ГЕНЕТИКА, 2022, том 58, № 11, с. 1251–1260

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 582.734.2:575

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ РОССИЙСКИХ ВИДОВ РОДА *Spiraea* (Rosaceae) ПО ДАННЫМ НУКЛЕОТИДНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РЕГИОНА ITS ЯДЕРНОЙ рДНК

© 2022 г. Т. А. Полякова[1, *], А. В. Шатохина[1], Д. В. Политов[1]

[1]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: tat-polyakova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.
После доработки 08.06.2022 г.
Принята к публикации 15.06.2022 г.

Приводятся результаты изучения изменчивости последовательностей региона ITS рДНК для 17 видов рода *Spiraea* (Magnoliópsida: Rosaceae), встречающихся в пределах российской части ареалов и на сопредельных территориях. Результаты демонстрируют наличие однонуклеотидных замен (транзиций и трансверсий) и делеций/инсерций, в том числе специфических на уровне подродов, секций, циклов и рядов. Изменчивость в межгенном спейсере ITS1 выше, чем в ITS2. Подчеркивается высокая значимость ITS как молекулярного маркера в разрешении филогенетических взаимоотношений в роде *Spiraea*. Близкородственные виды *Spiraea*, как правило, различаются по последовательностям ITS, однако наибольшие затруднения в идентификации таксонов имеет полиморфная секция *Chamaedryon*. Филогенетический анализ, проведенный разными способами (ML, MP, BI), подтверждает монофилетическое происхождение рода *Spiraea* и древних секций *Spiraea* и *Calospira*. Сформулирована гипотеза о парафилетической природе более эволюционно молодой, разнообразной и самой богатой по числу видов секции *Chamaedryon*. Предполагается, что парафилия секции *Chamaedryon* связана с дивергенцией признаков и последующим обособлением видов наряду с многократными миграциями под влиянием контрастных экологических условий.

Ключевые слова: Spiraea, *Calospira*, *Chamaedryon*, триба Spiraeeae, ITS, рДНК, нуклеотидная изменчивость, транзиция, трансверсия, филогения, монофилия, парафилия.

DOI: 10.31857/S0016675822110091

Современные методы и подходы для решения проблем систематики и эволюции растений напрямую связаны с успешным развитием молекулярно-генетических технологий, таких как ПЦР и секвенирование. С помощью анализа нуклеотидных последовательностей того или иного вариабельного информативного участка генома растений стало возможным проверить, подтвердить или опровергнуть филогенетические гипотезы, предложенные ранее на основании сравнительно-морфологических, цитологических и/или биохимических данных.

Анализ данных по изменчивости нуклеотидных последовательностей стал неотъемлемой частью реконструкции эволюционной истории любых организмов. По мере накопления молекулярно-генетических исследований оказалось очевидным, что для решения различных задач требуются разные молекулярные инструменты из-за различающихся скоростей эволюции разных генов и геномов. Поэтому на первом этапе необходимо выбрать такой фрагмент ДНК, чтобы скорость накопления замен в нем соответствовала поставленной проблеме, в частности филогенетической.

Для изучения филогенетических взаимоотношений таксонов на уровне родов и видов таким молекулярным инструментом стал регион ITS, включающий внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5.8S цистрона ядерной рибосомной ДНК (рДНК). Медленно эволюционирующие гены рРНК используются на высших таксономических уровнях [1], в то время как на низких таксономических уровнях более эффективен анализ внутренних транскрибируемых межгенных спейсеров [2–4]. Интерес таксономистов к ITS рДНК обусловлен наличием в ее составе как эволюционно консервативных кодирующих участков, позволяющих использовать универсальные праймеры, так и быстро эволюционирующих некодирующих спейсерных последовательностей, обладающих значительной межвидовой изменчивостью. Уровень изменчивости ITS-последовательностей обычно обеспечивает более высокие уровни дивергенции и следовательно более высокое разре-

шение и более сильную поддержку в сравнении с хлоропластными локусами для одних и тех же образцов [5]. Кроме того, рибосомная ДНК дает возможность анализировать ядерный геном, тогда как цитоплазматические (хлоропластные и митохондриальные) фрагменты демонстрируют унипарентальное наследование.

Гены рРНК и межгенные спейсеры ITS присутствуют в ядерном геноме растений в виде тандемно расположенных и многократно повторенных копий, что увеличивает потенциальную пользу и надежность этих регионов в филогенетических исследованиях [3, 6], а также позволяет успешно амплифицировать их как из свежесобранных, так и из гербарных образцов, в том числе хранящихся десятилетиями. Для ITS-региона характерна быстрая, но в то же время согласованная эволюция, приводящая к гомогенизации всех копий последовательностей ITS в геноме, что позволяет проводить прямое секвенирование продуктов ПЦР с получением единственной доминирующей, а значит репрезентативной, последовательности [7]. Это особенно важно для корректной реконструкции филогении видов и родов растений.

Род *Spiraea* L. принадлежит к обширному и экономически важному семейству Розоцветные (Rosaceae Juss.). Спиреи произрастают в умеренных и субтропических зонах Северного полушария. Южная граница в Азии проходит по восточным и северным Гималаям, в Америке южная граница проходит по центральной части Мексики [8]. Род насчитывает около 20–25 таксонов на территории России и на сопредельных территориях бывших республик [9]. Основное видовое разнообразие *Spiraea* сосредоточено в Восточной Азии (около 70 видов в Китае) [10].

Согласно классификации, принятой во Флоре СССР [9], род *Spiraea* подразделяется на два подрода и три секции. В более древний подрод *Protospiraea* Nakai входят две секции: *Spiraea* Ser. с двумя видами (*S. salicifolia* L., *S. humilis* Pojark.), имеющими метелки розового цвета, и *Calospira* C. Koch, включающая три вида (*S. betulifolia* Pall., *S. beauverdiana* C.K. Schn., *S. baldschuanica* B. Fedtsch.) со сложными белыми щитками. Эволюционно более молодой подрод *Metaspiraea* Nakai включает в себя морфологически разнообразную и самую многочисленную по числу видов секцию *Chamaedryon* Ser., виды которой имеют простые щитки и зонтики белого цвета. Китайские систематики выделяют в этом подроде еще одну секцию *Glomerati* Nakai [11], которая во Флоре СССР имеет ранг ряда *Hypericifoliae* Pojark. [9] или является синонимом секции *Sciadantha* K. Koch. [12]. А. Пояркова дает более подробную классификацию секций, разделив их на циклы и ряды, опираясь при этом на такие видовые признаки, как форма и край листовой пластинки, форма и опушение годичных побегов, число наружных чешуй пазушных почек.

Существующие классификации рода *Spiraea*, предложенные разными авторами [9–13], в целом не противоречат общей идее системы рода, основанной на изменчивости морфологических признаков соцветий, и дополняют друг друга, однако не все российские виды “вписываются” в существующую систему рода, принятую китайскими систематиками [11], а также таксономические проблемы некоторых сложных видовых комплексов остаются открытыми. До сих пор общепризнанная мировая сводка по внутриродовой и внутривидовой таксономии отсутствует.

Филогения видов рода непосредственно связана с их таксономией. Ведутся работы по систематике отдельных таксонов *Spiraea* [14, 15], в том числе по хемотаксономии [16–18], по определению числа хромосом [19, 20] и установлению размера ядерного генома [21] как одних из важных маркеров для изучения полиплоидных растений. Таксономическая путаница возникает чаще всего вследствие слабых морфологических различий близкородственных видов *Spiraea*, а также способности особей образовывать спонтанные гибриды в местах симпатрии из-за отсутствия барьеров для скрещивания. Факты интрогрессивной гибридизации близких видов *Spiraea* описываются по морфологическим признакам [9, 15], переходные формы зарегистрированы в отечественных и зарубежных Гербариях, однако ни один из гибридов достоверно не подтвержден. Способность близкородственных таксонов к образованию гибридов, выявленная внутривидовая изменчивость морфологических признаков в роде *Spiraea* [14, 15], наличие полиплоидных рас, а также возможная нестабильность цитотипов за счет наличия миксоплоидии и/или анеуплоидии обусловливают возникающие неоднозначности при определении и частые ошибки в идентификации таксонов *Spiraea* [15].

Изучение рода *Spiraea* с привлечением молекулярно-генетических маркеров началось в начале 2000-х гг. с целью разрешения проблем филогении, таксономии и филогеографии [22–25]. Преимущественно используемые для идентификации видов рода *Spiraea* молекулярные маркеры – регион ITS рДНК и хлоропластный межгенный спейсер *trn*L-*trn*F.

На филогенетическом дереве, построенном на основе анализа фрагментов хлоропластного генома *trn*L-*trn*F, отсутствие согласованности корейских видов спиреи с морфологией и с географическим распространением объясняется наличием как частых ошибок в идентификации видов спиреи, так и встречающихся в естественных популяциях гибридных особей [23].

Данные по филогении рода *Spiraea*, полученные китайскими исследователями на основе анализа региона ITS и шести фрагментов хлоропластной ДНК [25], противоречат существующей системе рода *Spiraea* [9], не соответствуя делению на три группы, характеризующие секции, а также не согласуются с ранними молекулярно-генетическими исследованиями [22]. Однако в ранних работах исследовалось небольшое число видов *Spiraea* китайского, корейского и североамериканского происхождения. Филогенетические исследования российских видов *Spiraea* на основе молекулярных маркеров начаты недавно [22]. Взаимоотношения внутри рода *Spiraea*, выявленные по молекулярным маркерам позднее, также противоречивы [26] и, таким образом, полностью не разрешены.

Цель данного исследования – оценка значимости ITS-региона рДНК в филогении российских видов рода *Spiraea* и установление филогенетических взаимоотношений изученных видов *Spiraea*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) выявить изменчивость нуклеотидных последовательностей ITS-региона рДНК у наибольшего числа доступных видов рода *Spiraea*, данные по которым отсутствуют; 2) проанализировать информативность ITS-региона для выявления взаимоотношений видов *Spiraea* внутри рода; 3) провести сравнительный анализ филогенетических деревьев, построенных различными способами, и дать оценку полученным филогенетическим реконструкциям рода *Spiraea*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения ДНК использованы образцы растений, собранные лично во время полевых сборов с 2001 по 2021 гг., а также из коллекций отечественных гербариев (LE, SASY, ALTB, SVER). Всего изучено 17 видов: *S. salicifolia* L., *S. humilis* Pojark., *S. betulifolia* Pall., *S. beauverdiana* C.K. Schn., *S. chamaedryfolia* L., *S. flexuosa* Fisch. ex Cambess., *S. elegans* A. Pojark., *S. media* Schmidt, *S. sericea* Turcz., *S. dahurica* Maxim., *S. alpina* Pall., *S. trilobata* L., *S. pilosa* Franch., *S. pubescens* Turch., *S. crenata* L., *S. hypericifolia* L., *S. aquilegifolia* Pall., собранных в российской части ареалов (рис. 1).

ДНК выделяли из высушенных в силикагеле листьев, а также из гербарных образцов как по стандартным методикам для растительных тканей с применением цетилтриметиламмониумбромида (CTAB) [27], так и коммерческим набором для выделения геномной ДНК из растений – MagMAX DNA Multi-Sample Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию и количество ДНК определяли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P-Class (P-360) (IMPLEN, Германия). Для амплификации фрагментов ДНК использовали набор реагентов GenePak® PCR Core (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия). Для амплификации фрагмента ITS оперона использовали праймеры ITS6 и ITS9, разработанные для восточноазиатских видов трибы Spiraeeae [22]. Цикл амплификации включал: денатурацию при 94°C в течение 1 мин, отжиг праймеров при 58°C в течение 50 с и элонгацию при 72°C в течение 1 мин с числом циклов 30. Все полученные ПЦР-фрагменты проверяли с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле и очищали набором реагентов для быстрой элюции ДНК из агарозных гелей Diatom DNA Elution (ООО “Лаборатория Изоген”). Секвенирование фрагментов ITS проводили в ЗАО “Евроген”, а также самостоятельно на автоматическом анализаторе модели ABI PRISM 3500. Секвенирующая реакция проводилась с BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Очистка продуктов после секвенирующей реакции проводилась набором BigDye XTerminator Purification Kit. Сиквенсы просматривались в Data Collection v3.1 и считывались с помощью программного обеспечения Sequence Analysis Software v6. Сиквенсы попарно выравнены в программе BioEdit v7.0.5.3 [28], множественное выравнивание выполнено в программе ClustalW2 с последующей визуальной проверкой спорных позиций на хроматограммах.

Эволюционные построения выполнены в программе MEGA 11 [29]. Эволюционные дистанции получены методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием модели Тамуры–Нея [30], методом парсимонии (Maximum Parsimony, MP) с использованием алгоритма SPR (Subtree-Pruning-Regrafting) [31]. Консенсусные деревья построены с бутстреп-поддержкой в 1000 реплик [32]. Филогенетическая реконструкция выполнена также в программе MrBayes (BI) [33] с использованием параметров эволюционной модели GTR (General Time Reversible Model) с гамма-распределением, с 10000000 поколений с частотой сэмплирования каждое тысячное поколение. Визуализация филогенетического дерева выполнена в программе FigTree v1.4.4 [34].

Всего в предварительном анализе изменчивости ITS было охвачено около 230 нуклеотидных последовательностей, из них 200 получены нами (прямых и обратных), часть последовательностей близкородственных североамериканских и азиатских видов привлечены из EMBL/GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore). В филогенетическом анализе использовали 60 последовательностей ITS, которые характеризовались отсутствием полиморфных позиций. В качестве внешней группы взяты образцы *Physocarpus opulifolia* (L.) Maxim. и *Sorbaria sorbifolia* (L.) A. Braun. Полученные нами последовательности ITS депонированы в GenBank (KU321584–KU321585, KU321587–KU321589, KU321591).

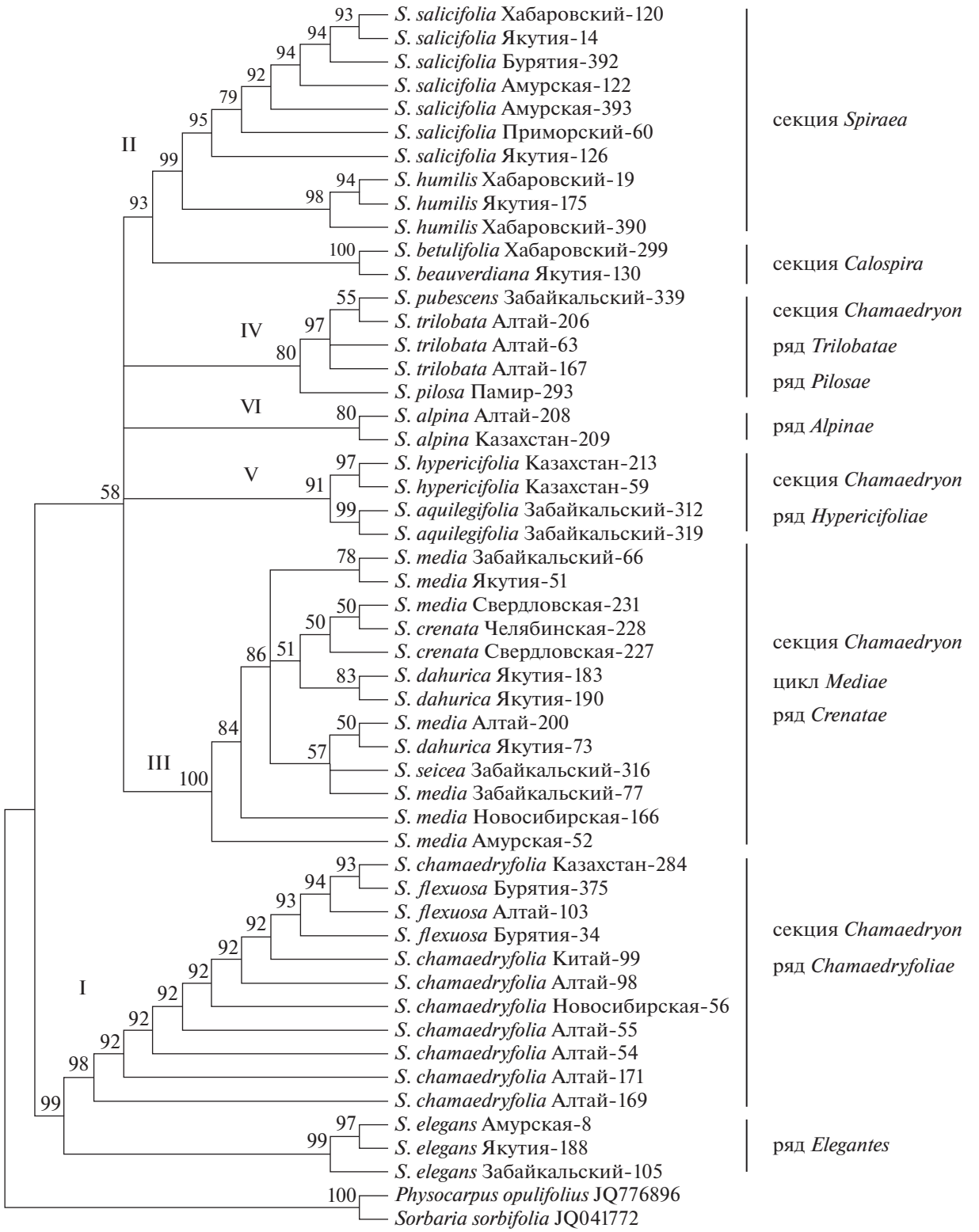

Рис. 1. Консенсусное филогенетическое дерево, построенное на основе метода максимальной парсимонии MP с использованием алгоритма Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) с 1000 реплик. В узлах ветвления указана поддержка бутстрепа (%). Узлы с поддержкой менее 50% не представлены. I–VI – номера клад.

Таблица 1. Характеристики ITS1–5.8S–ITS2 – региона рДНК у изученных видов рода *Spiraea*

Показатель	ITS1	5.8S	ITS2
Выровненная длина, пн	249–254	167	218–227
GC-состав, %	64.7	56.6	70.3
Число константных сайтов	214	164	194
Число вариабельных сайтов	45	3	37
Число филогенетически информативных сайтов	39	2	33

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость региона ITS ядерной рДНК у Spiraea

Для 12 таксонов *Spiraea* последовательности ITS-региона получены нами ранее, для многих из них впервые [35]. В данном исследовании последовательности ITS получены впервые для трех видов (*S. humilis*, *S. beauverdiana*, *S. pilosa*).

В результате амплификации с праймерами ITS6 и ITS9 для 200 образцов 17 видов *Spiraea* получены фрагменты длиной около 750 пн, включавшие полноразмерный регион ITS1–5.8S–ITS2 и частично гены 18S и 26S рРНК.

Длина ITS-региона видов *Spiraea* разного происхождения, принадлежащих ко всем известным секциям, составляет от 634 до 648 пн, из них 572 позиции являются консервативными и 74 позиции – филогенетически информативные (табл. 1). Как общая длина ITS-фрагмента, так и длины спейсеров ITS1 и ITS2 являются таксоноспецифичными [35].

Сравнительное изучение ITS-фрагментов у изученных видов *Spiraea* показало наличие как инделей, так и генных точечных мутаций – трансверсий и транзиций.

По протяженности, а также по числу константных, вариабельных и филогенетически информативных сайтов спейсеры ITS1 (6 инсерций, 36 точечных замен) и ITS2 (2 инсерции, 32 точечные замены) различаются незначительно, но спейсер ITS1 более изменчивый, что отмечалось нами ранее для сибирских видов секции *Chamaedryon* [35]. Для области гена 5.8S характерна ожидаемая консервативность, его длина составила 167 пн у всех исследуемых образцов. Уровень GC-состава высокий, более 60% (табл. 1).

Сходные данные указываются для *S. japonica* L. и ее разновидностей, для которых впервые приводится характеристика последовательностей ITS. Длина региона ITS варьирует от 632 до 639 пн, содержание GC составляет 64% [36].

Анализ нуклеотидного полиморфизма ITS-региона позволил выявить видоспецифические (аутапоморфные) нуклеотидные замены. В некоторых случаях сложно определяемый вид *S. flexuosa* отличается от родственных ему видов *S. chamaedryfolia* и *S. elegans* по пяти мутациям (транзициям и трансверсиям), расположенным как в ITS1, так и ITS2. Близкие виды *S. chamaedryfolia* и *S. elegans* различаются по трем мутациям.

Инсерции/делеции наблюдались как в области ITS1, так и ITS2. Вставка в три нуклеотида -GCT- в ITS1 обнаружена у видов секции *Spiraea* и полностью отсутствует в секции *Chamaedryon*. Инсерция -TT- в спейсере ITS1 наблюдается только у близких видов родства *S. chamaedryfolia* s.l., относящихся к секции *Chamaedryon* (ряд 1 – *Chamaedryfoliae* и ряд 2 – *Elegantes*).

Для спейсера ITS2 характерны две инсерции/делеции. В позиции 435–442 обнаружены две видоспецифические инсерции: для всех образцов *S. trilobata* – -CCCCGCG- и для *S. hypericifolia* – -ACCCCGCG-. В позиции 638–642 вставка -TTATG- наблюдается только у видов *S. salicifolia* и *S. humilis*, принадлежащих к общей секции *Spiraea*.

Филогенетический анализ видов рода Spiraea на основе последовательностей ITS-региона

Для познания эволюционной динамики рДНК и ее природы, а также распознания паралогов и псевдогенов было изучено большое число последовательностей ITS особей одного таксона и близких таксонов. Как правило, среди особей таких видов *Spiraea*, как *S. flexuosa*, *S. media*, *S. salicifolia*, часто встречаются последовательности с несколькими полиморфными позициями, подтверждающимися и при секвенировании с обратным праймером. Такие последовательности с полиморфными позициями чаще всего являются свидетельством наличия вариантов, не прошедших окончательную гомогенизацию, а следовательно они могут являться в том числе и филогенетически отдаленными последовательностями [7]. Такие особи с полиморфными позициями в филогенетический анализ не были включены. Из филогенетического анализа также были исключены последовательности морфологически очевидных предполагаемых гибридных образцов, хотя наличия гибридов на филогенетическом дереве мы не исключаем.

На основе массива данных последовательностей ITS различных видов *Spiraea* построены фи-

Таблица 2. Сравнение значений индексов бутстреп-поддержки (%) для групп, объединяющих секции и/или ряды, по результатам филогенетического анализа с использованием различных методов

Клада	ML	MP	BI
I. Секция *Chamaedryon*, ряд *Chamaedryfoliae*, ряд *Elegantes*	98	99	100
II. Секция *Spiraea*, секция *Calospira*	83	93	94
III. Секция *Chamaedryon*, цикл *Mediae*, ряд *Crenatae*	97	100	100
IV. Секция *Chamaedryon*, ряд *Pilosae*, ряд *Trilobatae*	76	80	99
V. Секция *Chamaedryon*, ряд *Hypericifoliae*	80	91	63
VI. Секция *Chamaedryon*, ряд *Alpinae*	86	80	53

логенетические деревья с применением различных методов и моделей. Все деревья (MP, ML, BI) оказались топологически схожи. Сравнение поддержки узлов для таких группировок как секции и ряды на деревьях, построенных разными методами (табл. 2), показывает более низкие значения поддержки при использовании метода максимального правдоподобия (ML) и более высокие – при использовании байесовского метода (BI).

Топология филогенетических деревьев (MP, BI) демонстрирует монофилетическое происхождение рода *Spiraea* и образование шести клад с высокими и средними бутстреп-поддержками (рис. 1, 2). Клада I объединяет близкородственные виды секции *Chamaedryon* – *S. chamaedryfolia*, *S. flexuosa*, принадлежащие к ряду *Chamaedryfoliae*, и *S. elegans* из ряда *Elegantes* [9]. Клада подразделена на две субклады – одна образована образцами *S. elegans* из различных мест произрастания, а вторая объединяет виды ряда *Chamaedryfoliae*, однако образцы *S. flexuosa* попадают между образцами *S. chamaedryfolia* различного происхождения (рис. 1), что указывает либо на подвидовой ранг *S. flexuosa,* либо на принадлежность особей к гибридным.

В кладу II вошли две древние секции: *Spiraea* (с близкими видами *S. salicifolia*, *S. humilis*) и *Calospira* (с близкими видами *S. betulifolia*, *S. beauverdiana* цикла *Betulifoliae* по Поярковой [9]). На дереве близкие виды *S. salicifolia* и *S. humilis* хорошо дифференцированы, так же как и *S. betulifolia* и *S. beauverdiana* образующие отдельную субкладу.

Клада III включает близкие виды секции *Chamaedryon* цикла *Mediae* (*S. media*, *S. sericea*, *S. dahurica*) и ряда *Crenatae* (*S. crenata*). Эти виды слабо дифференцированы на филогенетических деревьях (рис. 1, 2), возможны особи гибридного происхождения.

Клады IV, V и VI демонстрируют более низкие поддержки (63–99%) в сравнении с кладами I, II и III, имеющими более высокие бутстреп-поддержки, 83–100% (табл. 2). Все три клады (IV, V и VI) включают остальные виды секции *Chamaedryon*: IV – близкородственные виды ряда *Hypericifoliae* (*S. hypericifolia*, *S. aquilegifola*), образующие отдельные кластеры; V – виды ряда *Pilosae* (*S. pilosa*, *S. pubescens*) и ряда *Trilobatae* (*S. trilobata*); VI – виды ряда *Alpinae* (*S. alpina*). Все близкородственные таксоны ожидаемо оказались в сестринских субкладах, но не все хорошо дифференцируются (рис. 1, 2).

Конфликта таксономических данных на филогенетических деревьях не наблюдается, однако виды секции *Chamaedryon* не образуют хорошо поддерживаемых субклад, за исключением видов родства *S. media* s.l. (100% BI). На BI-дереве клады формируются в несколько ином порядке, однако состав видов в кладах совпадает полностью, клады V и VI, распознаваемые на MP-дереве, объединяются в одну на BI-дереве (рис. 2).

Филогенетические исследования рода *Spiraea* предпринимались неоднократно и показывали противоречивые результаты. Первое наиболее полное филогенетическое исследование рода *Spiraea,* включающее 24 вида, было основано на объединенных данных хлоропластных (*trn*L-*trn*F) и ядерных (ITS1, 5.8S, ITS2) локусов [22]. Монофилетическая природа рода подтверждается с 95%-ной байесовской постериорной вероятностью, однако монофилия ни одной из секций не поддерживается в данном исследовании. Филогенетический анализ позволил предположить, что виды рода *Spiraea* со сложными щитками (секция *Calospira*) являются предковыми. Кроме того, возможно, что все три типа соцветий, наблюдаемых в роде *Spiraea* (сложный щиток, метелка, простой зонтик), могли быть утеряны в ходе эволюции и вновь образованы по крайней мере дважды [22].

Парафилетическое происхождение рода *Spiraea* было показано на проведенном кладистическом анализе морфологических признаков [37]. Одна группа включала секции *Spiraea* и *Calospira* подрода *Protospiraea*, близкие к роду *Sibiraea*; другая – виды подрода *Metaspiraea*, сестринские к родам трибы Spiraeeae (*Kelseya*, *Luetkea*, *Petrophyton* и *Xerospiraea*). В работе Potter, Still [23] род *Spiraea* попадает в одну группу с *Sibiraea, Petrophyton* и *Kelseya*. Расхождение с результатами Henrickson [37] Potter и Still связывают с ограниченным числом взятых для анализа морфологических признаков, демонстрирующих потенциально инфор-

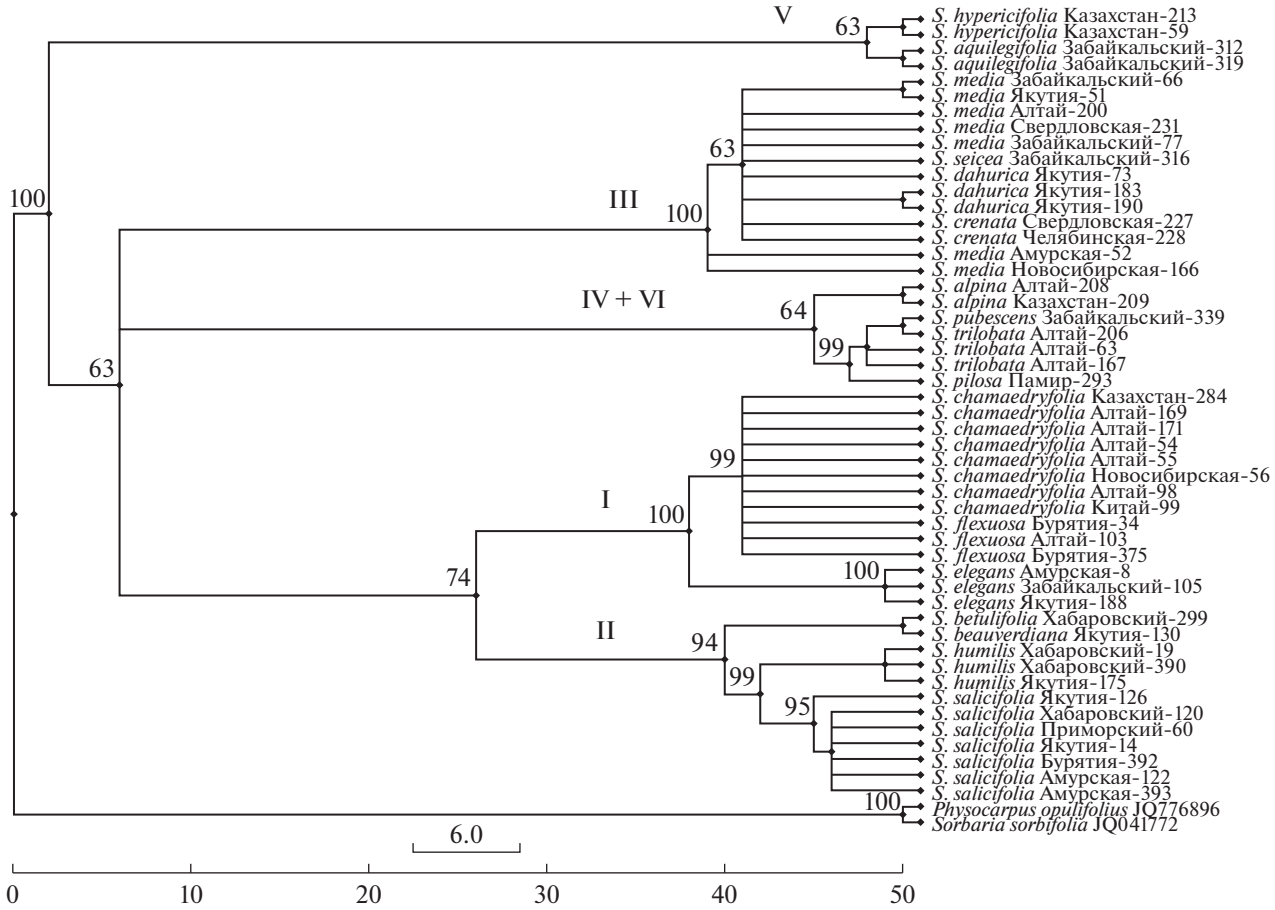

Рис. 2. Консенсусное филогенетическое дерево, построенное на основе байесовского метода BI с использованием модели GTR с гамма-распределением, с 10000000 поколений с частотой сэмплирования каждое тысячное поколение. В узлах ветвления указана поддержка бутстрепа (%). Узлы с поддержкой менее 50% не представлены. I–VI – номера клад.

мативные паттерны изменчивости, характерные не только для рода *Spiraea*, но и для других родов трибы Spiraeeae, а также с гомоплазией по меньшей мере некоторых из признаков, таких как тип соцветия, габитус и другие, наиважнейшие для реконструкции классификации рода *Spiraea*.

Несмотря на широкую видовую представленность (24 вида) в другом филогенетическом анализе, проведенном на основе ITS и *trn*L-*trn*F, и кажущуюся очевидность дивергенции рода, возникают неопределенности, которые сложно объяснить. Так, тип соцветий, по мнению Potter и Still [23], лежащий в основе распознавания секций, не подтверждается в качестве надежного индикатора взаимоотношений внутри рода *Spiraea*, как было показано ранее, хотя некоторые корреляции этого прослеживаются. Вид *S. decumbens* Koch. со сложными щитками, характерными для секции *Calospira*, на дереве оказался в кладе, сестринской по отношению ко всему роду. Виды с простыми зонтиками из секции *Chamaedryon* находились в одной высоко поддерживаемой кладе (96% MP, 100% BI) с видами из неродственной секции *Spiraea*. Также результаты филогенетических взаимоотношений *Spiraea*, выявленных методом AFLP, оказались несовместимы с принципами переходной изменчивости морфологических признаков соцветий и побегов [26], высказанными ранее.

Наиболее полный филогенетический анализ рода *Spiraea* был выполнен сравнительно недавно на основе изменчивости молекулярных (*trn*L-*trn*F, ITS) и морфологических маркеров для 55 видов [38]. Анализ данных также подтверждает монофилию рода *Spiraea*, однако остальные выдвигаемые гипотезы не только не соответствуют обсуждаемым ранее, но и демонстрируют новые результаты, такие как полифилия обоих подродов, полифилия двух неродственных секций – *Calospira* и *Chamaedryon*, парафилия секции *Glomerati*. Сформированные клады (5) включают виды из разных секций; есть и неточности: вид *S. elegans* из секции *Chamaedryon* ошибочно отнесен (или попал в результате анализа) в секцию *Calospira*. Секция *Spiraea* попала внутрь секции *Calospira* [38]. Попа-

дание различных видов из разных секций в одну кладу авторы объясняют отражением интенсивных изменений морфологических признаков между секциями, вызываемых динамичными, постоянно изменяющимися условиями среды обитания и орографическими факторами Гималаев [25, 38].

Наши данные показывают, что более древний подрод *Protospiraea* и две его секции – *Spiraea* и *Calospira* – имеют монофилетическое происхождение (рис. 1). Тогда как для второго подрода *Metaspiraea* и более молодой и богатой на виды секции *Chamaedryon*, включаемой в этот подрод, характерна парафилия. Одна высоко поддерживаемая клада (II) включает в себя комплекс близкородственных лесных видов-мезофитов, встречающихся под пологом леса. Другая группа объединяет несколько клад (III–VI) с видами, предпочитающими более ксерофитные условия – остепненные ценозы, скалистые обнажения, солнечные опушки лесов, т.е. это кустарники с ксероморфными признаками (более узкие листья, более опушенные листья и годичные побеги и т.д.). Вероятно, в ходе эволюции происходили дивергенция признаков и последующее обособление видов наряду с многократными миграциями под влиянием экологических условий.

Таким образом, выявленная степень генетических различий ITS-региона у видов *Spiraea* является высокоинформативной для изучения родственных связей таксонов в роде; обнаружены видоспецифические однонуклеотидные замены, инсерции/делеции длиной в несколько нуклеотидов, имеющие таксономическое значение на уровне подродов, секций, циклов и рядов.

Наши данные подтверждают монофилетическое происхождение рода *Spiraea*, а также более древнего подрода *Protospiraea* и его секций – *Spiraea* и *Calospira*. Выдвинута гипотеза о парафилетическом происхождении эволюционно молодого подрода *Metaspiraea* и его секции *Chamaedryon*. Расхождение видов в этой секции, вероятнее всего, связано с их приспособлением к контрастным экологическим условиям наряду с многократными миграциями.

Согласно правдоподобию филогенетических гипотез, подтверждающихся на основании сравнения последовательностей ITS1 и ITS2 [39], наши предположения о филогенетических связях видов *Spiraea* могут служить основой для ревизии рода, однако не все взаимоотношения между видами *Spiraea* остаются полностью разрешенными. Для выдвижения более взвешенных филогенетических выводов предложенная на основе изменчивости ITS гипотеза о парафилии секции *Chamaedryon* будет проверена на большем числе видов, с привлечением последовательностей низкокопийных генов ядерного генома в силу их очевидных преимуществ, в частности перед хлоропластными маркерами. На основе таких данных в конечном итоге может быть предложена новая классификация рода *Spiraea*.

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе образцов *Spiraea* в Забайкальском крае Е.А. Бондаревичу (ЧГМА, Чита) и предоставление гербарных образцов из Свердловской и Челябинской областей М.А. Полежаевой (ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-03093, а также в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН № 0112-2019-0001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Soltis D.E., Soltis P.S.* Choosing an approach and appropriate gene for phylogenetic analysis // Molecular Systematics of Plant II: DNA Sequencing. Norwell, MA: Kluwer Academic, 1998. P. 1–42.
2. *Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M. et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Missouri Bot. Garden. 1995. V. 82. P. 247–277.
3. *Alvarez I.A., Wendel J.F.* Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. V. 29. № 3. P. 417–434.
4. *Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.A., Hughes C.E.* Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. V. 29. P. 435–455. https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2003.08.21
5. *Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F.* Chloroplast phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Am. J. Botany. 1997. V. 84. P. 1120–1136.
6. *Hershkovitz M.A., Zimmer E.A., Hann W.J.* Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics // Molecular Systematics and Plant Evolution / Eds Hollingsworth P.M., Bateman P.M., Gornall R.J. London: Taylor & Francis, 1999. P. 268–326.
7. *Small R.L., Cronn R.C., Wendel J.F.* Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants // Australian Syst. Bot. 2004. V. 17. P. 145–170. https://doi.org/10.1071/SB03015
8. Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т. III. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. С. 267–327.
9. *Пояркова А.И.* Подсемейство *Spiraeoideae* Agardh // Флора СССР. Т. 9 / Под. ред. Комарова В.Л. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1939. С. 279–318.
10. *Lingdi L., Alexander C. Spiraea* // Flora of China. V. 9. St. Louis: Missouri Bot. Garden Press, 2003. P. 47–73.
11. *Yü T.T., Kuan K.C.* Taxa nova *Rosacearum sinicarum* // Acta Phytotaxa. 1963. Sin. 8. P. 202–234.
12. *Businský R.* Transitive inflorescence types in *Spiraea* (Rosaceae–Spiroideae) undermine the fundamental

classification concept of the genus // Phyton. 2015. № 55. P. 69–120.

13. *Rehder A.* Manual of Cultivated Trees and Shrubs. Portland: Dioscorides Press, 1940. P. 322–342.
14. *Полякова Т.А.* Внутривидовая изменчивость видов рода *Spiraea* L. (Rosaceae) секции *Chamaedryon* Ser. в Сибири и на Дальнем Востоке России // Растения в муссонном климате. IV: Материалы четвертой науч. конф. "Растения в муссонном климате" (Владивосток, 10–13 октября 2006 г.) / Под ред. Гончаровой С.Б. Владивосток: БСИ ДВО РАН, 2007. С. 234–238.
15. *Полякова Т.А.* Изменчивость морфологических признаков и популяционная структура *Spiraea ussuriensis* s.l. (Rosaceae) // Эволюционная и популяционная экология (назад в будущее): Материалы конф. молодых ученых (30 марта–3 апреля 2009 г.). Екатеринбург: Гошицкий, 2009. С. 167–173.
16. *Карпова Е.А., Полякова Т.А.* Сезонная динамика состава фенольных соединений листьев *Spiraea media* var. *sericea* (Turch) Regel // Химия растительного сырья. 2014. № 3. С. 145–149.
17. *Костикова В.А., Полякова Т.А.* Эколого-географическая изменчивость *Spiraea betulifolia* Pall. и *S. beauverdiana* Schneid. по морфологическим и биохимическим маркерам // Сиб. экол. журн. 2014. № 3. С. 413–421.
18. *Kostikova V.A., Troshkina V.* Notes on the taxonomy of *Spiraea aemiliana* and related species (Rosaceae) in Russia // BIO Web of Conferences 16, 00014 (2019); Intern. conf. "Results and Prospects of Geobotanical Research in Siberia", 2019. 4 p. https://doi.org/10.1051/bioconf/20191600014
19. *Полякова Т.А., Муратова Е.Н.* Кариологическое исследование некоторых видов рода *Spiraea* (Rosaceae) флоры Дальнего Востока и Восточной Сибири // Растительный мир Азиатской России. 2015. № 2(18). С. 23–26. http://izdatgeo.ru/pdf/rast/2015-2/23.pdf
20. *Poliakova T.A., Shatokhina A.V.* IAPT chromosome data 35/12 // Taxon / Eds Marhold K. et al. 2021. V. 70(6). P. 1402–1411. E35–E36. https://doi.org/10.1002/tax.12638
21. *Kostikova V.A., Voronkova M.S., Banaev E.V., Poliakova T.A.* The estimation of relative DNA content of the genus *Spiraea* L., section *Calospira* C. Koch. // Bot. Pac. 2018. № 7(1). P. 93–96. https://doi.org/10.17581/bp.2018.07114
22. *Полякова Т.А., Шатохина А.В.* Филогенетические взаимоотношения российских видов рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) по морфологическим и молекулярным данным // 50 лет без К.И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений: Материалы междунар. конф. (2–6 февраля 2015 г., Москва) / Под ред. Тимонина А.К. М.: МАКС Пресс, 2015. С. 263–265.
23. *Potter D., Still S.M.* Phylogenetic relationships in tribe Spiraeeae (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data // Pl. Syst. Evol. 2007. № 266. P. 105–118.
24. *Huh M.K.* Analysis of the phylogenetic relationships in the genus *Spiraea* based on the nuclear ribosomal DNA ITS region // J. Life Science. 2012. V. 22. № 3. P. 285–292.
25. *Khan G., Zhang F.Q., Gao Q.-B. et al.* Phylogenetic analyses of *Spiraea* (Rosaceae) distributed in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions: insights from molecular data // Plant Syst. Evol. 2015. https://doi.org/10.1007/s00606-015-1238-6
26. *Drábková L.Z., Pospíšková M., Businský R.* Phylogeny and infrageneric delimitation in *Spiraea* (Rosaceae) inferred from AFLP markers and a comparison with morphology // Bot. J. Linnean Society. 2017. V. 185. P. 525–541. https://orcid.org/0000-0003-1140-6607
27. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12. P. 12–15.
28. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Ac. Symposium. 1999. Ser. 41. P. 95–98.
29. *Tamura K., Stecher G., Kumar S.* MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Mol. Biol. Evol. 2021. № 38. P. 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
30. *Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. № 10. P. 512–526.
31. *Nei M., Kumar S.* Molecular Evolution and Phylogenetics. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000.
32. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. № 39. P. 783–791.
33. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572–1574.
34. *Rambaut A.* FigTree, version 1.4.4. 2014. https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml
35. *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 // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. Сб. науч. статей по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф. (25–29 мая 2015 г., Барнаул). Барнаул, 2015. С. 353–358.
36. *Zhang Z., Fan L., Yang J. et al.* Alkaloid polymorphism and ITS sequence variation in the *Spiraea japonica* complex (Rosaceae) in China: Traces of the biological effects of the Himalaya-Tibet Plateau uplift // Am. J. Bot. 2006. V. 93. № 5. P. 762–769.
37. *Henrickson J. Xerospiraea,* a generic segregate of *Spiraea* (Rosaceae) from Mexico // Aliso. 1985. № 11. P. 199–211.
38. *Yu S.X., Gadagkar S.R., Potter D. et al.* Phylogeny of *Spiraea* (Rosaceae) based on plastid and nuclear molecular data: Implications for morphological character evolution and systematics // Perspectives in Plant Ecol., Evol. and Syst. 2018. V. 34. P. 109–119. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2018.08.003
39. *Родионов А.В., Коцинян А.Р., Гнутиков А.А. и др.* Изменчивость последовательности ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 в ходе дивергенции видов рода Манник (*Glyceria* R. Br.) // Экол. генетика. 2011. Т. IX. № 4. С. 63–69.

Molecular Phylogeny of Russian Species of the Genus *Spiraea* (Rosaceae) according to the Nucleotide Variability of Its Nuclear rDNA Region

T. A. Poliakova[a], *, A. V. Shatokhina[a], and D. V. Politov[a]

[a] *Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: tat-polyakova@yandex.ru*

The results of studying the variability of sequences of the ITS rDNA region for 17 species of the genus *Spiraea* (Magnoliópsida: Rosaceae) occurring within the Russian part of the ranges and in adjacent territories are presented. The results demonstrate the presence of single-nucleotide substitutions (transitions and transversions) and deletions/insertions, including those specific at the level of subgenera, sections, cycles and series. The variability in the intergenic spacer ITS1 is higher than in ITS2. The high importance of ITS as a molecular marker in the resolution of phylogenetic relationships in the genus *Spiraea* is emphasized. Closely related *Spiraea* species usually differ in ITS sequences, but the polymorphic Chamaedryon section has the greatest difficulties in identifying taxa. Phylogenetic analysis carried out in various ways (ML, MP, BI) confirms the monophyletic origin of the genus *Spiraea* and the ancient sections *Spiraea* and *Calospira*. A hypothesis is formulated about the paraphyletic nature of the more evolutionarily young, diverse and richest in the number of species section *Chamaedryon*. It is assumed that the paraphilia of the *Chamaedryon* section is associated with divergence of traits and subsequent isolation of species along with multiple migrations under the influence of contrasting environmental conditions.

Keywords: *Spiraea*, *Calospira*, *Chamaedryon*, tribe Spiraeeae, ITS, rDNA, nucleotide variability, transition, transversion, phylogeny, monophilia, paraphilia.