Промышленная ботаника, 2024. Вып. 24, № 1. С. 140–145.

УДК 581.6+582.998 DOI: 10.5281/zenodo.10864374

В.Г. Кулаков, Ю.Ю. Кулакова, Е.А. Володина, К.Н. Вишняков

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СОРНЫХ *BIDENS* L. SECT. *PSILOCARPAEA* DC. (ASTERACEAE) В ЦЕЛЯХ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений»

Инвазионные растения часто представляют значительную опасность сельскому хозяйству. В качестве противодействия применяют карантинные меры, для эффективной реализации которых необходимы методы идентификации диаспор (семян, плодов) растений в перевозимой продукции. Высоко перспективно применение молекулярно-генетических методов идентификации как надежных и объективных. В настоящее время практически отсутствуют разработанные методы для применения в лабораториях, в том числе для внесенных в перечень карантинных объектов *Bidens bipinnata* L. и *B. pilosa* L. Проведено изучение генетического разнообразия сорных растений рода *Bidens* L. sect. *Psilocarpaea* DC. по хлоропластным (NdhF-rpl32) и ядерным (ITS1-5.8S-ITS2) локусам. Сделан вывод о практической неприменимости идентификации по хлоропластным локусам и пригодности идентификации по ядерным.

Ключевые слова: ПЦР, хлоропластный геном, NdhF-rpl32, ITS1-5.8S-ITS2, карантин растений, лабораторная идентификация

Цитирование: Кулаков В.Г., Кулакова Ю.Ю., Володина Е.А., Вишняков К.Н. Изучение молекулярно-генетических особенностей сорных *Bidens* L. sect. *Psilocarpaea* DC. (Asteraceae) в целях разработки методов идентификации видов // Промышленная ботаника. 2024. Вып. 24, № 1. С. 140–145. DOI: 10.5281/zenodo.10864374

Введение

Инвазионные растения часто являются вредоносными, нанося ущерб экономике и здоровью человека, а также влияя на биоразнообразие. Для некоторых растений, являющихся сорняками, возможно выражение прямого исчисляемого экономического ущерба на сельское хозяйство. При этом указывается, что сорные растения имеют более высокий потенциал вредоносности для сельскохозяйственных культур по сравнению с вредителями и возбудителями болезней [13], но отличаются возможностью эффективного управления в агроценозах. Одним из наиболее эффективных методов управления сорняками является применение карантинных мер – предотвращение распространения сорных растений на свободные от них территории. В Российской Федерации сорные растения с высокой прогнозируемой вредоносностью и отсутствующие или ограниченно распространенные на территории внесены в перечень карантинных объектов. Как мера предотвращения распространения карантинных объектов используется проведение лабораторных исследований образцов продукции для выявления засорения карантинными объектами в соответствии со статьей 26 Федерального закона от 21.07.2014 N 206-ФЗ «О карантине растений» с дальнейшей выбраковкой или обеззараживанием засоренных партий.

Непреднамеренное распространение сорных растений человеком обычно происходит с

помощью диаспор (семян, плодов, соплодий, реже вегетативных частей), что создает затруднения для лабораторной диагностики их таксономической принадлежности, так как абсолютное большинство существующих методов идентификации растений основаны на анализе признаков всего растения. Дополнительную сложность для морфологической идентификации диаспор создает необходимость наличия квалифицированных специалистов-ботаников (гербологов) в каждой испытательной лаборатории, работающей в области карантина растений. В Российской Федерации имеется более 100 подобных лабораторий, и подготовка кадров для каждой является сложной задачей. Выход можно найти в разработке методов идентификации, применимых к любой части растения, требующих незначительного объема растительного материала и имеющих высокую объективность без критической зависимости от научной квалификации исполнителя.

Идентификация растений на основе молекулярно-генетических признаков видится подходящим решением, но при внедрении в практику работ современных испытательных лабораторий подобных методов имеется несколько особенностей. Методы, основанные на выявлении нуклеотидной последовательности (секвенирование), широко применяемые в науке, малопригодны для практического применения из-за длительности, довольно большой ресурсоемкости и высокой стоимости оборудования. Методы, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией целевого продукта методом электрофореза («классическая ПЦР») требуют недорогого оборудования, но обладают относительно невысокой чувствительностью, низкой пропускной способностью и высокой ресурсоемкостью. «Золотым стандартом» для производственных лабораторий, сочетающим не очень дорогое оборудование, высокую производительность, низкую ресурсоемкость и умеренные требования к квалификации персонала в данный момент является ПЦР с детекцией результата реакции в «реальном времени» (рвПЦР, qPCR). В то же время, работ по разработке подобных методов идентификации растений в научном обществе практически не ведется.

Использование подобных методов молекулярно-генетической идентификации растений также востребовано при определении состава растительной продукции, в фармакогнозии и в криминалистике.

Многие растения, принадлежащие к роду *Bidens* L. sect. *Psilocarpaea* DC., являются признанными вредоносными сорными растениями. В Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС [5], действующий и на территории Российской Федерации, внесено два вида секции: *Bidens bipinnata* L. и *B. pilosa* L., при этом авторами на основе анализа основных информационных ресурсов и сводок [6, 8, 10, 15], а также собственных наблюдений в экспедициях, выявлено еще не менее 6 морфологически сходных сорных видов секции: *B. alba* (L.) DC., *B. bigelovii* A. Gray, *B. biternata* (Lour.) Merr. & Sherff., *B. odorata* Cav., *B. parviflora* Willd., *B. subalternans* DC. Самостоятельность ряда видов (*B. alba* и *B. odorata*) отдельными исследователями не признается [10, 11], для других (*B. bigelovii*, *B. biternata*) самостоятельность ставится под сомнение авторами данного исследования, но остаются, как минимум, широко распространенные «хорошие» виды *B. parviflora* и *B. subalternans*, плоды которых необходимо отличать от карантинных видов. До недавнего времени методики морфологической идентификации плодов сорных черед секции не существовало, но в 2015 г. авторами были разработаны методические рекомендации, позволяющие идентифицировать плоды *B. pilosa* от остальных видов по морфологическим признакам [2, 3]. Недостатком разработанных рекомендаций является невозможность отличить плоды *B. bipinnata* от близких видов (*B. parviflora* и *B. subalternans*) и недостаточная лабораторная правильность при идентификации плодов *B. pilosa*, оценочно составляющая 69,4 %, что ниже требуемой лабораторной правильности в 95 %.

Цели и задачи исследований

Целью исследования было изучение молекулярно-генетических особенностей сорных *Bidens* L. sect. *Psilocarpaea* DC. для разработки метода их диагностики.

Объекты и методики исследований

Материалом исследования выступали гербарные экземпляры и экземпляры карпологической коллекции Федерального государственного

бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» (далее – ФГБУ «ВНИИКР») в количестве 78 образцов из более чем 50 пунктов сбора (Северная и Южная Америка, Европа, Африка, Юго-Восточная Азия, Дальний Восток). Все образцы были надежно идентифицированы до вида по комплексу морфологических признаков, для чего проводилось выращивание черед из плодов в карантинной теплице и фитотронах ФГБУ «ВНИИКР» до стадии цветения и плодоношения. ДНК образцов выделяли модифицированным методом Дойля [9]. Для амплификации целевых фрагментов применялись модифицированные авторами праймеры:

ndhF-rpl32 – Bid/ndh-F AAAAGGTATTATCCACGCRTATT и Bid/rpl32-R CCCATATCCTTTCCTTTTCCAA (модификация праймеров ndhF и rpl32-R [14]);

ITS1-5.8S-ITS2 – ITS-p5(bid) CCTTATCATTTAGAGGAAGGA и ITS-u4(bid) AGTTTCTTTTCCTCCGCTTA (модификация праймеров ITS-p5 и ITS-u4 [7]).

Расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили на генетическом анализаторе Genetic Analyzer AB-3500 методом капиллярного электрофореза. Работу с генетическими данными проводили в среде Unipro UGENE. Для проведения генетических исследований «in silica» также использовали генетические последовательности депозитария GenBank [12].

Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе исследований проводился поиск высоковариабельных для видов секции локусов в хлоропластном геноме. Были исследованы 8 различных локусов, рекомендуемых для изучения у цветковых растений [14, 16]: NdhF-rpl32, trnH^{GUG}-psbA, rpl32-trnL, trnK-matK, trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, Rpl16, rbcL, trnV-ndhC. Высокая вариативность выявлена в локусе NdhF-rpl32, низкая в локусах trnH^{GUG}-psbA и trnT^{UGU}-trnL^{UAA}. В остальных локусах вариативность не выявлена. Дальнейшее изучение проводилась с использованием локуса NdhF-rpl32. В исследуемых последовательностях выявлено девять гаплотипов.

Гаплотип А: образцы *B. pilosa* с крайне отличным от остальных образцов вида генотипом. Имеется 16–23 отличных нуклеотидов в регионе, кроме того, имеются две уникальные инсерции (9 нуклеотидов и 15 нуклеотидов). Выявлено три образца происхождением из Гавайев, Мексики и Перу.

Гаплогруппа В характеризуется различием внутри группы до 9 нуклеотидов и вне группы не менее 11 нуклеотидов. Трактуется нами как основной объем вида *B. pilosa*.

Гаплотип В1: от иных гаплотипов *B. pilosa* (кроме гаплотипа А) различается 3–8 нуклеотидами и наличием характерной крупной делеции (197 нуклеотидов) и инсерции (7 нуклеотидов). 10 образцов происхождением из Мексики, Кении, Аргентины, Индонезии. Образцы морфологически различны, но обычно это крупные прямостоячие растения с однажды-перистым или дважды-перистым листом. Возможно, представляют собой часть вида, выделяемого как *B. odorata*.

Гаплотип В2: от иных гаплотипов *B. pilosa* (кроме гаплотипа А) различается 3–5 нуклеотидами. Делеция в 14 нуклеотидов общая с гаплотипом В3. 6 образцов из Аргентины, Перу, Мексики, Марокко и Таиланда.

Гаплотип В3: от иных гаплотипов *B. pilosa* (кроме гаплотипа А) различается 4–9 нуклеотидами и наличием уникальной инсерции в 27 нуклеотидов. Делеция в 14 нуклеотидов общая с гаплотипом В2. 6 образцов из Аргентины, Китая, Индонезии. Морфологически однообразны – растения без язычковых цветков и с однажды-перистым листом. Соответствуют *B. pilosa* в узком смысле (*B. pilosa* var. *pilosa*).

Гаплотип В4: от иных гаплотипов *B. pilosa* (кроме гаплотипа А) различается 5–9 нуклеотидами и наличием уникальной инсерции в 22 нуклеотида. 8 образцов из Вьетнама, Гавайев, Китая, Таиланда. Морфологически однообразны – растения с крупными белыми язычковыми цветками и уклоняющимся, практически ползучим стеблем.

Гаплогруппа С характеризуется различием внутри группы до 2 нуклеотидов и вне группы не менее 11 нуклеотидов. Данная группа трактуется нами как комплекс «желтоцветковых» видов *B. subalternans*, *B. bipinnata*, *B. biternata*. От *B. pilosa* и *B. parviflora* группа также отличается наличием делеции в 9 нуклеотидов и инсерции в 6 нуклеотидов.

Гаплотип С1: 23 образца из Аргентины, Перу, Парагвая, Мексики, Кореи, Китая, Танзании, Грузии, Абхазии, относящихся, как минимум, к двум видам: *B. subalternans* и *B. bipinnata*.

Гаплотип C2: 2 образца из депозитария GenBank, определенных как *B. biternata* из Китая. От гаплотипов C1 и C3 отличаются соответственно 1 и 2 нуклеотидами.

Гаплотип C3: 4 образца *B. subalternans* из Аргентины и Черногории. От гаплотипов C1 и C2 отличаются соответственно 1 и 2 нуклеотидами.

Гаплотип D: значительно отличающаяся от всех иных гаплотипов (не менее 14 отличных нуклеотидов, уникальные инсерции в 19 и 12 нуклеотидов, делеция в 13 нуклеотидов) *B. parviflora*.

Таким образом, обнаружено значительное генетическое отличие образцов *B. pilosa* от близкородственных видов, как и отличие *B. parviflora* от других видов. В то же время, внутри группы «желтоцветковых» видов *B. subalternans*, *B. bipinnata* и *B. biternata* различия малы или отсутствуют. Внутри вида *B. pilosa* выявлено крайне высокое генетическое разнообразие по данному локусу, в случае выделения гаплотипа A, превышающее межвидовые различия. При этом морфологических различий для растений данного гаплотипа от других видов не выявлено. Какой-либо выраженной географической привязки гаплотипов не выявлено, что, возможно, объясняется зоохорией в распространении плодов сорных черед.

На втором этапе проводились исследования по изучению участка ядерного генома ITS1-5.8S-ITS2, широко используемого при изучении биоразнообразия и филогении растений, а также применяемого для идентификации [1, 4, 7]. В результате среди образцов выявлены нижеуказанные гаплогруппы.

Гаплогруппа A имеет разницу не более 12 нуклеотидов внутри группы и не менее 19 нуклеотидов вне группы, при этом всегда имеется пара членов группы с разницей не более 9 нуклеотидов. В данную гаплогруппу входят все образцы с морфологическими признаками *B. pilosa*. В группу входят 5 подгрупп с соответствующим нуклеотидным полиморфизмом внутри подгруппы / между подгруппами: A1 (3/4), A2 (3/4), A3 (5/7), A4 (0/5), A5 (3/4). Явных морфологических и географических особенностей подгрупп не выявлено, кроме принадлежности к подгруппе A3 образцов только из Центральной Америки.

Гаплогруппа B имеет разницу не более 5 нуклеотидов внутри группы и не менее 17 вне группы. В данную гаплогруппу входят образцы с морфологическими признаками *B. subalternans* и *B. bipinnata*. При этом исследованные образцы образуют две подгруппы по видам с нуклеотидным полиморфизмом внутри подгруппы / между подгруппами: B1 – *B. subalternans* (2/3) и B2 – *B. bipinnata* (0/3).

Гаплогруппа C не имеет внутреннего полиморфизма, а от иных гаплогрупп отличается не менее 17 нуклеотидами. К данной гаплогруппе принадлежат два образца, определенных по морфологическим признакам как *B. subalternans*, собранные в высокогорьях Анд (Аргентина и Перу).

Гаплогруппа D без внутреннего полиморфизма и с отличием не менее 55 нуклеотидов от остальных групп представлена образцами *B. parviflora*.

При этом показано, что совпадения кластеризации образцов *B. pilosa* по генетическому разнообразию изученных хлоропластного и ядерного генома не наблюдается.

Выводы

Отсутствие совпадения кластеризации образцов *B. pilosa* по генетическому разнообразию изученных хлоропластного и ядерного генома позволяет сделать предположение о свободной гибридизации растений внутри вида (единство ядерного генома), а также о наличии нескольких обособленных популяций до начала эпохи массового перемещения людей и грузов (несколько значительно отличающихся хлоропластных геномов) и массовой интродукции растений различных популяций в современное время.

По локусу хлоропластного генома локуса NdhF-rpl32 невозможно идентифицировать карантинный вид *B. bipinnata* от близкого некарантинного *B. subalternans*. *Bidens pilosa* может быть дифференцирован от всех иных видов методом секвенирования, но из-за высокого разнообразия внутри вида отсутствует возможность разработки тест-системы для идентификации ПЦР с детекцией «в реальном времени». Дальнейшее изучение полнохлоропластных сиквенсов в депозитарии GenBank [12] показало низкую перспективность возможности разработки метода идентификации на основе хлоропластного генома.

В то же время выраженные генетические отличия *B. pilosa* в участке ядерного генома ITS1-5.8S-ITS2 позволяют создать тест-систему по определению данного вида методом ПЦР с де-

текцией продуктов «в реальном времени», что подтверждено дальнейшими разработками авторов. Имеется выраженное отличие *B. bipinnata* от близкого вида *B. subalternans*, которое, возможно, также позволит разработать практическую тест-систему.

Благодарности

Авторы выражают признательность коллегам, внесшим свой вклад в пополнение ботанических коллекций ФГБУ «ВНИИКР», а именно: С.Ю. Муханову, Н.В. Цинкевичу, Е.М. Волковой, В.Д. Бочкину, М.О. Кондратьеву, И.А. Шанцеру, Е.В. Комарову, Д.Г. Касаткину, Д.Л. Белкину, Ю.А. Ловцовой, Я.Н. Коваленко, М.Г. Коваленко, Ю.Р. Кочневу, Л.Е. Демушкиной.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Разработка молекулярно-генетических и морфологических методов идентификации сорных видов растений, включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС» (№123042500048-5).

1. *Матвеева Т.В.*, Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. 2011. Т. 9, N 1. С. 32–43.
2. *Методические* рекомендации по выявлению и идентификации череды волосистой *Bidens pilosa* L. М., 2015. 38 с. Деп. в ФГБУ «ВНИИКР», Инв. № 74-2015 МР ВНИИКР.
3. *Методические* рекомендации по выявлению и идентификации череды дваждыперистой *Bidens bipinnata* L. М., 2015. 34 с. Деп. в ФГБУ «ВНИИКР», Инв. № 56-2015 МР ВНИИКР.
4. *Нигматуллина Н.В.*, Кулуев А., Кулуев Б.Р. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификации дикорастущих растений // Биомика. 2018. Т. 10, N 3. С. 290–318.
5. *Решение* Совета ЕЭК от 30.11.2016 № 158 «Об утверждении единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза (с изменениями на 25 января 2023 года)» [Электронный ресурс]. URL: https://fsvps.gov.ru/files/reshenie-soveta-evrazijskoj-jekonomich-7/ (дата обращения 23.10.2023)
6. *CABI:* Invasive Species Compendium [Electronic resource]. URL: https://www.cabi.org/isc (accessed 21.12.2023)
7. *Cheng T.*, Xu Ch., Lei L., Li Ch., Zhang Y., Shiliang Z. Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity // Molecular ecology resources. 2016. Vol. 16, Iss. 1. P. 138–149.
8. *Composite* List of Weeds. The Weed Science Society of America (WSSA) [Electronic resource]. URL: https://wssa.net/wssa/weed/composite-list-of-weeds (accessed 21.12.2023)
9. *Doyle J.J.*, Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemistry Bulletin. 1987. Vol. 19, N 1. P. 11–15.
10. *Flora* of China. eFloras [Electronic resource]. URL: http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=2 (accessed 11.12.2023)
11. *Flora* of North America. eFloras [Electronic resource]. URL: http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=1 (accessed 21.12.2023)
12. *NCBI:* The National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic resource]. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (accessed 14.12.2023)
13. *Oerke E.C.* Crop losses to pests // Journal of Agricultural Science. 2006.Vol. 144, Iss. 1. P. 31–43.
14. *Shaw J.*, Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III // American Journal of Botany. 2007. Vol. 94, Iss. 3. P. 275–288.
15. *Sherff E.* The genus *Bidens* L. // Publication of Field Museum of Natural History. Botanical series. 1937. Vol. 16. In 2 Parts. 709 p.
16. *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, Iss. 5. P. 1105–1109.

Поступила в редакцию: 19.01.2024

UDC 581.6+582.998

STUDY OF THE MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF *BIDENS* L. SECT. *PSILOCARPAEA* DC. (ASTERACEAE) FOR THE DEVELOPMENT OF IDENTIFYING METHODS

V.G. Kulakov, Yu.Yu. Kulakova, E.A. Volodina, K.N. Vishnyakov

All-Russian Plant Quarantine Center

Invasive weeds often pose a significant threat to agriculture. As a countermeasure, quarantine measures are used, the effective implementation of which requires methods for identifying diaspores (seeds, fruits) of plants in transported products. The use of molecular genetic identification methods as reliable and objective is highly promising. At present, there are practically no developed methods for use in laboratories, including for the listed quarantine objects *Bidens bipinnata* L. and *B. pilosa* L. A study was carried out of the genetic diversity of weeds of the genus *Bidens* L., section *Psilocarpaea* DC. at chloroplast (NdhF-rpl32) and nuclear (ITS1-5.8S-ITS2) loci. A conclusion is made about the practical inapplicability of identification by chloroplast loci and the suitability of identification by nuclear ones.

Key words: PCR, chloroplast genome, NdhF-rpl32, ITS1-5.8S-ITS2, plant quarantine, laboratory identification

Citation: Kulakov V.G., Kulakova Yu.Yu., Volodina E.A., Vishnyakov K.N. Study of the molecular genetic characteristics of *Bidens* L. sect. *Psilocarpaea* DC. (Asteraceae) for the development of identifying methods // Industrial botany. 2024. Vol. 24, N 1. P. 140–145. DOI: 10.5281/zenodo.10864374