

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК ВИДОВ *Oxytropis* СЕКЦИИ *Polyadena* (Fabaceae) АЗИАТСКОЙ РОССИИ: ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

© 2021 г. А. Б. Холина^{*,@}, М. М. Козыренко^{*}, Е. В. Артюкова^{*}, Т. Э. Позднякова^{**}

^{*}Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения РАН, просп. 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток, 690022 Россия

^{**}Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Петербургское ш., 2, Санкт-Петербург–Пушкин, 196601 Россия

[@]E-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 15.08.2019 г.

После доработки 13.04.2020 г.

Принята к публикации 14.06.2020 г.

Проанализирован нуклеотидный полиморфизм межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК популяций шести видов *Oxytropis* секции *Polyadena* Азиатской России. Обнаружен низкий уровень нуклеотидного разнообразия (0.0001–0.0014), за исключением двух популяций *O. glandulosa* (0.0036 и 0.0059). Отмечено, что гаплотипическое разнообразие варьирует от 0.133 до 0.911. Установлено, что высокие межвидовые генетические дистанции и выявленные видоспецифичные нуклеотидные замены и индели указывают на существенную дифференциацию хлоропластных геномов *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. trichophylla*, *O. glandulosa* (линии 2, 3). Виды *O. pseudoglandulosa*, *O. muricata*, *O. varlakovii* и *O. glandulosa* (линия 1) образуют слабо дифференцированный комплекс, что обусловлено, вероятно, относительно недавней их дивергенцией.

DOI: 10.31857/S0002332921010070

Виды рода *Oxytropis* DC. (род Остролодка, Малышев, 2008) секции *Polyadena* Bunge (Fabaceae) — это бесстебельные растения с мутовчатым расположением листочков и бугорчатыми железками на бобах, листьях, прилистниках и чашечках, с пурпурово-лиловым, розовым или беловато-желтым венчиком (Малышев, 2008). Секция включает ~10 видов, в Азиатской России произрастает шесть видов: *O. glandulosa* Turcz. (остролодка железистая), *O. physocarpa* Ledeb. (о. вздуто-плодная), *O. microphylla* (Pall.) DC. (о. мелколистная), *O. muricata* (Pall.) DC. (о. колючковая), *O. trichophylla* Bunge (о. пушистопузырчатая) и *O. varlakovii* Serg. (о. Варлакова), четыре последних встречаются также на севере Монголии, а *O. microphylla* еще и в Северной Маньчжурии (Малышев, 2008). В Монголии также произрастает представитель секции *Polyadena* *O. pseudoglandulosa* Gontsch. ex Grub. (О. ложножелезистая) — эндем Монголии (Улзийхутаг, 2003). Виды *O. glandulosa* (узколокальный эндем Бурятии), *O. trichophylla* и эндем Алтая и Тывы *O. physocarpa* включены в Красную книгу Российской Федерации (2008) как редкие. *O. glandulosa* включен также в Красную книгу Республики Бурятия (2013). Реликты миоцен-плиоценовой флоры *O. microphylla* и *O. varlakovii* (Пешкова,

1972) включены в Красную книгу Иркутской области (2010), первый как уязвимый вид, второй, субэндемик юга Восточной Сибири, как вид, находящийся под угрозой исчезновения. Алтае-Саянский субэндемик *O. muricata* включен в Красную книгу Красноярского края (2012) как уязвимый вид, численность которого сокращается на северной границе ареала. Предполагается (Малышев, 2008), что *O. microphylla* возникла от гибридизации между *O. muricata* и *O. lanata* (Pall.) DC. (о. шерстистая) секции *Verticillares* DC. Кроме этого *O. muricata* внешне сходна с *O. interposita* Sipl. (о. посредственная) секции *Verticillares*, но последняя отличается отсутствием железистости, большей высотой побегов и наличием опушения на соцветии и бобах (Сипливинский, 1966). По морфологии *O. varlakovii* отчасти напоминает *O. interposita*, но у первой бобы бородавчатые; *O. varlakovii* также близка к *O. muricata* и к *O. glandulosa*, но от первой отличается более короткими чашелистиками и более волосистыми бобами, а от второй — светлым венчиком (Малышев, 2008).

Известно, что многие представители рода *Oxytropis*, в том числе и виды секции *Polyadena*, используются в народной медицине Сибири, Монголии, Средней Азии и Казахстана в качестве

эффективных лечебных средств, обладающих ранаживляющими, диуретическими и сосудорасширяющими свойствами. Химические исследования растений показали наличие биологически активных веществ, таких как флавоноиды (кемпферол, рамназин, робинин, изоробинин, байкалеин и др.), алкалоиды (мурикатин, мурикатинин, мурикатид и др.), фенолкарбоновые кислоты, тритерпеноиды, сесквитерпеновые лактоны, кумарины и сапонины (Повыдыш и др., 2010). Флавоноиды обладают сосудорасширяющими, жаропонижающими, гипотензивными и желчегонными свойствами, а кумарины, обнаруженные у *O. glandulosa*, проявляют противоопухолевую активность (Повыдыш и др., 2010). Три алкалоида были выделены из наземной части *O. pseudoglandulosa* (Пурэвсүрэн и др., 2002). Показано, что экстракт *O. pseudoglandulosa* может быть сильнодействующим средством для лечения окклюзионных сосудистых заболеваний (Lee *et al.*, 2018).

В настоящее время из-за активной хозяйственной деятельности человека происходит резкое уменьшение численности особей, вплоть до полного исчезновения популяций в некоторых местобитаниях. Результаты ценопопуляционных исследований *O. microphylla*, *O. varlakovii*, *O. trichophysa* и *O. glandulosa* показали, что умеренная пастбищная дигрессия не наносит им вреда, а уязвимы они из-за малого размера популяций в пределах ограниченного ареала в сочетании с узкой экологической амплитудой (Селютина, Санданов, 2016). Поэтому виды секции *Polyadena* нуждаются в мерах по сохранению и восстановлению природных популяций. В первую очередь необходимо определить уровень генетической изменчивости и описать генофонд вида, так как один из решающих факторов при восстановлении вида — воссоздание его исторически сложившейся популяционно-генетической структуры. Эффективными и надежными молекулярными маркерами для популяционного анализа и реконструкции филогенетических связей близкородственных видов *Oxytropis* являются межгенные спейсеры *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлоропластной ДНК (хпДНК) (Холина и др., 2018, 2019; Kholina *et al.*, 2018). По данным секвенирования этих регионов проведена оценка состояния природных популяций ряда редких и эндемичных видов *Oxytropis* (Холина и др., 2018; Kholina *et al.*, 2018), уточнены филогенетические отношения видов секций *Verticillares* (Холина и др., 2019) и *Orobia* (Козыренко и др., 2020).

Цель работы — изучение генетического разнообразия видов *Oxytropis* секции *Polyadena* Азиатской России и реконструкция филогенетических связей близкородственных видов на основе анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 129 растений из 13 природных популяций видов *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. pseudoglandulosa*, *O. varlakovii*, *O. glandulosa* (по 5–15 образцов из популяции) и *O. trichophysa* (1 образец) секции *Polyadena* (табл. 1). Методы выделения ДНК, амплификации и секвенирования межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК описаны в наших предыдущих работах (Артюкова и др., 2004; Холина и др., 2016, 2018). Нуклеотидные последовательности были определены на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США) в Центре коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Для каждого образца последовательности регионов выравнивали с использованием программы SeaView v. 4.7 (Gouy *et al.*, 2010). Гаплотипическое (h) и нуклеотидное (π) разнообразия, генетические дистанции между популяциями/видами (F_{ST} — попарные значения индексов фиксации), межпопуляционную дифференциацию (Φ_{ST} , анализ молекулярной дисперсии, AMOVA), генный поток (Nm) и степень дивергенции (D_{XY}) между популяциями/видами/гаплогруппами рассчитывали с помощью прикладных генетических программ Arlequin v. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010) и DnaSP v. 5.0 (Librado, Rozas, 2009). Генеалогические взаимоотношения гаплотипов анализировали методом медианного связывания (Median Joining (MJ)) в программе Network v. 5.0.1.1 (Bandelt *et al.*, 1999), кодируя каждую делецию или вставку, независимо от их размера, как единичное мутационное событие. Филогенетический анализ последовательностей проводили методами максимальной экономии (Maximum Parsimony (MP)) и ближайшего связывания (Neighbour-Joining (NJ)) с помощью пакета программ PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003), а также байесовского подхода (BI) в программе MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Устойчивость топологии MP- и NJ-деревьев оценивали с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев (Bootstrap Percentage (BP), %). При BI-анализе полной матрицы создавали 10000000 генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 1000 генераций, т.е. 10000 проб. Апостериорные вероятности (Posterior Probabilities (PP)) рассчитаны по отобранному во время стационарной фазы деревьям. Значения BP < 50% и PP < 0.95 не принимали во внимание. В качестве внешней группы использовали образец *O. glabra* (Lam.) DC. (о. голая) секции *Mesogaea* Bunge (номера в GenBank LT856572, LT856585, LT856598) (Холина и др., 2018).

Таблица 1. Исследуемые популяции видов *Oxytropis* секции *Polyadena* и параметры генетического разнообразия по данным полиморфизма межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК

Местонахождение (число образцов)	Код популяции	Разнообразие (SD)		Гаплотипы
		гаплотипическое	нуклеотидное	
O. muricata				
Иркутская обл.				
окр. оз. Гызги-Нур (9)	MUR1	0.417 (0.191)	0.0009 (0.0006)	P1–P3
окр. с. Сарма (8)	MUR2	0.250 (0.180)	0.0007 (0.0005)	P2, P4
окр. мыса Ото-Хушун (13)	MUR3	0.692 (0.075)	0.0014 (0.0008)	P1, P2, P5
В целом для вида (30)		0.533 (0.096)	0.0011 (0.0007)	P1–P5
O. microphylla				
Иркутская обл.				
окр. с. Озера (9)	MICR1	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)	P6
окр. оз. Гызги-Нур (6)	MICR2	0.600 (0.215)	0.0007 (0.0005)	P6, P7, P8
окр. оз. Гурби-Нур (11)	MICR3	0.182 (0.144)	0.0001 (0.0001)	P6, P7
окр. оз. Намиш-Нур (11)	MICR4	0.182 (0.144)	0.0001 (0.0001)	P6, P8
В целом для вида (37)		0.203 (0.084)	0.0002 (0.0002)	P6–P8
O. pseudoglandulosa				
Монголия, окр. г. Улан-Батор (7)	PSEGLA	0.809 (0.130)	0.0011 (0.0007)	P9–P12
O. trichophysa				
Республика Тыва, хр. Монгун-Тайга, долина р. Мугур (1)	TRICH	—	—	P13
O. varlakovii				
Забайкальский край, окр. оз. Ножий (5)	VARL	0.700 (0.218)	0.0003 (0.0003)	V1–V3*
O. glandulosa				
Республика Бурятия				
окр. с. Аргада (10)	GLAKUR	0.911 (0.077)**	0.0059 (0.0033)**	G1–G7**
окр. с. Уржил (14)	GLABAR	0.703 (0.101)**	0.0036 (0.0020)**	G4, G6–G9**
окр. с. Ширинга (15)	GLASHIR	0.133 (0.112)**	0.0002 (0.0002)**	G10, G11**
окр. с. Гарам (10)	GLAGAR	0.356 (0.159)**	0.0006 (0.0004)**	G10, G11**
В целом для вида (49)		0.763 (0.053)	0.0081 (0.0040)	G1–G11

Примечание. SD – стандартное отклонение, * – гаплотипы (Холина и др., 2018), ** – значения генетического разнообразия и гаплотипы (Kholina *et al.*, 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для 75 растений видов *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. pseudoglandulosa* и *O. trichophysa* были определены нуклеотидные последовательности межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК. В матрицу данных были включены полученные ранее последовательности этих же регионов 49 образцов из 4 популяций *O. glandulosa* (Kholina *et al.*, 2018) и 5 образцов *O. varlakovii* (Холина и др., 2018). Нуклеотидные последовательности каждого региона хпДНК 129 образцов шести исследуемых видов секции *Polyadena* характеризуются относительно низкой нуклеотидной изменчивостью и разной длиной вследствие присутствия коротких

(4–16 нуклеотидов) инсерций/делеций (инделей), моно- и динуклеотидных повторов. В последовательностях *psbA–trnH* обнаружены короткие индели (6 нуклеотидов) и поли-А-мотив (A₉–A₁₃), вариабельных нуклеотидных замен нет. В *trnL–trnF* выявлены три замены, информативные согласно методу максимальной экономии, делеция 16 нуклеотидов, поли-Т-мотив (T₈–T₁₁) и динуклеотидный ТА-мотив, в котором от 6 до 13 повторов. В *trnS–trnG* обнаружены мотивы поли-А (A₁₀–A₁₄) и поли-Т (T₇–T₁₁), а также 8 нуклеотидных замен, информативных согласно методу максимальной экономии. Длина объединенной матрицы последовательностей *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG*

после выравнивания составила 2431 сайт (1–463, 464–1239 и 1240–2431 соответственно), из них 2359 мономорфных и 11 нуклеотидных замен, информативных согласно методу максимальной экономии, в позициях 602, 1238, 1239, 1263, 1295, 1403, 1585, 1686, 1727, 2113 и 2199. Все последовательности образцов *O. muricata* маркируются двумя нуклеотидными заменами (Т в позиции 1238 и А в позиции 1239), *O. microphylla* – одной заменой (С в позиции 1686) и вставкой шести нуклеотидов (ТААТА, позиции 393–398), *O. trichophysa* – вставкой четырех нуклеотидов (ТТТА, позиции 765–768). У *O. pseudoglandulosa*, *O. varlakovii* и *O. glandulosa* видоспецифичных маркеров нет.

Нуклеотидные замены и индельные вариации в 129 последовательностях объединенной матрицы выявили 27 гаплотипов, из них 13 гаплотипов видов *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. pseudoglandulosa* и *O. trichophysa* были депонированы в GenBank под номерами MN199983–MN199995, MN199996–MN200008, MN200009–MN200021 (*psbA–trnH*, *trnL–trnF*, *trnS–trnG* соответственно), 3 гаплотипа *O. varlakovii* (V1–V3) и 11 гаплотипов *O. glandulosa* (G1–G11) были определены и депонированы в GenBank нами ранее (Холина и др., 2018; Kholina et al., 2018). *O. muricata* принадлежит пять гаплотипов (P1–P5), *O. microphylla* – 3 (P6–P8), *O. pseudoglandulosa* – 4 (P9–P12), *O. trichophysa* – 1 (P13) (табл. 1). Общих гаплотипов у исследуемых видов *Oxytropis* секции *Polyadena* не обнаружено.

Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие в популяциях изменяется от 0.133 до 0.911 и от 0.0001 до 0.0059 соответственно, одна популяция *O. microphylla* (MICR1) оказалась мономорфной (табл. 1). Виды характеризуются низким уровнем нуклеотидного разнообразия, кроме *O. glandulosa*, и разными уровнями гаплотипического разнообразия: низким у *O. microphylla*, средним у *O. muricata*, высоким у *O. pseudoglandulosa*, *O. varlakovii* и *O. glandulosa* (табл. 1). У *O. muricata* генетические дистанции (F_{ST}) между парами популяций MUR1–MUR2, MUR1–MUR3 и MUR2–MUR3 очень малы (0.02591, 0.03291 и 0.15937 соответственно) и статистически значимы только у последней пары ($P < 0.028$), генный поток (Nm) составил ~3 мигранта на поколение. У *O. microphylla* значения F_{ST} между всеми парами популяций также были очень малы и все статистически незначимы (данные не представлены). Анализ распределения изменчивости (AMOVA) показал, что достоверная генетическая дифференциация между географически изолированными популяциями у *O. muricata* и между популяциями у *O. microphylla* отсутствует ($\Phi_{ST} = 0.08395$, $P > 0.130$ и $\Phi_{ST} = 0.02361$, $P > 0.263$ соответственно). Один из по-

казателей степени генетической разобщенности между популяциями – дивергенция нуклеотидных последовательностей (D_{xy}), которая отсутствует между популяциями каждого из этих видов. Ранее было установлено (Kholina et al., 2018), что у *O. glandulosa* >75% изменчивости приходится на межпопуляционную компоненту и <25% – на внутривидовую ($\Phi_{ST} = 0.75783$, $P < 0.0001$), $Nm = 0.25$. Такая высокая межпопуляционная дифференциация связана с наличием трех эволюционных (филетических) линий хлоропластного генома у этого вида (Kholina et al., 2018).

Для расчета генетических дистанций и реконструкции филогенетических связей с близкородственными видами в объединенную матрицу нуклеотидных последовательностей гаплотипов видов секции *Polyadena* были добавлены полученные ранее последовательности гаплотипов L1–L18 *O. lanata* (LT994841–LT994858, LT994895–LT994912, LT994949–LT994966) (Холина и др., 2019) и H23–H27 *O. interposita* (LT856489–LT856493, LT856522–LT856526, LT856555–LT856559) (Холина и др., 2018) секции *Verticillares*. Длина матрицы после выравнивания составила 2435 сайтов, 2347 из которых мономорфные, 16 нуклеотидных замен были информативны согласно методу максимальной экономии.

Генетические дистанции между видами/линиями секции *Polyadena* варьировали в значительных пределах (табл. 2). Высокие и статистически значимые значения F_{ST} определены между *O. lanata* и всеми видами секции *Polyadena* и *O. interposita* секции *Verticillares*. Генетические дистанции между парами, образованными видами *O. interposita*, *O. muricata*, *O. pseudoglandulosa* и *O. varlakovii*, оказались очень малы и статистически незначимы. Значения дивергенции нуклеотидных последовательностей между парами, образованными каждым видом *O. lanata* и *O. interposita* со всеми другими видами секции *Polyadena*, согласуются со значениями F_{ST} . Следует отметить, что среднее число нуклеотидных замен на один сайт между *O. interposita* и *O. pseudoglandulosa* равно нулю.

Филогенетические деревья, построенные разными методами (MP, NJ, BI), практически не различаются по топологии. На рис. 1 представлено MP-дерево (консенсус 78 деревьев: длина – 34 шага, индекс соответствия – 0.9706, индекс гомоплазии – 0.0294, индекс удерживания – 0.9923), в котором гаплотипы видов *Oxytropis* двух секций сформировали две клады. Все гаплотипы *O. lanata* образовали кладу I с невысокой поддержкой в MP- и NJ-анализах (74 и 67% соответственно) и не поддержанную в BI-анализе, а гаплотипы всех видов секции *Polyadena* и *O. interposita* секции *Ver-*

Таблица 2. Нуклеотидная дивергенция и генетические дистанции между *O. glandulosa* (линии 1–3), *O. muricata* (4), *O. microphylla* (5), *O. pseudoglandulosa* (6), *O. varilakovii* (7), *O. trichophrysa* (8), *O. lanata* (9) и *O. interposita* (10) по данным полиморфизма межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлДНК

Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	D_{XY}									
1	—	4.000 (4)	5.000 (5)	4.000 (4)	6.000 (6)	2.000 (2)	1.333 (1)	3.000 (3)	5.889 (5)	2.000 (2)
2	0.00168	—	5.000 (5)	6.000 (6)	6.000 (6)	4.000 (4)	3.333 (3)	3.000 (3)	5.889 (5)	4.000 (4)
3	0.00209	0.00211	—	7.000 (7)	1.000 (1)	5.000 (5)	4.333 (4)	2.000 (2)	6.889 (6)	5.000 (5)
4	0.00167	0.00253	0.00293	—	8.000 (8)	2.000 (2)	2.667 (2)	5.000 (5)	7.889 (7)	2.000 (2)
5	0.00251	0.00253	0.00042	0.00334	—	6.000 (6)	5.333 (5)	3.000 (3)	7.889 (7)	6.000 (6)
6	0.00083	0.00168	0.00209	0.00084	0.00251	—	0.667 (0)	3.000 (3)	5.889 (5)	0.000 (0)
7	0.00056	0.00140	0.00181	0.00111	0.00223	0.00028	—	2.333 (2)	5.222 (4)	0.667 (0)
8	0.00125	0.00126	0.00084	0.00209	0.00125	0.00125	0.00097	—	4.889 (4)	3.000 (3)
9	0.00246	0.00248	0.00289	0.00330	0.00330	0.00246	0.00218	0.00204	—	5.889 (5)
10	0.00084	0.00168	0.00209	0.00084	0.00251	0.00000	0.00028	0.00124	0.00246	—
	F_{ST}									
1	0.00000									
2	0.54912**	0.00000								
3	0.82786**	0.67449**	0.00000							
4	0.43911**	0.57627*	0.80583***	0.00000						
5	0.79923**	0.68848**	0.85564***	0.78502**	0.00000					
6	0.36905**	0.59045**	0.85772***	0.33892**	0.81150**	0.00000				
7	0.33956**	0.54812**	0.91058***	0.37138**	0.86792***	0.16049***	0.00000			
8	0.67742***	0.38462***	0.84615***	0.65432***	0.81481***	0.73099***	0.87879***	0.00000		
9	0.68718*	0.72446*	0.86189**	0.69489*	0.80840*	0.67706*	0.66002*	0.70918**	0.00000	
10	0.35706*	0.59282**	0.83765**	0.25758***	0.79850**	0.05224***	0.00319***	0.68182***	0.65659*	0.00000

Примечание. D_{XY} — нуклеотидная дивергенция, выше диагонали — среднее число нуклеотидных различий (число фиксированных различий), ниже диагонали — среднее число нуклеотидных замен на один сайт; F_{ST} — парные генетические дистанции. * — $P < 0.0001$, ** — $0.01 < P < 0.05$; *** — $P > 0.05$. Значимость определена на основе 1023 пермутаций; для табл. 2 и 3.

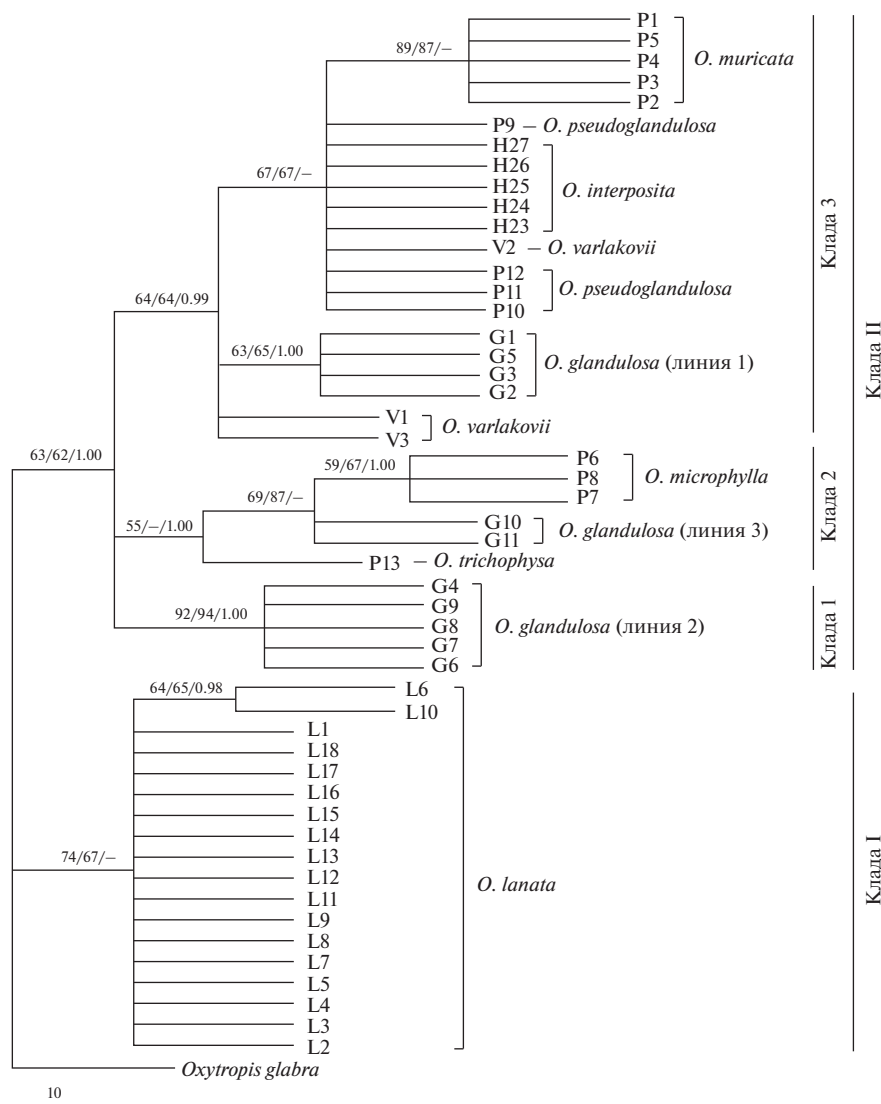


Рис. 1. MP-дерево генетических взаимоотношений видов *Oxytropis* секции *Polyadena* и близкородственных им видов секции *Verticillares*. Числа в узлах — значения индекса бутстрепа для MP- и NJ-методов (>50%) и апостериорные вероятности для BI-анализа (>0.95). Внешняя группа — *O. glabra*.

ticillares образовали слабо поддерживанную в MP- и NJ-анализах (63 и 62% соответственно) и высоко поддерживанную в BI-анализе (PP = 1.00) монофилетическую кладу II, в которой можно выделить три поддерживанные клады второго порядка (рис. 1). Кладу I образуют гаплотипы *O. glandulosa* (линия 2), кладу 2 — *O. microphylla*, *O. trichophysa* и *O. glandulosa* (линия 3), кладу 3 — *O. muricata*, *O. glandulosa* (линия 1), *O. pseudoglandulosa*, *O. varlakovii* и *O. interposita*, взаимоотношения последних трех видов остаются неразрешенными.

На медианной сети генеалогических связей гаплотипов (рис. 2) гаплотипы восьми видов двух секций формируют шесть дивергентных гаплогрупп (I–VI). Гаплогруппу I составили все гаплоти-

пы *O. lanata* (L1–L18), II — гаплотипы G4, G6–G9 *O. glandulosa* (линия 2), III — гаплотип P13 *O. trichophysa*, IV — все гаплотипы *O. microphylla* (P6–P8), V — все гаплотипы *O. muricata* (P1–P5), *O. pseudoglandulosa* (P9–P12), *O. varlakovii* (V1–V3), *O. interposita* (H23–H27) и гаплотипы G1–G3, G5 *O. glandulosa* (линия 1), VI — гаплотипы G10 и G11 *O. glandulosa* (линия 3). Следует отметить, что распределение гаплотипов в гаплогруппе V не соответствует ни популяционной, ни таксономической принадлежности. Так, гаплотипы *O. muricata* находятся на трех разных веточках, как и гаплотипы *O. glandulosa* (линия 1), гаплотипы V3 и V2 *O. varlakovii* соединены через гаплотип H24 *O. interposita* и, кроме того, гаплотипы V2 *O. varlakovii* и H26 *O. interposita* оказались идентичными (общий гап-

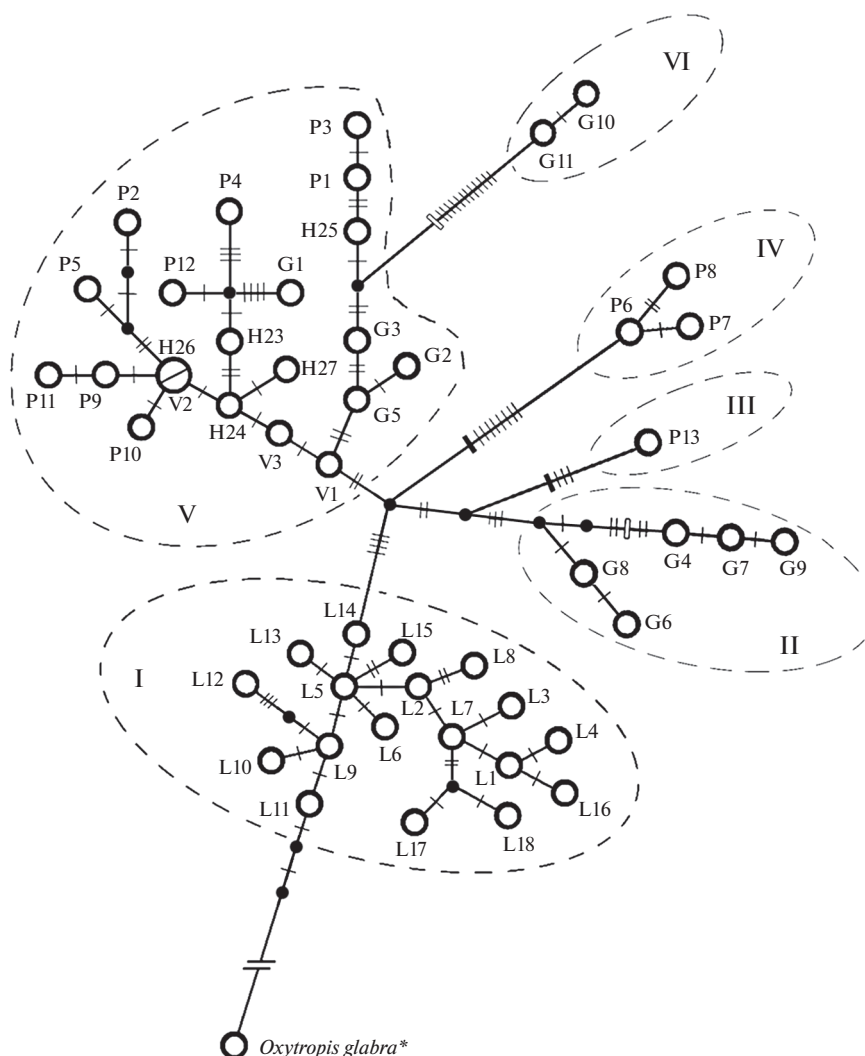


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов видов *Oxytropis* секции *Polyadena* и близкородственных им видов секции *Verticillares*. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки — гипотетические гаплотипы, поперечные тонкие штрихи на ветвях — мутационные события, черные толстые штрихи — вставка нуклеотидов, белые толстые штрихи — делеция нуклеотидов, штриховыми линиями обведены гаплогруппы I–VI. Код гаплогруппы см. табл. 1. * — мутации для *O. glabra*, используемой в качестве внешней группы, не указаны и не рассматриваются.

тип), хотя эти виды относятся к разным секциям (рис. 2). Во всех гаплогруппах выявлены маркерные нуклеотидные замены и индели: в гаплогруппе I — А в позициях 1172 и 1462, С в позиции 2144; II — С и Т в позициях 602 и 1730 соответственно; III — вставка четырех нуклеотидов (ТТТА, позиции 765–768); IV — вставка шести нуклеотидов (ТАААТА, позиции 393–398) и С в позиции 1689; V — Т в позиции 1588; VI — делеция шести нуклеотидов (ТАТТТТ, позиции 162–167). Генетические дистанции между гаплогруппами высоки (табл. 3), кроме пары II–III, которая объединяет гаплотипы *O. glandulosa* (линия 2) и *O. trichophylla* соответственно. Наименьшая нуклеотидная дивергенция определена между парами гаплогрупп III–VI и

IV–VI, т.е. *O. glandulosa* (линия 3)—*O. trichophylla* и *O. glandulosa* (линия 3)—*O. microphylla* (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование видов *Oxytropis* секции *Polyadena* по данным нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК показало, что у всех видов уровень нуклеотидного разнообразия низкий, а уровень гаплотипического разнообразия варьирует от низкого до высокого. Три исследуемые популяции *O. muricata* и три из четырех популяций *O. microphylla* характеризуются низкими показателями генетического разнообразия, что

Таблица 3. Нуклеотидная дивергенция и генетические дистанции между гаплогруппами I–VI (рис. 2), образованные гаплотипами хпДНК *Oxytropis muricata*, *O. microphylla*, *O. pseudoglandulosa*, *O. trichophylla*, *O. varlakovii*, *O. glandulosa*, *O. lanata* и *O. interposita*

Гаплогруппа	I	II	III	IV	V	VI
D_{XY}						
I	—	5.889 (5)	4.889 (4)	7.889 (7)	6.270 (4)	6.889 (6)
II	0.00248	—	3.000 (3)	6.000 (6)	4.381 (3)	5.000 (5)
III	0.00204	0.00126	—	3.000 (3)	3.381 (2)	2.000 (2)
IV	0.00330	0.00253	0.00125	—	6.381 (5)	1.000 (1)
V	0.00262	0.00184	0.00141	0.00267	—	5.381 (4)
VI	0.00289	0.00211	0.00084	0.00042	0.00225	—
F_{ST}						
I	0.00000					
II	0.72446*	0.00000				
III	0.70918***	0.38462***	0.00000			
IV	0.80840*	0.68848***	0.81481***	0.00000		
V	0.60677*	0.64769*	0.58729***	0.72947*	0.00000	
VI	0.86189*	0.67449***	0.84615***	0.85564**	0.78510**	0.00000

обычно связывают с прохождением популяции через “бутылочное горлышко”, т.е. резкое сокращение численности с последующим ее восстановлением (Абрамсон, 2007). Мономорфизм популяции MICR1 *O. microphylla* может свидетельствовать об относительно недавнем ее происхождении из небольшой группы близкородственных растений. Отсутствие достоверной внутривидовой межпопуляционной дифференциации у *O. muricata* и у *O. microphylla*, как и у *O. bargusinensis* (Холина и др., 2018) и у *O. myriophylla* (Холина и др., 2019), связано, вероятно, с постоянным генным потоком через цепь промежуточных местообитаний, а отсутствие нуклеотидной дивергенции может свидетельствовать о том, что исследуемые локальные популяции каждого вида представляют собой региональную метапопуляцию. Генетическое разнообразие у *O. pseudoglandulosa* и *O. varlakovii* сравнимо с таковым у эндемичных видов *O. chankaensis* ($h = 0.718$, $\pi = 0.0005$) (Artyukova et al., 2011), *O. bargusinensis* ($h = 0.844$, $\pi = 0.0013$), *O. interposita* ($h = 0.769$, $\pi = 0.0015$) и *O. triphylla* ($h = 0.915$, $\pi = 0.0020$) (Холина и др., 2018).

Высокие значения генетических дистанций между *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. trichophylla*, *O. glandulosa* (линия 2) и *O. glandulosa* (линия 3) (табл. 2), гаплотипы которых в филогенетических анализах находятся в разных гаплогруппах (рис. 2), а также выявленные маркерные нуклеотидные

замены и индели свидетельствуют о существенной дифференциации их хлоропластных геномов. Учитывая существующие мнения ботаников (Малышев, 2008; Сипливинский, 1966) о происхождении некоторых видов секции *Polyadena* и их сходстве с представителями видов секции *Verticillares*, мы включили в филогенетические анализы близкородственные виды. Результаты проведенного исследования не подтвердили предположение, что *O. microphylla* возникла в результате межсекционной гибридизации *O. muricata* и *O. lanata* (Малышев, 2008). Так, у этих трех видов общих гаплотипов не обнаружено, каждый из них имеет свои видоспецифичные маркеры, в филогенетических реконструкциях виды находятся в разных кладах/гаплогруппах (рис. 1, 2), значения генетических дистанций между которыми высоки (табл. 3).

Объединение всех гаплотипов видов *O. muricata*, *O. varlakovii*, *O. pseudoglandulosa* и *O. glandulosa* (линия 1) секции *Polyadena* и *O. interposita* секции *Verticillares* в одну кладу/гаплогруппу (рис. 1, 2) не случайно. Генетическая близость *O. interposita* к видам секции *Polyadena* была показана при изучении эндемичных видов *Oxytropis* (Холина и др., 2018) и 11 видов секции *Verticillares* (Холина и др., 2019). Так, присутствие у *O. interposita* видоспецифичных нуклеотидных замен, отсутствие общих гаплотипов с остальными видами секции *Verticillares*, высокие статистически значимые генетиче-

ские дистанции (от 0.67524 до 0.89490) между *O. interposita* и другими видами подтверждают существенную дивергенцию хлоропластного генома *O. interposita* (Холина и др., 2019). Низкие статистически незначимые значения генетических дистанций между *O. interposita*—*O. muricata* и *O. interposita*—*O. varlakovii* (0.25758 и 0.00319 соответственно), наличие общего гаплотипа у *O. interposita* и *O. varlakovii* (табл. 1) отсутствие видоспецифичных дифференцирующих маркеров подтверждают генетическую близость этих видов. Кроме того, мы сравнили морфологические признаки, приведенные ранее (Малышев, 2008), для *O. interposita*, *O. varlakovii*, *O. muricata* и наиболее близких к *O. interposita* видов *O. myriophylla* и *O. oxyphylla* секции *Verticillares* и обнаружили полное совпадение по ряду диагностических признаков у *O. interposita* и у представителей секции *Polyadena* в отличие от секции *Verticillares*. Среди этих признаков отмечены полумутовчатые или расставленные, кроме мутовчатых, листочки, крупный цветок длиной 25–30 мм в отличие от цветка длиной 15–20 мм у представителей секции *Verticillares*, чашечка трубчато-колокольчатая у *O. interposita* и видов *Polyadena*, но трубчатая у видов *Verticillares*, почти двугнездные бобы с широкой брюшной перегородкой в отличие от почти одногнездных у видов *Verticillares* и некоторые другие. Таким образом, полученные нами генетические данные и сходство морфологических признаков свидетельствуют в пользу предположения (Холина и др., 2018) о вероятном происхождении *O. interposita* от представителя секции *Polyadena*, но для уточнения секционной принадлежности *O. interposita* требуются дальнейшие исследования.

Отсутствие значительных генетических различий между *O. muricata*, *O. varlakovii*, *O. pseudoglandulosa*, *O. glandulosa* (линия 1) и *O. interposita*, объединение их гаплотипов в одну гаплогруппу и смешанное распределение гаплотипов, не соответствующее ни популяционной, ни таксономической принадлежности, указывают на полифилию данной группы. К наиболее распространенным причинам этого относятся общность происхождения, относительно недавняя дивергенция и быстрая радиация молодых видов, что сопровождается неполным расхождением генеалогических линий (Абрамсон, 2007; Шанцер, 2013). На основе анализа ядерных и хлоропластных маркеров показано, что быстрая радиация характерна для видов рода *Oxytropis* (Shavvon *et al.*, 2017), как и ряда крупных родов сем. Fabaceae — *Astragalus* L. (Bagheri *et al.*, 2017), *Lupinus* L. (Drummond *et al.*, 2012) и др. Эти процессы нередко осложняются интрогрессией (Абрамсон, 2007; Шанцер, 2013), а в слу-

чае с видами *Oxytropis* еще и полиплоидией (Малышев, 2008). Все это справедливо для исследуемой нами группы видов. Так, *O. interposita* из единственной известной популяции — тетраплоид, $2n = 32$, *O. varlakovii* с оз. Ножий — триплоид, $2n = 24$ (Кониченко, Селютина, 2013), а для *O. muricata* известны диплоидная и тетраплоидная расы, $2n = 16$ и 32 соответственно (Малышев, 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия видов *Oxytropis* секции *Polyadena* Азиатской России выявило крайне низкое нуклеотидное разнообразие в популяциях (0.0001–0.0014), за исключением двух популяций *O. glandulosa*. Хлоропластные геномы видов *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. trichophylla* и *O. glandulosa* (линии 2, 3) значительно дифференцированы. Группа видов *O. muricata*, *O. varlakovii*, *O. pseudoglandulosa* и *O. glandulosa* (линия 1) образует единый комплекс, что обусловлено, вероятно, относительно недавней их дивергенцией и неполным расхождением генеалогических линий. Низкий уровень полиморфизма не обеспечивает адаптивный потенциал видов и увеличивает риск их исчезновения. Поэтому необходимо проводить поиск новых местонахождений видов, изучать демографическую структуру, жизнеспособность и генетическое разнообразие популяций, а также осуществлять регулярный мониторинг их состояния.

Авторы выражают благодарность Д.В. Санданову и И.Ю. Селютиной за предоставление растительного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Информ. вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
- Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М., Журавлев Ю.Н. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD маркеров // Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С. 877–884.
- Козыренко М.М., Холина А.Б., Артюкова Е.В., Колдаева М.Н., Якубов В.В., Прокопенко С.В. Молекулярно-филогенетическая характеристика эндемичных дальневосточных близкородственных видов секции *Orobis* рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Генетика. 2020. Т. 56. № 4. С. 421–432.
- Кониченко Е.С., Селютина И.Ю. Числа хромосом редких и эндемичных видов рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Ботан. журн. 2013. Т. 98. № 5. С. 647–651.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: КМК, 2008. 855 с.

- Красная книга Иркутской области. Иркутск: Время странствий, 2010. 480. с.
- Красная книга Красноярского края. Т. 2. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений и грибов. Красноярск: Сиб. фед. ун-т, 2012. 572 с.
- Красная книга Республики Бурятия: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. 3-е изд., перераб. и доп. Улан-удэ: БНЦ СО РАН, 2013. 688 с.
- Малышев Л.И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России // *Turczaninowia*. 2008. Т. 11. № 4. С. 5–141.
- Пешкова Г.А. Третичные реликты в степной флоре Байкальской Сибири // Науч. чтения памяти М.Г. Попова. Иркутск. 1972. Вып. 12–13. С. 25–58.
- Повыдыш М.Н., Бобылева Н.С., Битюкова Н.В. Род 29. *Oxytropis* DC. — Остролодочник // Растительные ресурсы России. СПб.; М.: КМК, 2010. Т. 3. С. 65–69.
- Пурэвсүрэн С., Chang Q.H., Нарантуяа С., Цэцэгмаа С. Алкалоиды остролодочника ложножелезистого (*Oxytropis pseudoglandulosa* Gontsch. ex Grub.), применяемого в традиционной медицине Монголии // Сиб. мед. журн. (Иркутск). 2002. Т. 34. № 5. С. 73–76.
- Селютин И.Ю., Санданов Д.В. Редкие виды *Oxytropis* секции *Polyadena* Bunge в Южной Сибири: оценка состояния популяций // Экосистемы Центральной Азии: исследования, сохранение, рациональное использование: Матер. XIII Убсунурского междунар. симпозиума. Кызыл: ТУвГУ, 2016. С. 326–329.
- Сипливинский В.Н. Флористические находки в северо-восточном Прибайкалье // Новости систематики высших растений. М; Л.: Наука, 1966. С. 272–291.
- Улзийхутаг Н. Бобовые Монголии (таксономия, экология, география, филогения и хозяйственное значение). Улаанбаатар: Бемби Сан, 2003. 587 с.
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В. Современное состояние популяций эндемичных видов *Oxytropis* Байкальской Сибири и их филогенетические связи по данным секвенирования маркеров хлоропластной ДНК // Генетика. 2018. Т. 54. № 7. С. 795–806.
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В. Дивергенция видов *Oxytropis* секции *Verticillares* (Fabaceae) степной флоры Байкальской Сибири на основе анализа хлоропластной ДНК // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 665–674.
- Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Санданов Д.В., Андриянова Е.А. Филогенетические взаимоотношения видов *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* и *Phasoxytropis* (Fabaceae) Азиатской России на основе анализа нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хлоропластного генома // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 895–909.
- Шанцер И.А. Филогения и систематика недавно дивергировавших групп на примере рода *Rosa* // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2013. Приложение № 2. С. 202–216.
- Artyukova E.V., Kozyrenko M.M., Kholina A.B., Zhuravlev Yu.N. High chloroplast haplotype diversity in the endemic legume *Oxytropis chankaensis* may result from independent polyploidization events // *Genetica*. 2011. V. 139. № 2. P. 221–232.
<https://doi.org/10.1007/s10709-010-9539-8>
- Bagheri A., Maassoumi A.A., Rahiminejad M.R., Brassac J., Blattner F.R. Molecular phylogeny and divergence times of *Astragalus* section *Hymenostegis*: An analysis of a rapidly diversifying species group in Fabaceae // *Sci. Rep.* 2017. № 7: 14033.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14614-3>
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16 (1). P. 37–48.
- Drummond C.S., Eastwood R.J., Miotto S.T.S., Hughes C.E. Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling // *Syst. Biol.* 2012. V. 61. № 3. P. 443–460.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syr126>
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V. 10. P. 564–567.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // *Mol. Biol. Evol.* 2010. V. 27. P. 221–224.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics*. 2001. V. 17. № 8. P. 754–755.
- Kholina A., Kozyrenko M., Artyukova E., Sandanov D., Selyutina I., Chimitov D. Plastid DNA variation of the endemic species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae) // *Turk. J. Bot.* 2018. V. 42. P. 38–50.
<https://doi.org/10.3906/bot-1706-11>
- Lee J., Lee C.Y., Seo H.H., Bazarragchaa B., Batdelger G., Choi S., Hwang K.C., Lee S., Lim S. Extract of *Oxytropis pseudoglandulosa* inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration via suppression of ERK1/2 and Akt signaling pathways // *Clin. Hemorheol. Micro.* 2018. V. 69. № 1–2. P. 277–287.
<https://doi.org/10.3233/CH-189126>
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
- Shavvon R.S., Kazempour-Osaloo S., Maassoumi A.A., Moharrek F., Karaman Erkul S., Lemmon A., Lemmon E.M., Michalak I., Muellner-Riehl A.N., Favre A. Increasing phylogenetic support for explosively radiating taxa: The promise of high-throughput sequencing for *Oxytropis* (Fabaceae) // *J. Syst. Evol.* 2017. V. 55. № 4. P. 385–404.
<https://doi.org/10.1111/jse.12269>
- Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods): version 4.04. Sunderland. MA. USA: Sinauer Associates Inc., 2003.

Chloroplast DNA Variability in *Oxytropis* Section *Polyadena* (Fabaceae) from Asian Russia: Population Analysis and Phylogenetic Relationships

A. B. Kholina^{1, #}, M. M. Kozyrenko¹, E. V. Artyukova¹, and T. E. Pozdnyakova²

¹Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Stoletiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

²Saint-Petersburg Pushkin State Agrarian University, Petersburg sh., St. Petersburg, 196601 Russia

[#]e-mail: kholina@biosoil.ru

Nucleotide polymorphism of the *psbA*–*trnH*, *trnL*–*trnF* и *trnS*–*trnG* intergenic spacers of chloroplast DNA was analyzed in the populations of six *Oxytropis* species of section *Polyadena* from Asian Russia. The levels of nucleotide diversity were low (0.0001–0.0014), with the exception of two populations of *O. glandulosa* (0.0036 and 0.0059), and haplotype diversity varied from 0.133 to 0.911. High interspecific genetic distances and the identified species-specific nucleotide substitutions and indels indicate a significant differentiation of the chloroplast genomes of *O. muricata*, *O. microphylla*, *O. trichophylla*, *O. glandulosa* (lines 2, 3). The species *O. pseudoglandulosa*, *O. muricata*, *O. varlakovii*, and *O. glandulosa* (line 1) form a poorly differentiated complex, which is probably due to their relatively recent divergence.