

УДК: 582.711.714:577.21

МОЛЕКУЛЯНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНВАЗИОННЫХ ВИДОВ ИРГИ (*Amelanchier* Medik.)

© 2017 Куклина А.Г.*, Кузнецова О.И.**, Шанцер И.А.***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад
им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, 127276;
e-mail: * alla_gbsad@mail.ru; ** oikuznets@gmail.com; *** ischanzer@gmail.com

Поступила в редакцию 10.11.2017

При обследовании популяций инвазионных видов *Amelanchier spicata* и *A. alnifolia* в Европейской части России, кроме типичных морфотипов, обнаружены трудно определяемые варианты, характеризующиеся промежуточными признаками. Молекулярно-генетический анализ ядерных участков ITS1-2 выявил внутригеномный полиморфизм, вероятно, свидетельствующий о гибридогенном происхождении *A. spicata*. Прослежены генеалогические отношения гаплотипов ITS1-2 инвазионного вида *A. spicata*, позволяющие связать его образование с гибридизацией при участии *A. humilis* и *A. alnifolia* и установить гипотетическую область происхождения исходных форм в Северной Америке.

Ключевые слова: *Amelanchier*, инвазионные виды, гибридизация, сети гаплотипов, ITS, *trnL-trnF*.

Введение

В Средней России в последние десятилетия усиливается экспансия чужеродных видов. Ведущее положение в инвазионном компоненте региона занимают эргазиофиты североамериканского происхождения (более 50%): [Виноградова и др., 2010], в том числе представители рода *Amelanchier* Medik. (Rosaceae, Maloideae), систематика которых сложна и нуждается в ревизии. Из 18 видов ирги, естественно обитающих в Северной Америке [Campbell et al., 2014], у *A. alnifolia* (Nutt.) Nutt., *A. canadensis* (L.) Medik., *A. arborea* (Michx. f.) Fern. и ряда других видов выявлены агамные комплексы [Cruise, 1964; Robinson, 1982; Campbell et al., 1987, 1997], полиплоидия и межвидовая гибридизация [Weir et al., 1996; De Barba et al., 2014; Burgess et al., 2014, 2015; Sheltra, 2015]. Среди них диплоиды, размножающиеся половым путём, достаточно хорошо отличаются друг от друга и могут рассматриваться как виды с точки зрения различных концепций вида, в то время как апомиктически размножающиеся полиплоиды обычно рассматриваются, как микровиды [Majeski et al., 2017].

Распространённые в Европе чужеродные *A. lamarckii* Schroeder и *A. confusa* Nylander не

встречаются в Северной Америке; согласно европейским исследователям [Schroeder, 1970, 1972], первый вид возник в результате естественной гибридизации североамериканских интродуцированных видов *A. canadensis* и *A. arborea*, а второй, скорее всего, – от *A. laevis* Wieg. и *A. alnifolia* в Европе. В отличие от *A. lamarckii* и *A. confusa*, популяции или клоны которых в качестве натурализовавшихся во вторичном ареале весьма ограничены, *A. spicata* (Lam.) S.Koch не только широко распространена по всему востоку Северной Америки [Campbell et al., 2014], но и натурализовалась в большом числе стран Европы и в России [Schroeder, 1970; Куклина, 2006а; Kabuse, 2007]. Впрочем, американскими ботаниками высказывалось и иное мнение, что *A. spicata*, представляет собой таксон, возникший при гибридизации интродуцированных видов в Европе, а в Северной Америке не встречается вообще [Fernald, 1946], так же, как *A. lamarckii* и *A. confusa*. Известно мнение о конспецифичности *A. spicata* и распространённой на востоке Северной Америки *A. humilis* Wieg. (syn. *A. stolonifera* Wieg) [Jones, 1946; Campbell et al., 2014], которые сходны между собой по тенденции к активному вегетативному размноже-

нию за счёт образования разветвлённой системы подземных корневищ, а также низкорослостью (до 1.5 м высотой). Это противоречит представлениям об *A. spicata*, сложившимся в Европе и России, где к этому виду относят вполне высокорослые кустарники до 8 м высотой [Schroeder, 1970]. Таким образом, проблема идентификации *A. spicata* до сих пор остаётся нерешённой. Этот вид в 1783 г. Ж.-Б. Ламарк [Lamarck, 1783] описал как *Crataegus spicata* Lam. по культивируемым в Королевском ботаническом саду в Париже образцам, указав, что он считается широко распространённым в Канаде и выращивается в Королевском саду и садах экзотических растений: «On prétend que cet arbrisseau se trouve au Canada. On le cultive au Jardin du Roi & dans les jardins des Curieux, ainsi que le suivant...» [Т. 1, р. 84]. Однако происхождение его, североамериканское или европейское, до настоящего времени остаётся неясным. Для большинства изученных североамериканских образцов *A. spicata* известно только тетраплоидное число хромосом $2n=68$ [Burgess et al., 2014]. Данные о последовательностях ITS *A. spicata* в GenBank отсутствуют.

Согласно изданию «Флора Восточной Европы», *A. spicata* встречается во всех районах, за исключением Крыма и Арктики [Цвелёв, 2001]. Во многих местонахождениях, она ведёт себя не просто как натурализовавшийся, но как инвазионный вид, внедряющийся под полог естественных лесных сообществ, поэтому внесена в «чёрный список» (black-list) видов Средней России [Виноградова и др. 2010], а в таких регионах, как Тверская [Виноградова и др., 2011], Ярославская и Брянская области, *A. spicata* стала видом-трансформером [Kuklina, 2011].

Кроме *A. spicata*, в России натурализовалась *A. alnifolia*, хотя её роль в инвазионном процессе менее заметна, но известны локальные, устойчивые в северных районах (до 59° с. ш.), популяции [Цвелёв, 2001; Куклина, 2008]. В экспериментах, проведённых в ГБС РАН, у *A. spicata* и *A. alnifolia* отмечена склонность к индуцированному апомиксису [Куклина, Асбаганов, 2012].

В настоящее время нами накоплен фактический материал, подтверждающий наличие трудно идентифицируемых образцов, имеющих промежуточные признаки между *A. spicata* и *A. alnifolia*. Впервые в России о такой находке, сделанной в 1995 г. в Ленинградской обл. близ пос. Громово (Цвелёв, № 689, LE), сообщил Н.Н. Цвелёв, но растения, морфологически промежуточные между *A. spicata* и *A. alnifolia*, находили и ранее, например, в 1984 г. в Швеции [Thögersen, 1988]. Н.Н. Цвелёв первоначально определял такие растения, как *A. alnifolia*, но позже предположил, что их следует относить к *A. confusa* [Цвелёв, 2011]. Тот факт, что у них не наблюдалось развития генеративных органов, может указывать на их возможное гибридное происхождение.

Многолетний мониторинг инвазионных популяций *A. spicata* в Средней России [Куклина, 2006б, 2014] позволил обнаружить в 2012 г. в Воскресенском р-не Московской обл. в природном заказнике «Сосновые леса на песчаных дюнах» более 50 взрослых, трудно идентифицируемых особей *Amelanchier* (гербарные образцы находятся в МНА). По габитусу они были сходны с типичной *A. spicata* – многочисленными параллельными стволами высотой около 6–7 м, но отличались ослабленным цветением и яйцевидной формой листа с крупными и редкими зубцами по краю, особенно заметными на ростовых побегах. За 6 лет наблюдений (2012–2017 гг.) у растений в возрасте 25 лет и старше лишь в 2016 и 2017 гг. наблюдалось формирование одиночных цветков и плодов. Несмотря на отклонения в генеративной сфере, инвазионная активность особей *Amelanchier* sp. сохраняется за счёт формирования длинной и разветвлённой системы ксилоризомов. Листовая пластинка московских образцов не похожа на *A. spicata* и *A. alnifolia*, но сходна с растениями из Швеции [Thögersen, 1988] и обнаруженными в Ленинградской обл. (рис. 1 А). В 2015 г. М.В. Казакова с коллегами [личное сообщение] обнаружила две микропопуляции ирги с такой же (рис. 1 В, С), не характерной для *A. spicata*, формой листа в Касимовском и Старожиловском р-нах Рязанской обл. (гербарные образцы хранятся в RSU и МНА).



Рис. 1. Гербарные сборы *Amelanchier* sp. в Ленинградской (А), Московской (В) и Рязанской (С) областях европейской части России.

Целью настоящей работы было попытаться прояснить происхождение инвазионного вида *A. spicata* и предположительно гибридных с *A. alnifolia* образцов, однозначная идентификация которых затруднена, из европейской части России с использованием молекулярно-генетических маркеров.

Материалы и методы исследования

Для выделения ДНК были использованы 20 образцов *Amelanchier* из собственных сборов А.Г. Куклиной (табл. 1), включая использованные в качестве внешней группы межродовой гибрид *Amelasorbus jackii* Rehd. и *Sorbus aucuparia* L.

ДНК выделяли с помощью коммерческого набора для экстракции растительной ДНК NucleoSpin Plant Kit (Macherey-Nagel, Germany). Для амплификации хлоропластного участка *trnL-F* применена пара праймеров *rgC* и *rgF*, позволяющая получить полные последовательности интрона и 3'-экзона гена *trnL*, а также спейсера между генами *trnL* и *trnF* [Taberlet et al., 1991]. Для амплификации ядерного внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ДНК ITS1-2 использованы праймеры C26A и NNC18S10 [Wen, Zimmer, 1996].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе DNA Engine Diad (BioRad, США) по следующей схеме: 3 мин – 94 °C, 32 цикла (30 с – 94 °C, 30 с – 58 °C, 60 с – 72 °C), 2 мин – 72 °C. Полученные продукты ПЦР анализировали путём электрофореза в 1%-м агарозном геле с добавлением EtBr в 0.5гTBE-буфере в течение 20 мин, затем очищали пересаживанием в 0.125%-м растворе ацетата аммония в 70%-м этаноле. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводили методом циклического секвенирования с использованием набора реагентов (ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) на базе компании «Синтол» (Москва, Россия). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили вручную в программе BioEdit v. 7.0.7.0 [Hall, 1999]. Полученные последовательности ДНК депонированы в GenBank NCBI: 20 образцов ITS1-2 (№№ KY661716-KY661735); 10 образцов *trnL-trnF* (№№ KY799087-KY799096) [www.ncbi.nlm.nih.gov].

В анализ также были включены последовательности *A. alnifolia* var. *alnifolia*, *A. alnifolia* var. *semiintegrifolia* (Hook.) C.L. Hitchc., *A.*

Таблица 1. Характеристика материала исследования (сборы 2003–2015 гг.)

Таксон	№ образца/ популяции	Происхождение образца	GPS координаты	Гаплотип ITS
<i>A. ovalis</i>	1b-2007	Горный Крым, Ялтинский р-н, Никитская яйла, выше пос. Никита	N 44.5195° E 34.2347°	o1
<i>A. ovalis</i>	2b-2010	Ленинградская область, Приозерский р-н, станция БИН РАН «Отрадное»	N 60.8294° E 30.1229°	o2
<i>A. arborea</i>	3b-2003	Орловская область, Орловский р-н, ВНИИСПК	N 52.8194° E 36.5075°	c1
<i>A. canadensis</i>	1.1-2014	Москва, ГБС РАН, питомник	N 55.8385° E 37.5882°	c2
<i>A. alnifolia</i>	3.1-2014	Москва, ГБС РАН, дендрарий	N 55.8442° E 37.5897°	a1
<i>A. alnifolia</i>	3.2-2015	Московская область, Орехово- Зуевский р-н, с. Хотееичи, посадки	N 55.7989° E 38.6993°	a1
<i>A. alnifolia</i>	5b-2008	Санкт-Петербург, БИН РАН, дендрарий	N 59.9698° E 30.3262°	a2
<i>A. alnifolia</i>	6b-2006	Коми-Пермяцкий АО, Пермский край, г. Кудымкар, заброшенный питомник	N 59.0076° E 54.6853°	a3
<i>A. alnifolia</i>	10b-2008	Санкт-Петербург, остров Елагино, парк	N 59.9807° E 30.2521°	a1
<i>A. spicata</i>	2.1-2014	Москва, ГБС РАН, дендрарий	N 55.8442° E 37.5897°	a1
<i>A. spicata</i>	2.3-2015	Московская область, Орехово- Зуевский р-н, с. Хотееичи, сосняк	N 55.7989° E 38.6993°	a1
<i>A. spicata</i>	7b-2015	Московская область, Орехово- Зуевский р-н, с. Хотееичи, сосняк	N 55.7989° E 38.6993°	a1
<i>A. spicata</i>	8b-2010	Московская область, Балашихинский р-н, пос. Горенки, старый парк	N 55.8086° E 37.9164°	a1
<i>A. spicata</i>	9b-2008	Санкт-Петербург, БИН РАН, дендрарий	N 59.9698° E 30.3269°	a1
<i>A. spicata</i> × <i>A. alnifolia</i>	5.1-2015	Московская область, Воскресенский р-н, севернее пос. им. Цюрупы	N 55.5196° E 38.6937°	–
<i>A. spicata</i> × <i>A. alnifolia</i>	5.2-2015	Там же	N 55.5196° E 38.6937°	–
<i>A. spicata</i> × <i>A. alnifolia</i>	5.3-2015	Там же	N 55.5196° E 38.6937°	a4
× <i>Amelasorbus jackii</i>	4.1-2014	Москва, ГБС РАН, дендрарий	N 55.8442° E 37.5897°	–
<i>Sorbus aucuparia</i>	7.1-2014	Москва, ГБС РАН, дендрарий	N 55.8442° E 37.5897°	–
<i>S. aucuparia</i>	6.1-2014	Московская область, Воскресенский р-н, южнее пос. им. Цюрупы	N 55.5196° E 38.6937°	–

ovalis Medik., *A. canadensis*, *A. arborea*, *A. laevis*, *A. stolonifera*, *A. bartramiana* (Tausch) M.Roem., *A. florida* Lind., *A. utahensis* Koehne, *A. humilis*, *A. pallida* Greene, *A. parviflora* Boiss. и *A. asiatica* (Sieb. & Zuc.) Endl., взятые из базы данных GenBank NCBI [Campbell et al., 1997; Lo et al., 2007; Lo, Donoghue, 2012; De Barba et

al., 2014; Zarrei et al., 2014; Burgess et al., 2015]. В качестве внешней группы использованы последовательности *Sorbus aucuparia*, *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. и *Peraphyllum ramosissimum* Nutt. Полученные данные проанализированы методами Neighbor Joining и Neighbor Net в программе SplitsTree4 [Huson,

Bryant, 2006] и статистической парсимонии в программе TCS [Clement et al., 2000].

Для морфометрических измерений было взято по 3 гербарных листа для трёх изучаемых таксонов (образцы 3.2-2015, 2.3-2015, 5.3-2015), использованных в секвенировании. У каждого образца измеряли по 10–15 листьев и соцветий, чтобы понять укладываются ли значения измерений в амплитуду вариабельности морфологических признаков таксона. Для каждого образца с помощью цифрового микроскопа Keyence VHX1000 измеряли чашелистики, лепестки, тычинки, пестики (по 15 штук) и пыльцевые зёрна (по 35 штук). Размеры пыльцевых зёрен определяли на свежесобранной пыльце в фазе начала цветения без добавления воды на предметное стекло. Объём

пыльцевых зёрен вычисляли по формуле для сфероида $V=4/3\pi \times a^2 \times b$, где a – 1/2 экваториального диаметра (D); b – 1/2 полярной оси (L). Фертильность пыльцевых зёрен выявляли окрашиванием их ацетокармином при незначительном нагревании с последующим просмотром предметных стёкол в 5 полях зрения микроскопа. Полученные результаты обработаны с использованием Microsoft Excel. Допустимая ошибка измерений не превышала нормы ($P \leq 5\%$).

Результаты и их обсуждение

1. Морфологические признаки

В таблице 2 приведены результаты измерения морфологических признаков трёх образцов *Amelanchier* из Московской обл., которые

Таблица 2. Морфометрические признаки у образцов *Amelanchier*

Признак		<i>A.alnifolia</i> 3.2-2015	<i>A.spicata</i> 2.3-2015	<i>A. spicata</i> × <i>A. alnifolia</i> 5.3-2015
Куст	Высота, м	5.5	8	7
Зубцы листовой пластинки	Число с одной стороны листа	9–14* (11.3±1.9)**	12–29 (21.3±6.4)	10–24 (21.2±7.1)
	Число на 1 см	2–5 (3.6±1.2)	5–8 (6.4±1.9)	2–4 (3.1±0.7)
Соцветие	Число цветков	8–15 (13.4±2.6)	7–12 (9.2±2.8)	6–9 (7.3±1.6)
	Длина, мм	42–58 (60.1±9.7)	40–50 (42.7±7.6)	38–50 (45.0±8.9)
Чашелистик	Длина, мм	4.0–4.8 (4.4±0.11)	3.2–4.9 (4.0±0.36)	3.1–5.7 (4.5±0.48)
	Ширина, мм	1.0–1.3 (1.2±0.21)	1.1–1.3 (1.2±0.11)	0.6–1.0 (0.9±0.30)
Лепесток	Длина, мм	8.0–12.7 (9.5±0.90)	7.7–10.4 (8.6±0.40)	7.7–8.9 (8.0±0.41)
	Ширина, мм	3.5–6.4 (5.3±0.71)	4.1–5.3 (5.1±0.27)	3.9–4.2 (4.0±0.52)
Тычинка	Длина, мм	1.6–3.3 (2.6±0.40)	1.6–2.9 (2.3±0.61)	2.3–2.6 (2.5±0.20)
Пыльник тычинки	Длина, мм	0.34–0.56 (0.45±0.18)	0.42–0.52 (0.47±0.10)	0.40–0.52 (0.46±0.08)
	Диаметр, мм	0.47–0.67 (0.57±0.01)	0.54–0.63 (0.58±0.06)	0.42–0.59 (0.56±0.07)
Столбик пестика	Длина, мм	3.0–3.24 (3.12±0.12)	2.47–2.80 (2.16±0.22)	2.80–3.10 (3.0±0.38)
	Диаметр, мм	0.65–0.67 (0.66±0.03)	0.53–0.60 (0.50±0.10)	0.38–0.52 (0.44±0.03)

Примечания. * Перед скобками указаны максимальные и минимальные значения; ** в скобках указаны среднее арифметическое и среднее квадратичное отклонение ($M \pm \sigma$).

Таблица 3. Характеристика пыльцевых зерен у образцов *Amelanchier*

Признак	<i>A. alnifolia</i> 3.2-2015	<i>A. spicata</i> 2.3-2015	<i>A. spicata</i> × <i>A. alnifolia</i> 5.3-2015
Длина полярной оси (L), мкм	33.4–45.1* (40.1±0.6)	32.6–46.2 (38.4±0.5)	35.5–48.5 (42.1±0.6)
Экваториальный диаметр (D), мкм	16.9–30.6 (23.0±0.5)	21.2–26.6 (24.2±0.3)	17.9–29.2 (23.1±0.4)
Отношение L/D	1.31–2.26 (1.77±0.04)	1.41–1.89 (1.59±0.01)	1.49–2.18 (1.84±0.03)
Средний объём, мкм ³	11267.0	11872.5	11748.3
Фертильность пыльцы, %	98.0	100.0	80.1

* См. примечания к табл. 2.

показывают, что предположительные гибриды *A. spicata* × *A. alnifolia* сходны с *A. spicata* по высоте кустов, числу зубцов с одной стороны листа и длине лепестков, а с *A. alnifolia* – по числу зубцов на 1 см листа. От обоих родительских видов (соответствующих видовым характеристикам) они отличаются более узкими лепестками и меньшим числом цветков в соцветии. Остальные изученные признаки варьируют и, в целом, промежуточные между *A. spicata* и *A. alnifolia*.

Исследование пыльцевых зёрен у образцов, отнесённых к *A. spicata* × *A. alnifolia*, выявило, что им свойственна более вытянутая форма (средняя L = 42.1 мкм, L/D = 1.84), хотя по объёму и фертильности (80.1%) они практически не отличаются от образцов *A. alnifolia* и *A. spicata* (табл. 3).

2. Молекулярно-генетический анализ

Молекулярно-генетический анализ локуса *trnL-trnF* хлоропластной ДНК не выявил различий между *A. canadensis*, *A. alnifolia*, *A. spicata* и предположительными гибридами *A. spicata* × *A. alnifolia* (7 наших образцов и 3 из GenBank). Поэтому в дальнейшем анализе этот участок не использовался.

Для ядерных участков ДНК (ITS1 – 5.8S – ITS2) общая длина выравнивания составила 578 нуклеотидных позиций. Последовательности, секвенированные нами от образцов *Amelanchier* из европейской части России все оказались полиморфны, то есть в них наблюдалось неоднозначное прочтение нуклеотидов в целом ряде позиций. Это, несомненно, ука-

зывает на присутствие в геноме нескольких различных копий ITS. Такой полиморфизм последовательностей ITS характерен для всех изученных в этом отношении видов *Amelanchier* [Campbell et al., 1997], что свидетельствует о широком распространении межвидовой гибридизации. Так как клонирование нами не проводилось, эти последовательности были введены в общее выравнивание с указанием полиморфных нуклеотидов в соответствующих позициях.

Филогенетическое дерево, построенное методом NJ, приведено на рисунке 2. По своей топологии оно совпадает с деревом, построенным методом Байеса по данным совместного анализа последовательностей ITS и ETS в работе [Burgess et al., 2015], посвящённой филогенетическому анализу диплоидных видов ирги. Хотя величина бутстреп поддержек в нашем случае получилась низкой, для поставленных нами целей это не имеет значения. На дереве выделяются те же клады, что и в упомянутом исследовании.

Все исследованные образцы на филогенетическом дереве сгруппировались в три клады (О, В, А). Клада О включает евроазиатские виды *A. ovalis*, *A. asiatica* и *A. parviflora*, каждый из которых формирует самостоятельную кладу. Наши образцы *A. ovalis* 1b-2007 и 2b-2010 корректно кластеризуются с нуклеотидными последовательностями своего вида. Клада В включает последовательности *A. bartramiana*, *A. arborea*, *A. canadensis* и *A. laevis*, также образующими самостоятельные клады. Наш образец *A. arborea* 3b-2003 клас-



Рис. 2. Положение исследованных образцов *Amelanchier* (выделены полужирным) на филогенетическом дереве, построенном методом NJ.

теризовался глубоко внутри клады *A. canadensis*, хотя и с низкой бутстреп поддержкой (вероятно, это связано с неверным определением образца).

Клада А включает последовательности *A. alnifolia* var. *alnifolia*, *A. alnifolia* var. *semiintegrifolia*, *A. utahensis*, *A. pallida* и *A. humilis*. Наши образцы *A. alnifolia* 5b-2008, 6b-2006, 3.1-2014 и 3.2-2015 кластеризовались вместе с последовательностями *A. alnifolia*, что подтверждает их корректное определение, несмотря на низкую бутстреп поддержку. Остальные образцы, в том числе все образцы *A. spicata*, образовали две грады в основании клада А и В, соответственно. Вероятно, это связано с присутствием в этих последовательностях большого числа переменных неоднозначно прочитанных позиций. Тот факт, что они попадают не в одну, а в две клады, может ука-

зывать на происхождение *A. spicata* в результате гибридизации видов, относящихся к кладам А и В.

Так как Phi тест на рекомбинацию [Bruen et al., 2006], проведенный в программе SplitsTree4, дал отрицательный результат ($p = 0.8442$), мы сочли присутствие рекомбинантных последовательностей в выборке маловероятным. Поэтому авторы попытались прояснить их отношения, объединив последовательности в гаплотипы (риботипы) и построив сеть методом статистической парсимонии. Алгоритм программы TCS при объединении последовательностей в гаплотипы игнорирует неоднозначно прочитанные переменные позиции, что позволяет объединять в один гаплотип последовательности, различающиеся только по таким позициям. В данный анализ включены только последовательности, вошед-

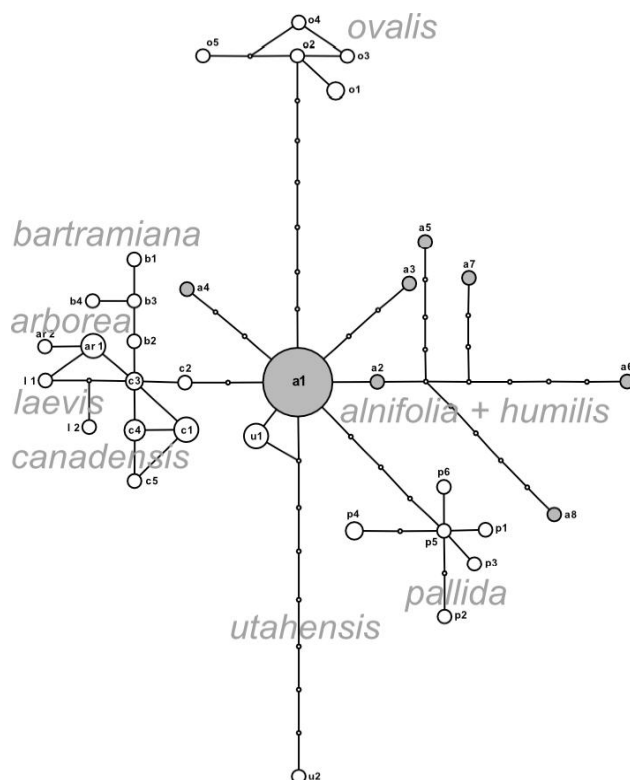


Рис. 3. Сеть гаплотипов ITS *Amelanchier*, построенная методом статистической парсимонии.

шие на дереве NJ в состав клад А и В, с укоренением сети по *A. ovalis*, входящей в сестринскую к ним кладу О. Построенная сеть содержала большое число петель, вызванных гомопластическими заменами в 243 позиции выравнивания (С/Т и Т/С). Исключение из анализа этой позиции позволило построить сеть, на которой отношения гаплотипов выявляются достаточно ясно, несмотря на наличие нескольких петель (рис. 3). Рассчитанный программой предел парсимонии, то есть максимальное число мутационных шагов, позволяющее объединить гаплотипы в одну сеть наиболее экономным образом с вероятностью выше 95%, составил 10 мутационных шагов. Всего было выделено 34 гаплотипа и 39 гипотетических гаплотипов, отсутствующих в выборке. Все включённые в анализ гаплотипы были объединены в одну сеть.

Как и на дереве NJ, последовательности образцов *A. ovalis* 1b-2007 (гаплотип o1) и 2b-2010 (гаплотип o2) корректно сгруппировались с другими гаплотипами этого вида, составившими внешнюю группу. Центральным гап-

лотипом сети, связанным с гаплотипами внешней группы, и, таким образом, корневым, оказался гаплотип a1. К нему программа отнесла все последовательности *A. alnifolia* var. *alnifolia* и *A. humilis*, взятые из GenBank, а также все наши последовательности *A. spicata* и последовательности *A. alnifolia* (10b-2008, 3.1-2014 и 3.2-2015). Этот результат крайне интересен, так как указывает, по крайней мере, на одного из вероятных родителей полиплоидной и, вероятно, гибридогенной по своему происхождению *A. spicata*.

Анализ географического распространения образцов, последовательности которых были взяты из GenBank [Burgess et al., 2015] и отнесены к гаплотипу a1, показал, что почти все они происходят с территории, в XVIII в. принадлежавшей Франции. Так, образцы *A. alnifolia* var. *alnifolia* собраны в пределах современных штатов Южная и Северная Дакота, Миннесота и Монтана, а образцы *A. humilis* – из штатов Миннесота, Мичиган, Вермонт, Нью-Йорк и канадской провинции Квебек. Вполне вероятно, что именно с этой части пер-

вичного ареала и происходил исходный материал, культивированный в Королевском ботаническом саду в Париже, по которому Ж.-Б. Ламарк описал *Crataegus spicata*, так как до 1763 г. все эти территории, кроме Нью-Йорка, были французскими колониями. Мнения по поводу места возникновения этого тетраплоидного гибрида различаются. Так, M.L. Fernald [1946] полагал, что *A. spicata* возникла в Европе после интродукции североамериканских видов во Франции в XVIII в. Однако современные авторы [Campbell et al., 2014] считают этот вид широко распространённым на востоке Северной Америки, хотя и признают, что однозначного понимания происхождения и морфологических границ этого таксона до сих пор нет. Так что без специального исследования и серьёзной таксономической ревизии североамериканских полиплоидных видов этого рода и сравнения их с материалом из вторичного ареала в Европе решить эту проблему пока не представляется возможным.

Включённые в наш анализ образцы *A. alnifolia* 5b-2008 и 6b-2006 представлены самостоятельными гаплотипами a2 и a3, производными от гаплотипа a1 и отличающимися от него 1 и 3 мутациями, соответственно. Образец 5.3-2015, определённый по морфологическим признакам как *A. spicata* × *A. alnifolia*, показан в сети гаплотипом a4, так же производным от гаплотипа a1 и отличающимся от него 3 мутациями. Имеющиеся данные не позволяют подтвердить гибридное происхождение этого образца. Ещё более удалённые от гаплотипа a1 производные гаплотипы a5, a6, a7 и a8 соответствуют последовательностям *A. alnifolia* var. *semiintegrifolia* с запада Северной Америки.

В остальном полученная сеть вполне конгруэнтна дереву NJ. Так, гаплотипы *A. barthramiana*, *A. arborea*, *A. laevis* и *A. canadensis* образуют самостоятельную кладу, соответствующую кладе В дерева. Так же, как и на дереве, последовательность ITS образца *A. arborea* 3b-2003 группируется вместе с последовательностями *A. canadensis*, составляющими гаплотип c1, что, вероятно, связано с ошибочной видовой идентификацией этого

образца по морфологическим признакам. Образец *A. canadensis* 1.1-2014 охарактеризован гаплотипом c2, который располагается в сети между гаплотипами c1 и a1 и отличается от них 1 и 2 мутациями, соответственно. Мы полагаем, что такой результат подтверждает правильность определения образца, но также указывает на значительную близость *A. canadensis* к *A. alnifolia*. Последовательности *A. utahensis* (гаплотип u1), как и на дереве NJ, оказываются очень близкими к таковым *A. alnifolia*, за исключением одной, представленной гаплотипом u2, выделяющейся от остальных 8 мутациями. Все последовательности *A. pallida* образуют самостоятельную кладу, производную от центрального гаплотипа a1.

Заключение

Несомненно, что инвазионный вид *A. spicata*, расселяясь во вторичном ареале, претерпевает множественные микроэволюционные преобразования. В процессе освоения новых территорий он проявляет экологическую пластичность; при ослаблении семенного размножения инвазионная активность особей сохраняется за счёт разрастания системы ксилоризомов.

Проведённый нами молекулярно-генетический анализ позволяет сделать некоторые нетривиальные заключения относительно инвазионных таксонов *Amelanchier*, встречающихся в европейской части России.

Во-первых, удалось установить, что генетически очень близкие *A. alnifolia* и *A. humilis*, вполне вероятно, (один из них или оба) являются родительскими формами европейской *A. spicata*. Во-вторых, приблизительно определена область происхождения *A. spicata*, расположенная в районе североамериканских Великих озёр, а также к югу и западу от них, на территории французских колоний XVII–XVIII вв. Вполне вероятно, что исходный материал, происходивший с этой территории, был завезён в этот же промежуток времени во Францию, длительно там культивировался в ботанических садах и в результате гибридизации и полиплоидизации дал тот вид, который сейчас в Европе и России называется *A. spicata*.

Однако, для того, чтобы сделать окончательные выводы о происхождении *A. spicata* и гибридизации с другими видами *Amelanchier* во вторичном ареале и подтвердить нашу гипотезу, выдвинутую на основании промежуточности морфологических признаков у предположительных гибридов, необходимо клонировать последовательности ITS, полученные из образцов *A. spicata*, *A. alnifolia* и их предположительных гибридов, либо исследовать их с использованием многолокусных систем маркеров, таких, как AFLP.

Благодарности

Выражаем благодарность проф. М.С. Игнатову и д. б. н. Ю.К. Виноградовой за ценные замечания, высказанные при обсуждении полученных результатов, а также проф. М.В. Казаковой за сборы гербария в Рязанской области.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, проект № 15-29-02556, в рамках задания ГБС РАН «Биологическое разнообразие природной и культурной флоры: фундаментальные и прикладные вопросы изучения и сохранения» (№118021490111-5).

Литература

- Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Нотов А.А. Чёрная книга флоры Тверской области: чужеродные виды растений в экосистемах Тверского региона. М.: КМК, 2011. 292 с.
- Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В. Чёрная книга флоры Средней России: чужеродные виды растений в экосистемах Средней России. М.: ГЕОС, 2010. 512 с.
- Куклина А.Г. Возможные пути происхождения некоторых видов ирги // Нетрадиционные и редкие растения, природные соединения и перспективы их использования. Белгород: Политерра, 2006а. Т. 1. С. 38–40.
- Куклина А.Г. Изменчивость вегетативных признаков ирги колосистой (*Amelanchier spicata* (Lam.) K.Koch) в европейских инвазионных популяциях // Бюл. Гл. ботан. сада. 2006б. Вып. 191. С. 6–11.
- Куклина А.Г. Инвазионные популяции ирги ольхолистной (*Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt.) в России // Бюл. Гл. ботан. сада. 2008. Вып. 194. С. 47–56.
- Куклина А.Г. Инвазионные виды ирги (*Amelanchier spicata*, *A. alnifolia*) в лесных сообществах России // Состояние и перспективы использования недревесных ресурсов леса: Сборник статей. Пушкино: ВНИИЛМ, 2014. С. 83–86.
- Куклина А.Г., Асбаганов С.В. Апомиксис у *Amelanchier spicata* (Lam.) C. Koch и *A. alnifolia* (Nutt.) Nutt. // Бюл. Гл. ботан. сада. 2012. Вып. 198. № 1. С. 75–79.
- Цвелёв Н.Н. *Amelanchier* Medik. // Флора Восточной Европы. СПб.: Мир и семья, 2001. Т. 10. С. 552–555.
- Цвелёв Н.Н. О роде ирга (*Amelanchier* Medik., Rosaceae) в Европейской России // Новости систематики высших растений. М.; СПб.: КМК, 2011. Т. 42. С. 174–177.
- Bruen T.C., Philippe H., Bryant D.A. Simple and Robust Statistical Test for Detecting the Presence of Recombination // Genetics. 2006. Vol. 172. No. 4. P. 2665–2681. doi:10.1534/genetics.105.048975
- Burgess M.B., Cushman K.R., Doucette E.T., Frye C.T., Campbell C.S. Understanding diploid diversity: A first step in unraveling polyploid, apomictic complexity in *Amelanchier* // Am. J. Bot. 2015. Vol. 102. No. 12. P. 2041–2057. doi:10.3732/ajb.1500330
- Burgess M.B., Cushman K.R., Doucette E.T., Talent N., Frye C.T., Campbell C.S. Effects of apomixes and polyploidy on diversification and geographic distribution in *Amelanchier* (Rosaceae) // Am. J. Bot. 2014. Vol. 101. No. 8. P. 1375–1387. doi:10.3732/ajb.1400113.
- Campbell C.S., Burgess M.B., Cushman K.R., Doucette E.T., Dibble A.C., Frye C.T. *Amelanchier* // Flora of North America North of Mexico. New York; Oxford: Oxford Univ. Press, 2014. Vol. 9. P. 646–661.
- Campbell C.S., Greene C.W., Bergquist S.E. Apomixis and sexuality in three species of *Amelanchier*, Shadbuch (Rosaceae, Maloideae) // Amer. J. Bot. 1987. Vol. 74. No. 3. P. 321–328.
- Campbell C.S., Wojciechowski M.F., Baldwin B.G., Alice L.A., Donoghue M.J. Persistent Nuclear Ribosomal DNA Sequence Polymorphism in the *Amelanchier* Agamic Complex (Rosaceae) // Mol. Biol. Evol. 1997. Vol. 14 (1). P. 81–90. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025705>
- Clement T.S., Feltus J.R., Kaiser D.H., Zentall T.R. «Work ethic» in pigeons: Reward value is directly related to the effort or time required to obtain the reward // Psychonomic Bulletin & Review. 2000. No. 7. P. 100–106.
- Cruise J.E. Studies natural hybrids in *Amelanchier* // Canad. J. Bot. 1964. Vol. 42. No. 6. P. 651–663.
- De Barba M., Miquel C., Boyer F., Mercier C., Rioux D., Coissac E., Taberlet P. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet // Mol. Ecol. Resour. 2014. Vol. 14. No. 2. P. 306–323. doi: 10.1111/1755-0998.12188
- Fernald M.L. *Amelanchier spicata* not an American species // Rhodora. 1946. Vol. 48. P. 125–134.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. 1999. Ser. 41. P. 95–98.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol. Biol. Evol. 2006. Vol. 23. No. 2. P. 254–267.

- Jones G.N. American Species of *Amelanchier* // Illinois biol. monographs. Illinois: Urbana, 1946. Vol. 20. No. 2. P. 1–126.
- Kabuce N. *Amelanchier spicata* // NOBANIS – European Network on Invasive Alien Species. 2007 // (<http://www.nobanis.org>). Проверено 03.05.2007.
- Kuklina A.G. Naturalization of *Amelanchier* Species from North America in a Secondary Habitat // Russian Journal of Biological Invasions. 2011. Vol. 2. No. 2–3. P. 103–107. doi:10.1134/S2075111711020056
- Lamarck J.-B. Encyclopédie méthodique. Botanique. Paris, 1783. T. 1. 752 p.
- Lo E.Y., Donoghue M.J. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2012. Vol. 63. No. 2. P. 230–243.
- Lo E.Y., Stefanovic S., Dickinson T.A. Molecular Reappraisal of Relationships Between *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Pyreae) – Two Genera or One? // Syst. Bot. 2007. Vol. 32. No. 3. P. 596–616.
- Majeski L., Krahulec F., Vašut R.J. How apomictic taxa are treated in current taxonomy: A review // Taxon. 2017. Vol. 66. No. 5. P. 1017–1040. doi: <https://doi.org/10.12705/665.3>
- National Center for Biotechnology Information (databases). // (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Проверено 22.06.2015.
- Robinson W.A. Experimental taxonomy in the genus *Amelanchier* II // Rhodora. 1982. Vol. 84. No. 837. P. 85–100.
- Schroeder F.-G. Exotic *Amelanchier* species naturalized in Europe and their occurrence in Great Britain // Watsonia. 1970. Vol. 8. No. 2. P. 155–162.
- Schroeder F.-G. *Amelanchier* – Arten als Neophyten in Europa // Abh. Naturwiss. Verein Bremen. 1972. Bd. 37. Heft 3/3. S. 287–419.
- Sheltra M.R. Relationships of a Northern Maine Population of *Amelanchier* (Rosaceae). A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the requirements for a Degree with Honors (Biology). 2015. P. 1–23. // (<http://digitalcommons.library.umaine.edu/honors/230>). Проверено 01.09.2016.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Molecular Biology. 1991. Vol. 17. P. 1105–1109.
- Thögersen C.G. Synopsis of Broadleaved Trees and Shrubs cultivable as Ornamentals in Boreal Sweden // Robäcksdalen Meddelar: Rapport från Norrlands Lantbruks – Försöksanstalt Robäcksdalen. 1988. No. 5. P. 22–26.
- Weir B.J., Pierre R.G.St., Chibbar R.N. Isolation of DNA for RAPD analysis from leaves of the saskatoon (*Amelanchier ainifolia* Nutt.) and other horticultural crops // Canad. J. Plant Sci. 1996. Vol. 76. No. 4. P. 819–824. doi:10.4141/cjps96-139
- Wen J., Zimmer E.A. Phylogeny of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1996. No. 6. P. 167–179.
- Zarrei M., Stefanovic S., Dickinson T.A. Reticulate evolution in North American black-fruited hawthorns (*Crataegus* section *Douglasia*; Rosaceae): evidence from nuclear ITS2 and plastid sequences // Ann. Bot. 2014. Vol. 114. No. 2. P. 253–269.

MOLECULAR AND GENETIC RESEARCH OF INVASIVE SPECIES OF *AMELANCHIER* Medik.

© 2017 Kuklina A.G.*, Kuznetsova O.I.** , Schanzer I.A.***

N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the
Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276;
e-mail: * alla_gbsad@mail.ru; ** oikuznets@gmail.com; *** ischanzer@gmail.com

When examining populations of invasive species of *Amelanchier spicata* and *A. alnifolia* in the European part of Russia, we have found difficult-to-define variants of morphotypes, characterized by intermediate characters, in addition to typical morphotypes. Molecular and genetic analysis of the nuclear regions ITS1-2 revealed intragenomic polymorphism, probably indicative of hybridogenic origin of *A. spicata*. The genealogical relations of the haplotypes ITS1-2 of the invasive species *A. spicata* are traced, allowing to link its formation with hybridization involving *A. humilis* and *A. alnifolia* and to establish a hypothetical area of origin of the original forms in North America.

Key words: *Amelanchier*, invasive species, hybridization, haplotypes networks, ITS, trnL-trnF.