

М.В. Олонова¹, Н.В. Храброва²

¹Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

²Особое структурное подразделение «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета» (г. Томск)

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА
Poa nemoralis L. И *Poa palustris* L. (Poaceae)
НА БАЗЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
РАЙОНА ETS 18S-26S ЯДЕРНОЙ РИБОСОМНОЙ ДНК**

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00637-а).

Для выявления генетического сходства был секвенирован район внешнего транскрибируемого спейсера (ETS) 18S-26S ядерной рибосомной ДНК у 10 представителей *Poa palustris* L. и одного *P. nemoralis* L. Исследование выявило слабую изменчивость этого района. Сравнение с данными, полученными из GenBank, подтвердило тесные связи *P. palustris* не только с *P. nemoralis*, но и с *P. glauca* Vahl., *P. laxa* subsp. *flexuosa* (Sm.) Hyl. (который, как считается, произошел от гибридизации *P. laxa* with *P. glauca*) и даже с *P. lettermanii* Vasey (sect. *Abbreviatae* Nannf. ex Tzvel.). Район ETS оказался слишком консервативным для исследования отношений между видами *Poa*, поэтому для этой цели должны быть испробованы другие методы.

Ключевые слова: ETS; *Poa nemoralis* L.; *Poa palustris* L.; систематика.

Введение

Попытка филогенетической реконструкции секции *Stenopoa* Dumort., проводившаяся на базе классических морфологических и эколого-географических методов, выявила ряд спорных мест и поставила множество вопросов, для разрешения которых требуется применение молекулярно-генетических методов. Одной из центральных проблем филогении секции являются родственные взаимоотношения двух мезоморфных видов – *P. nemoralis* L. и *P. palustris* L.

Н.Н. Цвелев [1], предполагая высокогорное происхождение мятликов, считает, что *P. nemoralis* и *P. palustris* более других видов секции приближаются к общим предковым типам, обитавшим в относительных высокогорьях конца палеогена, причем сформировались они по-разному и в разных поясах гор. Более специализированный *P. nemoralis* обитал в поясе тургайских листопадных лесов еще до спуска их на межгорные равнины, а менее специализированный *P. palustris* – в поясе южнотаежных лесов, располагавшемся выше. В конце миоцена в результате возросшей континентализации климата отдельные элементы уже спустившихся к тому времени на равнины тургай-

ских лесов стали замещаться спускающимися с гор таежными элементами. В результате *P. nemoralis*, оказавшийся в числе наиболее устойчивых элементов тургайской флоры, вошел в состав плиоценовых смешанных лесов. Плейстоценовое смещение границ привело к массовой гибридизации между *P. nemoralis* и более светолюбивым *P. palustris* [1].

М.Г. Попов [2] высказал предположение, что *P. nemoralis*, лесной неморальный мятлик, в плейстоцене мигрировал на юг вместе с обедненными тургайскими лесами, где и остался в горно-лесных группировках в качестве плейстоценового реликта. Впоследствии в результате изменений рельефа и климата этот вид дал, по мнению П.Н. Овчинникова [3], целый ряд специализированных криофильных и ксерофильных альпийских и степных видов. *P. palustris*, по предположению Т.И. Серебряковой [4], является производным от лесного предка и представляет собой достаточно древний вид, возникший в результате «местной» адаптации к луговым условиям. Лесное происхождение *P. nemoralis* не вызывает сомнений, однако с лесным происхождением *P. palustris* согласиться трудно. Как уже отмечалось ранее, Н.Н. Цвелев совершенно справедливо заметил: если в пределах одного современного рода фестукоидных злаков имеются как лесные, так и луговые виды, не следует выводить одни из других, так как обе эти экологические группы произошли от общего высокогорного предка [5]. Более вероятным представляется перемещение *P. palustris* вниз не под пологом южнотаежных лесов, а по открытым участкам, опушкам лесов, вдоль рек и ручьев.

Дальнейшая эволюция секции шла главным образом по пути ксероморфогенеза. Современные виды *P. nemoralis* и *P. palustris*, по-видимому, нельзя считать непосредственными родоначальниками других видов, но они более других сохранили черты строения древних предков. И *P. nemoralis*, и *P. palustris* в настоящее время отличаются очень высоким полиморфизмом, у них отмечаются наиболее высокие и разнообразные хромосомные числа. Это свидетельствует о том, что их эволюция продолжается в мезофильных условиях, а сами они уже не так примитивны, как их предки, давшие, вероятно, начало большинству видов секции.

В нашей стране и за рубежом проводилась большая работа по изучению мятликов, при этом пересматривалась и корректировалась и система рода, и система секции *Stenopoa*. Так, Е.Н. Пояркова [6], критически пересмотревшая систему рода в пределах флоры Украины с привлечением анатомических и других данных, предложила разделить секцию *Stenopoa* на две подсекции: *Nemorales*, объединяющую мезоморфные виды, и *Steriles*, включающую эволюционно более продвинутые ксероморфные виды секции. Эту точку зрения поддержала Н.С. Пробатова [7, 8]. Такое внутрисекционное подразделение подразумевает, что родство между *P. nemoralis* и *P. palustris* значительно более тесное, чем, например, между *P. nemoralis* и *P. sterilis* Bieb., с одной стороны, и *P. palustris* и *P. stepposa* (Kryl.) Roshev. – с другой.

Изучение большой и сложной группы мятликов секции *Stenopoa* ставит под сомнение правомерность подразделения секции *Stenopoa* на подсекции *Nemorales* и *Steriles*. В свете изученных особенностей распределения качественных признаков, маркирующих родственные группы видов (длина язычка и характер поверхности оси колоска), представляется более вероятным, что лесной *P. nemoralis* и луговой *P. palustris* – наиболее древние виды этой секции – дали начало двум эволюционным линиям (рядам в понимании Комарова). Эти линии лишь частично объединялись в результате гибридизации, образовав сложные гибридные комплексы, рассматриваемые как агрегаты *P. x intricata* Wein и *P. urssulensis* Trin. В дальнейшем обе линии дали ксероморфные виды, но сходство между ними, по-видимому, чисто конвергентное, основанное на сходстве адаптивных признаков, а не на признаках родства. Для того же, чтобы классификация отражала естественную историю группы, к чему мы по возможности стремимся, необходимо, как напоминают О. Солбриг и Д. Солбриг [9], чтобы все члены рассматриваемого таксона были близкородственными между собой и происходили от общего предка.

Таким образом, возникает вопрос, как давно произошла дифференциация этих видов. Предложенная Н.Н. Цвелевым [5] схема эволюционных взаимоотношений, как и всякая гипотеза, нуждается в проверке альтернативным методом, и проверку следует начать с самого основания системы, т.е. постараться выявить степень генетических различий между видами *P. nemoralis* и *P. palustris*, предположительно лежащих в основании двух основных ветвей эволюционного дерева секции. Морфологически и габитуально эти виды очень сходны, и различия между ними значительно меньше, чем между ними и их ксероморфными дериватами, но не отражают глубины родственных отношений, а могут быть следствием конвергентного сходства. Для выявления глубины дифференциации видов и, следовательно, их положения в системе следует изучить их генетическую дифференциацию. Вместе с тем следует принять во внимание и то, что их генетическая близость может свидетельствовать не только об их относительно недавней дифференциации, но и о вторичном сближении, обусловленном массовой гибридизацией во время плейстоценовых смещений растительных зон.

Для выявления степени генетических различий между морфологически близкими видами *P. nemoralis* и *P. palustris* было начато молекулярно-генетическое исследование видов секции. Надо отметить, что род мятлик к настоящему времени относительно неплохо изучен в молекулярно-генетическом отношении и продолжает изучаться. Тем не менее многочисленные работы Р. Сорент [10–12], Л.Дж. Джилеспи [13–16], А.В. Родионова и Н.Н. Носова [17–19 и др.] посвящены филогении рода в целом, а детальное исследование S. Stoneberg Holt [20, 21 др.] касается главным образом *P. pratensis* L. Специального молекулярно-генетического исследования секции *Stenopoa* не проводилось.

Как отметили А.С. Антонов [22] и В.С. Шнеер [23], к настоящему времени среди исследованных последовательностей ДНК растений преоблада-

ют хлоропластные, но большая часть наследственной информации сосредоточена в ядерном геноме. Кроме того, недостатком хлоропластной ДНК является ее унипарентальное наследование. Это приводит к тому, что при исследовании близких видов филогенетические деревья, реконструированные на основе этого участка, могут отличаться от таковых, полученных в результате исследования геномов с бипарентальным наследованием [23, 24]. Более объективные результаты дает исследование генов рибосомных РНК. Эти гены представлены длинными тандемными повторами. Каждый такой повтор включает 3 гена – 18S, 5.8S и 26S, разделенных внутренними транскрибируемыми спейсерами ITS1 и ITS2 (internal transcribed spacer). Снаружи от генов размещаются внешние транскрибируемые спейсеры (ETS). Разделяются эти транскрибируемые повторы нетранскрибируемыми спейсерами NTS (non-transcribed spacer) [25]. Последовательность ITS1 и ITS2 в настоящее время широко используется для исследования взаимоотношений близкородственных таксонов уровня семейства и выше [26], тем не менее, как отмечает В.С. Шнеер [23], на низких таксономических уровнях вариабельность этих участков становится слишком низкой. И действительно, исследования L.J. Gillespie с коллегами [27] не выявили различий между *P. nemoralis* и *P. palustris* по последовательности ITS1 и ITS2.

Многие исследователи [23, 28, 29] указывают на более высокую изменчивость участка ETS. Б.Дж. Болдвин и С. Маркос [30] отмечают, что доля изменчивых и потенциально информативных сайтов на участке ETS от 1,3 до 2,4 раза выше, чем на ITS1 + ITS2, а Р. Асеведо-Розак с соавт. [31] показывает, что участок ETS на 34,4% более информативен, чем другие исследованные последовательности. Т. Орландо с соавт. [32] объясняют это тем, что ETS и IGS находятся под меньшим давлением отбора, и это позволяет им лучше сохранять мутации и, следовательно, определять родственные отношения. Тем не менее ETS используется для филогенетических исследований значительно реже, чем ITS. Л.Дж. Джилеспи (личное сообщение) видит причину этого в том, что участок ETS много длиннее, чем ITS, и не имеет универсальных праймеров, т.е. праймеров, пригодных для большинства растений. Поэтому для каждой группы растений требуется подбирать свои праймеры, и это серьезно усложняет исследование.

Поскольку известно, что исследование ITS1 и ITS2 последовательностей не выявляет различий между *P. nemoralis* и *P. palustris* [33], была предпринята попытка выявить ее с помощью анализа нуклеотидных последовательностей ETS (внешний транскрибируемый спейсер, расположенный между 26S и 18S рибосомной ядерной последовательности).

Цель данного исследования – оценить степень генетического сходства между *P. palustris* и *P. nemoralis*. Поскольку ETS *P. nemoralis* уже была исследована [27], основное внимание было сосредоточено на *P. palustris*.

Материалы и методики исследования

Исследования проведены в Центре коллективного пользования Томского государственного университета «Экоген» на десяти образцах *P. palustris* и – для сравнения – одном *P. nemoralis*, отобранных из природных популяций (табл. 1). ДНК выделяли из листьев, высушенных в силикагеле или взятых из гербарных материалов, по стандартной методике Doyle and Doyle [34] с небольшими модификациями. Небольшие кусочки листьев, взятых с гербарных образцов, растирались в фарфоровой ступке с 700 мкл СТАБ-буфера, затем жидкая фракция переносилась с помощью пипетки в пробирки.

Т а б л и ц а 1

Исследованные популяции

№ образца	Место хранения ваучера [35]	Местонахождение	Местообитание	Вид	Коллектор
09–61	ТО	Алтай, окр. с. Кибезень	Опушка елового леса	<i>Poa nemoralis</i>	М.В. Олонова
08–47	ТО	Кузнецкий Алтай, урочище Айдат, приток Белого Июса	Берег ручья	<i>Poa palustris</i>	М.В. Олонова
09–42	ТО	Томск, р-н ул. Торговой	Пустырь на песке	<i>Poa palustris</i>	А.Л. Эбель
09–48	ТО	Томская обл., Кожевниковский р-н, с. Киреевск	Обрывистый берег реки	<i>Poa palustris</i>	А.Л. Эбель
09–52	ТО	Алтай, окр. с. Акташ	Опушка елового леса	<i>Poa palustris</i>	М.В. Олонова
09–93	ТО	Скандинавия	Луг	<i>Poa palustris</i>	R.J. Soreng
09–66	KUZ	Кемеровская обл., Чебулинский р-н, 3 км к СВ от с. Чумай	Разнотравный луг	<i>Poa palustris</i>	С.А. Шереметова, Е.А. Буко
09–69	KUZ	Горная Шория, окр. пос. Усть-Анзас, берег р. Мрассу	Прибрежный галечник	<i>Poa palustris</i>	С.А. Шереметова, Е.А. Буко
09–72	KUZ	Кемеровская обл., Междуреченский р-н, Красногорский угольный разрез	Разнотравно-злаковый луг	<i>Poa palustris</i>	С.А. Шереметова, Е.А. Буко
09–85	ТО	Якутия, Яно-Индигирский р-н	Разнотравно-злаковый луг	<i>Poa palustris</i>	Е.Г. Николин
09–98	ТО	Красноярский край, Канский р-н, окр. ж/д станции Солянка	Опушка березового леса	<i>Poa palustris</i>	М.В. Олонова

Примечание. ТО – Гербарий им. П.Н. Крылова Томского государственного университета (г. Томск); KUZ – Гербарий Кузбасского ботанического сада Института экологии человека СО РАН (г. Кемерово).

После добавления 10 мкл РНКазы пробирки встряхивались на вортексе в течение 5 с и затем в течение 80 мин инкубировались в термостате при 65°C при периодическом мягком взбалтывании. Затем в пробирки добавлялось 700 μ л очистительного раствора «хлороформ-изоамиловый спирт», после чего содержимое перемешивалось в течение 20 мин на ротационном вортексе. Затем смесь центрифугировалась на максимальной скорости (13 000 об./с) в течение 5 мин, верхняя фракция (супернатант) переносилась в новую пробирку, и процедура очистки повторялась еще раз. Далее для осаждения ДНК добавлялось 350 мкл холодного изопропанола, содержимое встряхивалось на вортексе на минимальной скорости в течение 1 мин и центрифугировалось на максимальной скорости в течение 10 мин. После чего изопропанол аккуратно с помощью пипетки удалялся, а осажденная ДНК промывалась 350 μ л 70%-ного этилового спирта. Затем спирт также удалялся и ДНК высушивалось на воздухе до полного испарения спирта. После этого ДНК растворяли в 100 мкл деионизированной воды, пробирки помещались на хранение в морозильную камеру и хранились при $t = -20^{\circ}\text{C}$.

Для амплификации по совету Л.Дж. Джилеспи (личное сообщение) в качестве прямого праймера был использован RETS4_F (TGGCTACGCGAGC-GCATGAG), подобранный специально Л.Дж. Джилеспи и коллегами для исследования мятликов [36], а обратного – 18S-R (AGACAAGCATATGAC-TACTGGCAGG), одного из стандартных праймеров. Праймеры были синтезированы фирмой «СибЭнзим» (г. Новосибирск).

Реакционная смесь содержала однократный ПЦР-буфер (60 mM Tris – HCl, 25 mM KCl, 10 mM 2 – меркаптоэтанол, 0,1%-ный Тритон X – 100), 1,5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 1 единицу активности TaqДНК-полимеразы («СибЭнзим», г. Новосибирск), по 5 пмоль праймеров, 10 нг геномной ДНК и деионизованную воду до объема 15 мкл. Амплификацию проводили в программируемом термоциклере MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Условия амплификации: первичная денатурация ДНК – 3 мин при 94°C, затем 35 циклов, включающих три этапа: 30 с при 94°C, 30 с при 57°C, 1 мин при 72°C; финальная достройка цепей – 10 мин при 72°C, затем охлаждение до 4°C. Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном агарозном геле в однократном ТАЕ-буфере (0,04M трис-ацетат, 0,002M ЭДТА) при напряжении 100 V, окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете и фотодокументировали. Оценку размеров фрагментов ДНК осуществляли относительно 100 bp + 1,5 kb ДНК-маркера («СибЭнзим»). Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe®Photoshop® CS2. Продукты амплификации очищали с использованием набора GeneJet™ PCR Purification Kit (Ferments, EU).

Секвенирование проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Для редактирования нуклеотидных последовательностей применяли программу Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США). Анализ, вы-

равнивание последовательностей осуществляли с помощью программ SeqMan™ II и MegAlign™ (DNASTAR Inc.).

Результаты исследования и обсуждение

Полученная ETS-матрица содержит 570 пар оснований. Сравнение нуклеотидных последовательностей показало высокую степень сходства районов ETS *P. nemoralis* и *P. palustris*. Тем не менее некоторые различия, явные и неявные, все же удалось установить. Явные различия были обнаружены в позициях нуклеотидов 44, 537, 538 и 562. В основном имели место транзиции (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин), в одном случае была зарегистрирована трансверсия (замена пиримидина на пурин или пурина на пиримидин): в позиции 538 у *P. nemoralis* стоит R, что может означать аденин или гуанин, а у всех *P. palustris*, у которых отсековировался этот участок, на этом месте располагается цитозин). И, наконец, в позиции 44 у *P. nemoralis* была обнаружена делеция, а у *P. palustris* – аденин. Интерес представляет также 136-я позиция, где у *P. nemoralis* стоит цитозин, у образцов № 3, 5, 7 *P. palustris* – аденин, а у остальных образцов эта позиция выпадает вообще, т.е. имеют место и трансверсия, и делеция.

Вместе с тем были обнаружены неявные различия. Так, в позиции 43 у *P. palustris* стоит цитозин, а у *P. nemoralis* – M, что может означать и цитозин, и тимин; в позиции 161 у *P. palustris* располагается гуанин, а у *P. nemoralis* – S, что может означать и гуанин, и цитозин. Однако, вероятнее всего, это ошибки идентификации нуклеотидов; такие сравнения не совсем корректны, поскольку у *P. nemoralis* исследовался всего один экземпляр, тем не менее некоторое представление о генетическом сходстве видов оно дает.

Исследование полученных нуклеотидных последовательностей района ETS рибосомной ДНК *P. palustris* выявило невысокую изменчивость данного фрагмента. Всего у четырех образцов были выявлены хотя бы какие-то отличия. Наиболее изменчивым оказался этот фрагмент у образца № 5, собранного на Алтае. У него обнаружилось 8 замен, из них в позициях 111, 113, 316, 355 и 356 имели место транзиции, а в 535, 536 и 537 – трансверсии. В четырех позициях (316, 355, 356 и 537) наблюдались транзиции у образца 7 из Кемеровской области, транзиция в позиции 316 и делеция в позиции 537 были обнаружены в образце № 2 (Кузнецкий Алатау), и, наконец, делеция была выявлена в 89-й позиции образца №3 (г. Томск).

Для выявления различий в нуклеотидной последовательности ETS *P. nemoralis* и *P. palustris* были привлечены данные Gen Bank Национального центра биотехнологической информации США [33] и программа для сравнивания последовательностей BLAST (basic local alignment search tool). Эта программа позволяет исследователю сравнивать интересующие его последовательности с последовательностями, хранящимися в базе данных [37]. Сравнения показали не только высокую степень сходства между *P. palustris*

и *P. nemoralis* (табл. 2), но также и сходство этих видов с *P. glauca* Vahl. (sect. *Stenopoa*), *P. lettermanii* Vasey (sect. *Abbreviatae* Nannf. Ex Tzvel.) и *P. laxa subsp. flexuosa* (Sm.) Hyl. Последний, по мнению R. Soreng [38], образовался в результате гибридизации *P. glauca* и *P. laxa* Haenke (sssect. *Oreinos* Asch. et Graeb.).

Т а б л и ц а 2

Степень генетического сходства исследованных сибирских *P. nemoralis* и *P. palustris* с близкими видами мятликов, представленными в GenBank

Аминокислотные последовательности района ETS рибосомной ДНК из GenBank			Степень сходства (max. ident.) с исследованными сибирскими образцами, %	
№	Происхождение образца	Вид	<i>P. nemoralis</i>	<i>P. palustris</i>
GQ324324.1	CAN: Gillespie 5804	<i>P. glauca</i>	98	99
GQ324355.1	BRNU: Hajkova et al. 2004-18	<i>P. nemoralis</i>	97	98
GQ324345.1	US: Soreng & Soreng 7434	<i>P. lettermanii</i>	97	97
GQ324342.1	Brochmann 2000-3 (1or 3)	<i>P. laxa subsp. flexuosa</i>	97	98

При этом надо отметить, что два последних вида, хотя и близки по происхождению к видам секции *Stenopoa*, относятся даже к другим секциям.

Заключение

Исследование нуклеотидных последовательностей ETS рибосомной ДНК *P. palustris* показало слабое генетическое отличие по этому признаку не только от близкого вида *P. nemoralis*, но даже и от видов близких секций. Проведенное исследование показало, что участок ETS, как и ITS, недостаточно информативен для исследования родственных отношений на внутрисекционном уровне. Для решения задач на этом уровне следует попробовать другие методы молекулярного анализа.

Авторы благодарны д-ру L.J. Gillespie (Музей естественной истории, г. Оттава, Канада) и д-ру T. Giraud (Университет Париж-Юг, Орсэ, Франция) за ценные советы; канд. биол. наук А.Л. Эбелю (Томский государственный университет, г. Томск); канд. биол. наук С.А. Шереметовой, канд. биол. наук Е.А. Буко (Кузбасский ботанический сад, г. Кемерово) и Е.Г. Николину (Институт биологических проблем криолитзоны СО РАН, г. Якутск) за предоставленные гербарные образцы *P. palustris*.

Литература

1. Цвелев Н.Н. К систематике мятликов (*Poa* L.) европейской части СССР // Новости систематики высших растений. 1972. Т. 9. С. 47–54.
2. Попов М.Г. Флора Средней Сибири. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1957. Т. 1. 555 с.
3. Овчинников П.Н. Основные направления видообразования в связи с происхождением типов растительности Средней Азии // Труды АН Таджикской ССР. 1955. Вып. 31. С. 19–33.

4. Серебрякова Т.И. Побегообразование и жизненные формы некоторых мятликов (*Poa* L.) в связи с их эволюцией // Ботанический журнал. 1965. Т. 50, № 11. С. 1536–1556.
5. Цвелев Н.Н. О роде мятлик (*Poa* L.) в СССР // Новости систематики высших растений. 1974. Т. 11. С. 24–41.
6. Пояркова Е.Н. Мятлики флоры Украинской ССР : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1965. 15 с.
7. Пробатова Н.С. К вопросу о системе рода мятлик (*Poa* L.) в связи с изучением его дальневосточных представителей // Комаровские чтения. Владивосток, 1969. Вып. 15–17. С. 117–127.
8. Пробатова Н.С. Семейство мятликовые, или злаки // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Л., 1985. Т. 1. С. 89–382.
9. Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция. М. : Мир, 1982. 488 с.
10. Soreng R.J. Chloroplast-DNA and biogeography in a reticulating group: study in *Poa* (Poaceae) // Amer. J. Bot. 1990. Vol. 77, № 11. P. 1383–1400.
11. Soreng R.J., Davis J.I., Doyle J.J. A phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation in *Poaceae* subfam. *Pooideae* // Pl. Syst. Evol. 1990. Vol. 172. P. 83–97.
12. Soreng R.J., Davis J.I. Phylogenetic structure in *Poaceae* subfamily *Pooideae* as inferred from molecular and morphological characters: misclassification versus reticulation // Grasses systematics and evolution / eds. S.W. L. Jacobs, J. Everett. Melbourne, 2000. P. 61–74.
13. Gillespie L.J., Consaul L.L., Aiken S.G. Hybridisation and the origin of the arctic grass *Poa hartzii* (Poaceae): evidence from morphology and chloroplast DNA restriction site data // Can. J. Bot. 1997. Vol. 75. P. 1978–1997.
14. Gillespie L.J., Boles D. R. Phylogenetic relationships and infraspecific variation in Canadian Arctic *Poa* based on chloroplast DNA restriction site data // Can. J. Bot. 2001. Vol. 79. P. 679–701.
15. Gillespie L.J., Soreng R.J. A phylogenetic analysis of the Bluegrass genus *Poa* based on cpDNA restriction site data // Syst. Bot. 2005. Vol. 30, № 1. P. 84–105.
16. Gillespie L.J., Archambault A., Soreng R.J. Phylogeny of *Poa* (Poaceae) based on trnT-trnF sequence data: major clades and basal relationships // Aliso. 2007. Vol. 23. P. 420–434.
17. Родионов А.В., Ким Е.С., Пунина Е.О. и др. Эволюция хромосомных чисел в трибах *Aveneae* и *Poeae* по данным сравнительного исследования внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 ядерных генов 45S рРНК // Ботанический журнал. 2007. Т. 92, № 1. С. 57–71.
18. Родионов А.В., Носов Н.Н., Ким Е.С. и др. Происхождение полиплоидных геномов мятликов (*Poa* L.) и феномен потока генов между Северной Пацификой и субантарктическими островами // Генетика. 2010. Т. 46, № 12. С. 1598–1608.
19. Носов Н.Н., Родионов А.В. Молекулярно-филогенетическое изучение взаимоотношений между представителями рода *Poa* (Poaceae) // Ботанический журнал. 2008. Т. 93, № 12. С. 1919–1936.
20. Stoneberg Holt S. D., Horova L., Bureš P. Indel patterns of the plastid DNA trnL-trnF region within the genus *Poa* (Poaceae) // Journal of Plant Research. 2004. № 117. P. 393–407.
21. Stoneberg Holt S. D., Horová L., Bureš P. et al. The trnL-F plastid DNA characters of three *Poa pratensis* (Kentucky bluegrass) varieties // Plant, Soil and Environment. 2005. № 51. P. 94–99.
22. Антонов А.С. Основы геносистематики высших растений. М. : МАИК Наука / Интерпериодика, 2000. 135 с.
23. Шнеер В.С. Краткий очерк способов получения, обработки и трактовки данных по последовательностям ДНК в систематике растений. II. Методы построения филогенетических деревьев и оценки их достоверности; о выборе таксонов и последовательностей ДНК для анализов // Ботанический журнал. 2005. Т. 90, № 3. С. 304–329.

24. Hoggard G.D., Kores P.J., Molvary M., Hoggard R.K. The phylogeny of *Gaura* (Onagraceae) based on ITS, ETS, and *trnL-F* sequence data // American Journal of Botany. 2004. Vol. 91. P. 139–148.
25. SpringerImages. URL: <http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences>
26. 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. Gard. 1995. Vol. 82. P. 247–277.
27. Gillespie L.J., Soreng R.J., Bull R. et al. Phylogenetic Relationships in Subtribe Poinae (Poaceae, Poae) Based on Nuclear ITS and Chloroplast *trnT-trnF* Sequences // Botany. 2008. № 86. P. 938–967.
28. Linder C.R., Goertzen L.R., Heuvel B.V. et al. Phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2000. Vol. 14. P. 285–303.
29. Morgan D.R. nrDNA external transcribed spacer (ETS) sequence data, reticulate evolution, and systematic of *Machaeranthera* (Asteraceae) // Syst. Bot. 2003. Vol. 28, № 1. P. 179–190.
30. Baldwin B.G., Marcos S. Phylogenetic utility of the external transcriber spacer (ITS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae) // Molecular Phylogenetic and Evolution. 1998. Vol. 10. P. 449–463.
31. Acevedo-Rosas R., Cameron K., Sosa V., Pell S. A molecular phylogenetic study of *Graptopetalum* (Crassulaceae) based on ETS, ITS, RPL16, and TRNL-F nucleotide sequences // American Journal of Botany. 2004. Vol. 91. P. 1099–1104.
32. Orlando T., Rubio M.A., Sturm N. et al. Intergenetic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*) // Mem. Inst. Rio de Janeiro : Oswaldo Cruz, 2002. Vol. 97. P. 100–107.
33. Gen Bank. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
34. Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений. Барнаул : АзБука, 2007. 64 с.
35. Holmgren P.K., Holmgren N.H., Barnett L. C. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. URL: <http://sweetgum.nybg.org/ih>
36. Gillespie L.J., Soreng R.J., Jacobs S.W.L. Phylogenetic relationship of Australian *Poa* (Poaceae: Poinae), including molecular evidence for two new genera, *Saxipoa* and *Sylvipoa* // Austr. Syst. Bot. 2009. Vol. 22. P. 413–436.
37. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М. : Бином, 2009. 256 с.
38. Soreng R.J. *Poa* L. – The Bluegrass // Flora of North. America north of Mexico / eds. by M.E. Barkworth, C.A. Capels, S. Long, L.K. Anderton, M. Piep. New York ; Oxford : Oxford Univ. Press, 2007. Vol. 24. P. 486–601.

Поступила в редакцию 03.08.2011 г.

Marina V. Olonova¹, Natalia V. Khrabrova²

RESEARCH OF GENETIC SIMILARITY OF *Poa nemoralis* L.
AND *Poa palustris* L. (POACEAE), BASED ON ETS OF 18S-26S NR DNA
SEQUENCE DATA

An attempt of phylogenetic reconstruction of section *Stenopoa* Dumort. (genus *Poa* L.), based on classic morphological and ecologo-geographycal methods, has revealed a lot of controversial points, which can be settled by using of the molecular methods, as alternative method of research. The relationship of both mesomorphic species (*Poa nemoralis* L. and *P. palustris* L.), which are supposed to be situated on the base of the main branches of phylogenetic tree of section, is one of the main problems of section phylogeny. These species are very similar both in their morphology and habitus, and the difference between them is much less, then the difference between their xeromorphic derivates. Nevertheless, this difference does not express the degree of relationship, but may be caused by convergent similarity. The genetic differentiation of these species should be searched for eliciting of their divergence, and, consequently, their position in the section system.

As far as ITS1 and ITS2 sequences are known to not reveal the differences between *P. nemoralis* and *P. palustris*, the attempt of its revealing, based on ETS (external transcribed spacer) has been made. The ETS region, located between 18S and 26S of nuclear ribosomal DNA was sequenced in 10 representatives of *P. palustris* and one sample of *P. nemoralis* in order to evaluate their genetic similarity. Since the ETS region of *P. nemoralis* had already been investigated, our search was concentrated on *P. palustris*.

The resulting ETS matrix contains the 570 base pairs. Comparison of the nucleotide sequences has showed a high similarity of ETS areas of *P. nemoralis* and *P. palustris*, however, some differences, implicit and explicit, has been revealed. Obvious differences were found in positions of nucleotides 44, 537, 538 and 562. Basically there were transitions. In one case the transversion was reported at position 538. In this position in *P. nemoralis* was R, which may mean adenine or guanine, whereas all *P. palustris* had cytosine at this area. Finally in position 44 in *P. nemoralis* was found deletion, whereas *P. palustris* had adenine. Position 136 is quite interesting as well: *P. nemoralis* has cytosine here, the samples 3, 5, 7 of *P. palustris* shows an adenine in this position, whereas in the other samples this position falls out as a whole, ie both transversion and deletion take place. Some implicit differences were found as well. Thus, in position 43 *P. palustris* had cytosine, whereas *P. nemoralis* – M, that may mean both cytosine, and thymine; in position 161 *P. palustris* had guanine, whereas *P. nemoralis* – S, which may mean both guanine and cytosine. Nevertheless, these seem to be the mistakes of identification of nucleotides, and, in general, such comparisons are not quite proper; because *P. nemoralis* was represented by only one sample, however, it may give a notion on the genetic similarity between species. Comparison of our data with ones, obtained from GenBank, has confirmed the close genetic similarity of *P. palustris*, not only with *P. nemoralis*, but also with *P. glauca*, with *P. laxa* subsp. *flexuosa* (Sm.) Hyl., (which is supposed to be derived from the hybridization *P. laxa* and *P. glauca*), and even with *P. lettermanii* Vasey (sect. *Abbreviatae* Nannf. ex Tzvel.). The search has revealed the weak variability of this region. The studies have shown that ETS region has proved to be too conservative for the investigation of relationships between quite close species of *Stenopoa*. Thus, other methods should be tried for this purpose.

Key words: ETS; *Poa nemoralis* L.; *Poa palustris* L.

Received August 3, 2011