиморфизма изучаемых видов полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой присутствие компонента обозначалось как 1, отсутствие – как 0. На основе этой матрицы с использованием коэффициента Р. Jaccard (1908) была рассчитана матрица сходства видов. По ней был проведен иерархический кластерный анализ (UPGMA) и построена дендрограмма (рис. 1).

Анализ дендрограммы показывает низкую степень внутривидовой вариабельности *A. altajense* и *A. tenuicaule*, при этом межвидовая дифференциация очень сильная. Положение гибридов *A. altajense* × *tenuicaule* в филогенетической схеме позволяет сделать вывод об обособленности образцов *A. × (182, 183)* и *A. × (184)* от остальных видов на уровне, характерном для других видов. При этом *A. × (182)* и *A. × (183)* генетически практически не различаются.

Таблица 2

ПраЙмеры, использованные для RAPD-PCR

№	Название праймера	Последовательность	Количество амплифицированных фрагментов
1	A-04	5'- AATCGGGCTG-3'	21
2	A-07	5'- GAAACGGGTG-3'	16
3	A-09	5'- GGGTAACGCC-3'	17
4	A-10	5'- GTGATCGCAG -3'	17
5	A-12	5'- TCGGCGATAG -3'	15

Выводы. На основе проведенного анализа можно сделать заключение о пригодности RAPD-метода для межвидовой дифференциации в роде *Asplenium*, а также выявления родства и положения гибридных видов в филогенетической системе. На основе анатомо-морфологических признаков и данных RAPD-анализа предложено описание нового вида гибридного происхождения *A. alta-jense* × *A. tenuicaule*.

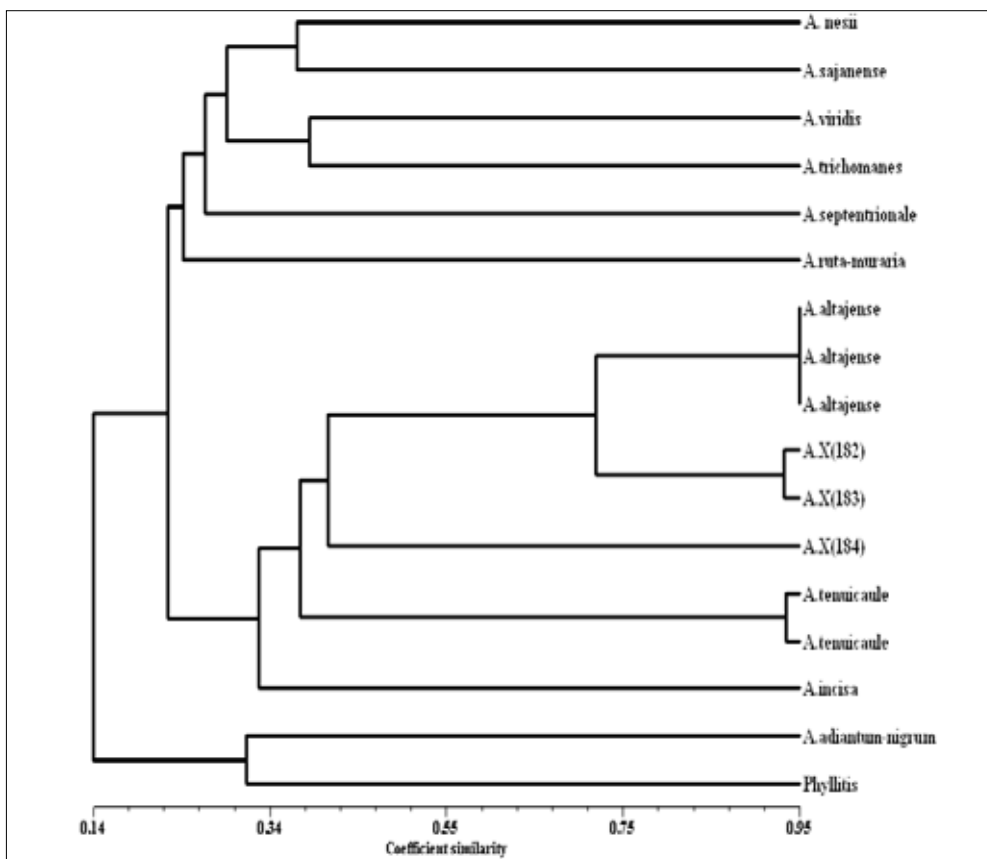


Рис. 1. UPGMA-дендрограмма сходства видов рода *Asplenium* L. на основе RAPD-PCR.

ЛИТЕРАТУРА

Куцев М.Г. Популяционная изменчивость *Achnatherum splendens* (Trin.) Nevski, выявленная с помощью RAPD-маркеров // *Turczaninowia*, 2008. – Т. 11, вып. 4. – С. 86–94.

Флора Алтая. Том 1 / Коллектив авторов. Отв. ред. и ред. тома Р.В. Камелин. – Барнаул: АзБука, 2005. – 340 с.

Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale // *Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 1908. – Vol. 44. – P. 223–270.

Viane R.L.L., Reichstein T. Notes on new or interesting *Asplenium* species from western Asia, including comments on Ching & Wu (1985), and Fraser-Jenkins (1992). *Reliquiae Reichsteinianae* / Chandra, S. and Srivastava, M., eds. *Pteridology in the new Millenium*. – Kluwer Academic Publishers, 2003. – P. 73–105.