

ДИВЕРГЕНЦИЯ ВИДОВ *Oxytropis* СЕКЦИИ *Verticillares* (Fabaceae) СТЕПНОЙ ФЛОРЫ БАЙКАЛЬСКОЙ СИБИРИ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

© 2019 г. А. Б. Холина^{1, *}, М. М. Козыренко¹, Е. В. Артюкова¹, Д. В. Санданов²

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

²Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, 670047 Россия

*e-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 31.07.2018 г.

После доработки 18.10.2018 г.

Принята к публикации 19.11.2018 г.

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК у видов *Oxytropis lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* секции *Verticillares* степной флоры Байкальской Сибири показал, что популяции характеризуются высоким гаплотипическим (0.634–1.000) и относительно низким (0.0003–0.0045) нуклеотидным разнообразием. Статистически значимые значения генетических дистанций между популяциями одного вида изменяются от 0.19382 до 0.43449. Выявлены маркерные нуклеотидные замены и индели у видов *O. lanata*, *O. gracillima*, *O. interposita*, *O. pumila* и *O. mongolica*, которые указывают на значительную дивергенцию их хлоропластных геномов. Слабая дифференциация ($\Phi_{ST} = 0.137$, $P < 0.0001$) между видами *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* и *O. bargusinensis*, а также низкие значения генетических дистанций (0.08939–0.32339), соответствующие межпопуляционным, отсутствие дифференцирующих молекулярных маркеров, формирование единой гаплогруппы в медианной сети и наличие общих гаплотипов свидетельствуют о том, что эти виды представляют собой генетически однородную группу, образовавшуюся, вероятно, в результате относительно недавней и быстрой дивергенции от общего предка, а также о высокой степени межвидовой гибридизации.

Ключевые слова: *Oxytropis*, Fabaceae, генетическое разнообразие, дивергенция видов, гаплотипы, хлоропластная ДНК, Байкальская Сибирь.

DOI: 10.1134/S0016675819060055

В растительности Байкальской Сибири флора степей занимает особое положение [1–4]. Степи составляют только 7–9% площади региона [4], при этом степной комплекс является наиболее флористически богатым — включает 666 видов и подвидов сосудистых растений, в то время как горный и лесной комплексы — 550 и 638 соответственно [3]. Степные участки встречаются в основном в лесостепной полосе и лишь на юге Байкальской Сибири становятся зональными [1]. Экосистемы степей являются центром новейшего эндемизма и реликтовости Внутренней Азии [4, 5]. В составе степной флоры Байкальской Сибири наибольшее количество таксонов отмечено для рода *Oxytropis* DC. (30 видов и один подвид), из них девять видов: *O. bargusinensis* Peschk., *O. lanata* (Pall.) DC., *O. lasiopoda* Bunge, *O. myriophylla* (Pall.) DC., *O. oxyphylla* (Pall.) DC., *O. prostrata* (Pall.) DC., *O. selengensis* Bunge, *O. stukovii* Palib., *O. turczaninovi* Jurtzev — относятся к секции *Verticillares* DC.

(= *Baicalia* Bunge) подрода *Oxytropis* рода *Oxytropis* DC. [3]. Виды секции *Verticillares* (типовой вид *O. oxyphylla*) характеризуются мутовчатым расположением листочков и представляют собой довольно резко обособленную группу, образованную, по мнению Положий [6], на основе перспективного макромутанта. Принято считать, что секция *Verticillares* является дериватной от других видов *Oxytropis* [7, 8], в частности, представляет одну из ветвей в эволюции секции *Orobia* Bunge [7]. Горно-степные виды секции, встречающиеся большей частью в Забайкалье, характеризуются рядом признаков (например, одногнездные бобы и значительная экологическая амплитуда), указывающих на отсутствие высокой специализации [9]. На основе этого автор предположил, что степи Забайкалья и примыкающих районов Северо-Западной Монголии являются центром происхождения видов секции *Verticillares*, обособление которой произошло в начале плейстоцена в более южных райо-

нах, а в последующие криоксеротические эпохи благоприятные условия способствовали дальнейшему развитию видов этой секции и продвижению их на север.

Некоторые виды секции *Verticillares* близки к представителям секции *Orobia*, реже к видам секций *Xerobia* Bunge и *Polyadena* Bunge. Так, по мнению Г.А. Пешковой [10], *O. bargusinensis* возникла от смешения *O. turczaninovii* (секция *Verticillares*) и *O. sylvatica* (Pall.) DC. (секция *Orobia*), к последнему виду также близка *O. tompudae* М. Поп. (секция *Verticillares*), а *O. oxyphylla* гибридизирует с *O. leptophylla* (Pall.) DC. из секции *Xerobia* и с *O. ircutensis* М. Поп. (= *O. baicalia* (Pall.) Pers.) из секции *Orobia*. В.Н. Сипливинский [11] считал, что вид *O. interposita* Sipl. является промежуточным между секциями *Verticillares* и *Polyadena*. Л.И. Малышев [12] отмечал, что еще чаще наблюдается скрещивание видов, относящихся к одной секции, в результате чего могли возникнуть расы (подвиды), разновидности и экологические формы. По мнению авторов, изучающих флору Сибири [10, 13, 14], внутри секции *Verticillares* *O. oxyphylla* легко гибридизирует с *O. lanata*; *O. prostrata* – вероятно, гибрид между ними, потерявший опушение на боках; *O. stukovii* является промежуточным видом между *O. prostrata* и *O. mongolica* Kom.; *O. selengensis* может быть мелкоцветковой формой *O. oxyphylla*.

Для изучения генетической изменчивости, популяционной структуры, видовой идентификации, филогенетических связей и дивергенции видов *Oxytropis* и других представителей сем. Fabaceae широко используются молекулярные маркеры ядерного и хлоропластного геномов [15–26]. Так, на основе анализа межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК (хпДНК) нами было исследовано генетическое разнообразие и дивергенция популяций эндемичных видов *O. chankaensis* Jurtz. [15], *O. glandulosa* Turcz. [20] и *O. bargusinensis*, *O. interposita* и *O. triphylla* (Pall.) Pers. [21]. Подобные исследования для видов *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii*, *O. pumila* Fisch. ex DC. и *O. gracillima* Bunge секции *Verticillares* ранее не проводились.

Цель настоящей работы – изучение генетического разнообразия природных популяций и степени дивергенции хлоропластного генома у видов *Oxytropis* секции *Verticillares* степной флоры Байкальской Сибири по данным полиморфизма межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* (хпДНК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 135 растений из природных популяций *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii*,

O. pumila и *O. gracillima* секции *Verticillares* подрода *Oxytropis* степной флоры Байкальской Сибири, Монголии и Алтая (табл. 1). Для оценки дивергенции видов этой секции в филогенетические анализы были также включены полученные нами ранее нуклеотидные последовательности представителей *O. mongolica* [19], *O. bargusinensis*, *O. interposita* и *O. tompudae*, а также *O. glabra* (Lam.) DC. секции *Mesogaea* Bunge подрода *Phacoxytropis* Bunge в качестве внешней группы [21] (табл. 1). Названия видов, секций и подродов приняты по Л.И. Малышеву [27].

Методы выделения ДНК, амплификации и прямого секвенирования межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* приведены в наших предыдущих работах [19, 21, 28]. Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей определяли на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) и собирали с помощью пакета программ Staden Package [29]. Для каждого образца последовательности трех регионов выравнивали вручную с использованием программы SeaView v. 4 [30]. Гаплотипическое (h) и нуклеотидное (π) разнообразие, парные генетические дистанции (F_{ST}), уровень дифференциации и распределение генетической изменчивости внутри и между популяциями (индекс фиксации F_{ST} , анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) и тесты на популяционную стабильность (Tajima's D и Fu's F_s) рассчитывали с помощью программы Arlequin v. 3.5 [31]. Анализ распределения парных нуклеотидных различий (mismatch distribution) проводили в программе DnaSP v. 5.0 [32]. Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом медианного связывания (Median Joining, MJ) в программе NetWork v. 5.0 [33], кодируя каждую делецию или вставку, независимо от их размера, как единичное мутационное событие.

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК показал, что длина каждого из регионов у исследуемых образцов разная вследствие присутствия инсерций/делеций (инделей), моно- и динуклеотидных повторов. Длина объединенных последовательностей трех регионов 135 представителей видов *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii*, *O. pumila* и *O. gracillima* после выравнивания составила 2475 сайта, из них 2349 мономорфных и 22 вариабельных. Десять нуклеотидных замен были информативны согласно методу максимальной экономии. Анализ полученной матрицы вы-

Таблица 1. Список видов *Oxytropis*, коды популяций, информация о местонахождении, гаплотипы и номера доступа в GenBank нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК

Вид	Код популяции	Происхождение образца (число образцов)	Гаплотип	Номер доступа в GenBank		
				<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>
<i>O. lanata</i> (Pall.) DC.	LAN1	Республика Бурятия, окр. с. Унэгэгэй (20)	V1-V18	LT994841-	LT994895-	LT994949-
	LAN2	Республика Бурятия, Баргузинский р-н, окр. с. Уржил (15)		LT994858	LT994912	LT994966
	LAN3	Монголия, Центральный аймак, окр. сомона Аргалант (5)				
<i>O. myriophylla</i> (Pall.) DC.	MYR1	Забайкальский край, Могойтуйский р-н, окр. с. Цугол (5)	V19-V26	LT994859-	LT994913-	LT996002-
	MYR2	Республика Бурятия, Хоринский р-н, окр. с. Удинск (21)		LT994866	LT994920	LT996009
	MYR3	Республика Бурятия, Еравнинский р-н, окр. с. Комсомольское (8)				
<i>O. oxyphylla</i> (Pall.) DC.	OXY1	Забайкальский край, Агинский р-н, окр. оз. Ножий (5)	V27-V51	LT994867-	LT994921-	LT996010-
	OXY2	Республика Бурятия, Селенгинский р-н, окр. с. Новоселенгинск (16)		LT994891	LT994945	LT996034
	OXY3	Республика Бурятия, Еравнинский р-н, окр. с. Комсомольское (8)				
	OXY4	Монголия, Булганский аймак, окр. сомона Рашаант (4)				
<i>O. selengensis</i> Bunge	SEL	Республика Бурятия, Заиграевский р-н, окр. с. Унэгэгэй (18)	V27, V38, V52-V56	MH174937, LT996052- LT996057	LT996045- LT996051	LT996038- LT996044
<i>O. stukovii</i> Palib.	STUK	Забайкальский край, Агинский р-н, окр. оз. Ножий (4)	V27, V31, V57	LT994892- LT994894	LT994946- LT994948	LT996035- LT996037
<i>O. gracillima</i> Bunge	GRAC	Монголия, Центральный аймак, окр. сомона Аргалант (5)	V58-V62	MH174938, LT996058- LT996061	LT996062- LT996066	LT996067- LT996071
<i>O. pumila</i> Fisch. ex DC.	PUM	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, Чуйская степь (1)	V63	MH174939	LT996251	LT996252
<i>O. mongolica</i> Kom.	MONG	Республика Тува, Тандинский р-н, западный берег оз. Хадан (1)	H63*	LN898501	LN898613	LN898625
<i>O. bargusinensis</i> Peschk.	BARG	Республика Бурятия, Курумканский р-н, долина р. Алла (15) и Баргузинский р-н, окр. с. Уржил (15)	H11-H22**	LT856473- LT856478; LT856483- LT856488	LT856506- LT856511; LT856516- LT856521	LT856539- LT856544; LT856549- LT856554
	INTER	Республика Бурятия, Курумканский р-н, долина р. Алла (14)	H23-H27**	LT856489- LT856493	LT856522- LT856526	LT856555- LT856559
<i>O. tompudae</i> M. Pop.	TOMP	Республика Бурятия, Курумканский р-н, окр. с. Майск (8)	T1-T6**	LT856566- LT856571	LT856579- LT856584	LT856592- LT856597
<i>O. glabra</i> (Lam.) DC.	GLAB	Республика Бурятия, Иволгинский р-н, окр. с. Оронгой (1)	G1**	LT856572	LT856585	LT856598

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены номера доступа последовательностей, полученных в данном исследовании.

* Гаплотип из [19]; ** гаплотип из [21].

Таблица 2. Генетическое разнообразие и популяционная стабильность у видов *Oxytropis* по данным хпДНК

Вид и код популяции	Разнообразие (SD)		Тест на популяционную стабильность	
	гаплотипическое	нуклеотидное	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
<i>O. lanata</i>				
LAN1	0.895 (0.051)	0.0010 (0.0006)	−0.84303 ns	−4.90331*
LAN2	0.895 (0.052)	0.0010 (0.0006)	−1.00161 ns	−3.44483*
LAN3	0.900 (0.161)	0.0017 (0.0012)	−0.81650 ns	−1.55426 ns
В целом	0.923 (0.023)	0.0012 (0.0007)	−1.16189 ns	−12.82981*
<i>O. myriophylla</i>				
MYR1	0.700 (0.218)	0.0003 (0.0003)	0.00000	−0.82920 ns
MYR2	0.767 (0.057)	0.0007 (0.0005)	0.00000	−0.52438 ns
MYR3	0.821 (0.101)	0.0008 (0.0005)	0.00000	−0.03355 ns
В целом	0.786 (0.042)	0.0007 (0.0005)	0.00000	−1.6968 ns
<i>O. oxyphylla</i>				
OXY1	0.900 (0.161)	0.0007 (0.0005)	−0.97256 ns	−1.40478 ns
OXY2	0.958 (0.036)	0.0023 (0.0013)	−0.46739 ns	−3.75465*
OXY3	0.964 (0.077)	0.0045 (0.0026)	0.50437 ns	0.11267 ns
OXY4	1.000 (0.177)	0.0042 (0.0029)	1.45884 ns	−0.18978 ns
В целом	0.981 (0.012)	0.0034 (0.0018)	−1.20403 ns	−11.32100**
<i>O. selengensis</i> , SEL	0.634 (0.127)	0.0009 (0.0006)	−1.51077*	−1.09311 ns
<i>O. stukovii</i> , STUK	0.833 (0.222)	0.0005 (0.0005)	0.00000	−0.65789 ns
<i>O. gracillima</i> , GRAC	1.000 (0.126)	0.0042 (0.0027)	−0.81650 ns	−0.31199 ns

Примечание. SD – стандартное отклонение; * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; ns – незначимое. Код популяции см. табл. 1.

явил 63 гаплотипа (V1–V63), из них три гаплотипа были общими: V27 у видов *O. oxyphylla*, *O. selengensis* и *O. stukovii*; V31 у *O. oxyphylla* и *O. stukovii*; V38 у *O. oxyphylla* и *O. selengensis* (табл. 1).

Все популяции характеризовались относительно низким нуклеотидным и высоким гаплотипическим разнообразием, кроме популяции SEL *O. selengensis* (табл. 2). Согласно результатам AMOVA, более 75% всей генетической изменчивости приходится на внутривидовую составляющую у *O. lanata* ($\Phi_{ST} = 0.245$, $P < 0.0001$) и *O. oxyphylla* ($\Phi_{ST} = 0.229$, $P < 0.003$). Крайне низкое и статистически незначимое значение индекса фиксации ($\Phi_{ST} = 0.008$, $P > 0.37$) у *O. myriophylla* указывает на отсутствие дифференциации между популяциями. Анализ генетических дистанций (F_{ST}) между популяциями одного вида показал (табл. 3), что величины F_{ST} между всеми популяциями *O. myriophylla* и между парами популяций OXY1–OXY2 и OXY3–OXY4 *O. oxyphylla* очень малы и статистически незначимы, а наименьшее (0.19382) и наибольшее (0.43449) статистически значимые ($P < 0.0001$) значения F_{ST} определены между популяциями *O. lanata*.

Для реконструкции демографических историй популяций проведен анализ распределения частот парных нуклеотидных различий между гаплотипами для всех популяций, кроме популяций *O. myriophylla* и *O. stukovii*, так как в их последовательностях нуклеотидных замен нет. Гистограммы показывают (рис. 1), что только в популяциях OXY3 и OXY4 выявлены значительные различия между ожидаемым и наблюдаемым распределением парных нуклеотидных различий и бимодальный характер наблюдаемого распределения. Во всех остальных популяциях, а также в объединенных выборках каждого из видов *O. lanata* и *O. oxyphylla*, две кривые совпадают или показывают унимодальный характер распределения (рис. 1). Значения Tajima's *D* и Fu's *F_s* (табл. 2) в большинстве популяций, за исключением OXY3, отрицательные, но статистически значимые значения Tajima's *D* отмечены только для популяции SEL *O. selengensis*, а Fu's *F_s* – для популяций LAN1 и LAN2 *O. lanata*, OXY2 *O. oxyphylla* и для объединенных выборок каждого из видов.

Для оценки дивергенции видов *Oxytropis* секции *Verticillares* в анализ были включены полученные нами ранее последовательности образцов

Таблица 3. Генетические дистанции (F_{ST}) между популяциями видов *Oxytropis lanata*, *O. myriophylla* и *O. oxyphylla* по данным хпДНК

Код популяции	LAN1	LAN2	LAN3	MYR1	MYR2	MYR3	OXY1	OXY2	OXY3
LAN2	0.19382*	—							
LAN3	0.19868**	0.43449*	—						
MYR1	0.72032*	0.70231*	0.73799*	—					
MYR2	0.72416*	0.69208*	0.76576*	—0.01255 ns	—				
MYR3	0.70647*	0.67393*	0.72246*	0.04762 ns	0.01166 ns	—			
OXY1	0.91232*	0.91079*	0.89928*	0.94643*	0.92185*	0.92278*	—		
OXY2	0.85033*	0.83463*	0.81535*	0.81025*	0.84937*	0.81492*	0.07287 ns	—	
OXY3	0.79317*	0.76259*	0.69164*	0.67702*	0.78910*	0.70269*	0.30425**	0.28229*	—
OXY4	0.84281*	0.82252*	0.74437*	0.73904*	0.82958*	0.75674*	0.32269**	0.28509**	—0.01926 ns

Примечание. * $P < 0.0001$; ** $0.009 < P < 0.05$; ns — незначимое. Уровень значимости определен на основе 1023 пермутаций. Код популяции см. табл. 1.

Таблица 4. Генетические дистанции (F_{ST}) между видами *Oxytropis lanata* (1), *O. myriophylla* (2), *O. oxyphylla* (3), *O. selengensis* (4), *O. stukovii* (5), *O. gracillima* (6), *O. bargusinensis* (7), *O. interposita* (8), *O. tompudae* (9), *O. pumila* (10), *O. mongolica* (11) по данным хпДНК

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.67563*	—								
3	0.78156*	0.77768*	—							
4	0.88894*	0.91770*	0.10515*	—						
5	0.88734*	0.92734*	0.00520 ns	—0.01037 ns	—					
6	0.81469*	0.84348*	0.76361*	0.89158*	0.82679*	—				
7	0.86259*	0.88186*	0.08939**	0.32339*	0.31773**	0.87579*	—			
8	0.74145*	0.72343*	0.74864*	0.89490*	0.88309*	0.71406*	0.86487*	—		
9	0.70156*	0.72838*	0.70864*	0.87429*	0.83348*	0.67759*	0.84445*	0.67524*	—	
10	0.91186 ns	0.94797 ns	0.59389 ns	0.88512 ns	0.93778 ns	0.78205 ns	0.79854 ns	0.90017 ns	0.83033 ns	—
11	0.87122 ns	0.90659 ns	0.78899 ns	0.94483 ns	0.97028 ns	0.68323 ns	0.91268 ns	0.85661 ns	0.76984 ns	1.00000 ns

Примечание. * $P < 0.0001$; ** $0.009 < P < 0.02$; ns — незначимое. Уровень значимости определен на основе 1023 пермутаций.

O. mongolica [19], *O. bargusinensis*, *O. tompudae* и *O. interposita* [21] (табл. 1). Длина объединенных последовательностей 188 образцов 11 видов составила 2484 сайта, из них 2336 мономорфных и 33 вариабельных. Пятнадцать нуклеотидных замен были информативны согласно методу максимальной экономии. Межвидовые генетические дистанции (F_{ST}) приведены в табл. 4. Высокие и статистически значимые значения F_{ST} определены между парами видов *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. gracillima*, *O. interposita* и *O. tompudae*; высокие и незначимые F_{ST} между всеми парами, образованными каждым из видов *O. pumila* и *O. mongolica* со всеми другими (табл. 4). Генетические дистанции между парами *O. oxyphylla*—*O. stukovii*, *O. selengensis*—*O. stukovii* и *O. oxyphylla*—*O. bargusinensis* очень малы и статистически незначимы, за исключением последней, а между

O. oxyphylla—*O. selengensis*, *O. selengensis*—*O. bargusinensis* и *O. stukovii*—*O. bargusinensis* величины F_{ST} находятся на уровне межпопуляционных значений (табл. 3, 4). Анализ молекулярной дисперсии выявил слабую дифференциацию между видами *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* и *O. bargusinensis* ($\Phi_{ST} = 0.137$, $P < 0.0001$), основная доля всей генетической изменчивости (более 86%) приходится на внутривидовую изменчивость и только около 13% — на межвидовую ($\Phi_{ST} = 0.137$, $P < 0.0001$).

Для определения генеалогических связей между гаплотипами в матрицу выявленных гаплотипов семи исследуемых видов *Oxytropis* были добавлены последовательности гаплотипов *O. mongolica* (H63), *O. bargusinensis* (H11–H22), *O. interposita* (H23–H27), *O. tompudae* (T1–T6) и *O. glabra* (G1) в качестве внешней группы (табл. 1). Общая длина выровненных последовательностей 92 гаплотипов

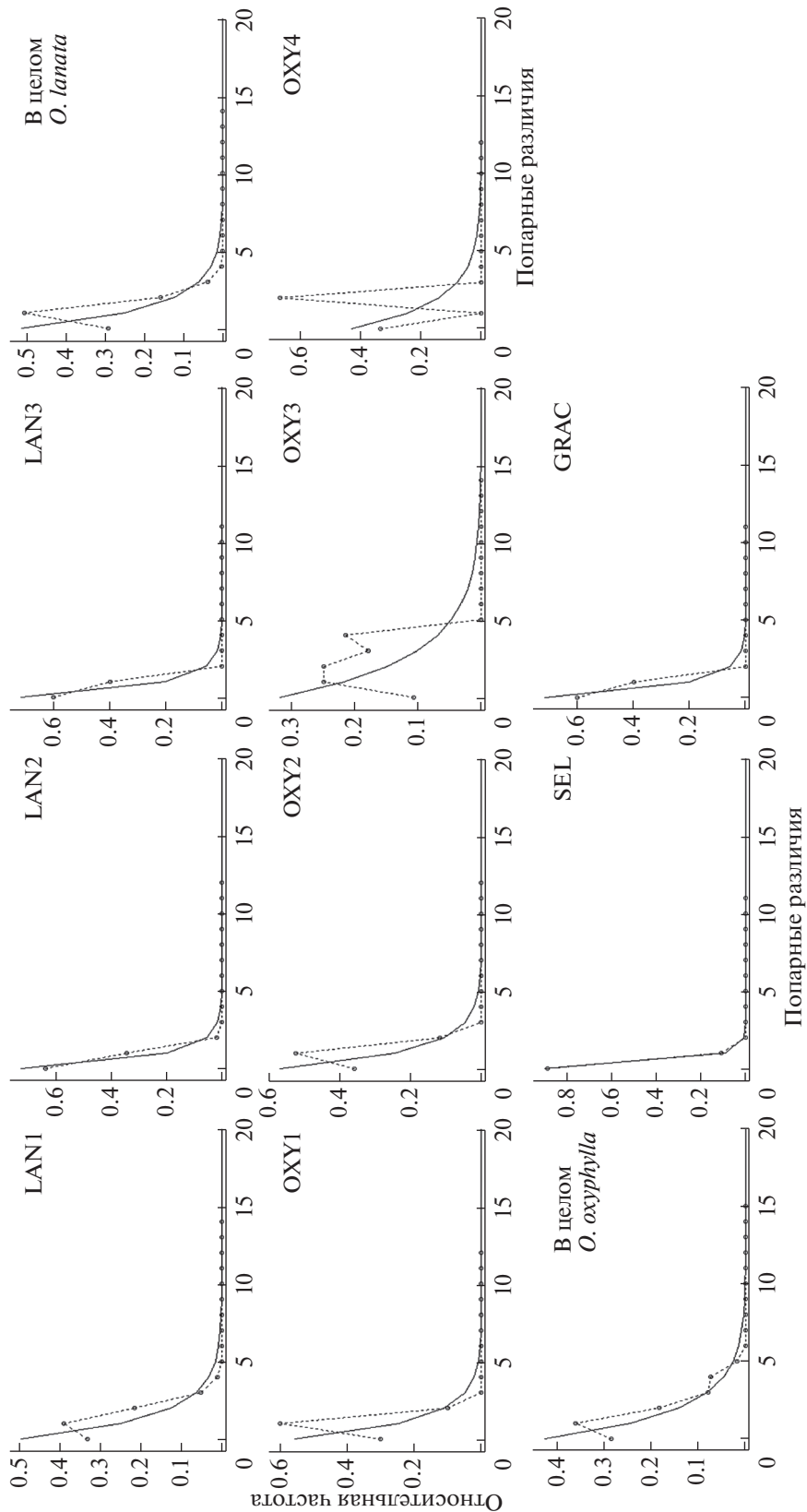


Рис. 1. Распределение частот величин попарных различий между нуклеотидными последовательностями межгенных спейсеров хлДНК в популяциях видов *Oxytropis*. Пунктирная линия показывает наблюдаемое распределение, сплошная линия — ожидаемое распределение при модели постоянного популяционного размера. Код популяции см. табл. 1.

трех регионов хпДНК составила 2580 сайтов, из них 2156 мономорфных и 44 вариабельных. Десять нуклеотидных замен были информативны согласно методу максимальной экономии. Выявлено четыре общих гаплотипа: гаплотип V27, который присутствовал у *O. oxyphylla*, *O. selengensis* и *O. stukovii*, оказался идентичен гаплотипу H16 *O. bargusinensis*; гаплотип V31, выявленный у *O. oxyphylla* и *O. stukovii*, идентичен гаплотипу H22 *O. bargusinensis*; гаплотип V38, общий у *O. oxyphylla* и *O. selengensis*, идентичен гаплотипу H14 *O. bargusinensis*; гаплотип V42 *O. oxyphylla* идентичен гаплотипу H11 *O. bargusinensis* (табл. 1). На рис. 2 представлена медианная сеть, в которой все гаплотипы *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. gracillima*, *O. interposita* и пять из шести гаплотипов *O. tompudae* образуют гаплогруппы согласно видовой принадлежности. Все гаплотипы *O. lanata* имеют две маркерные нуклеотидные замены (А в позиции 1196 и С в позиции 2291), гаплотипы *O. interposita* — три (Т в позициях 1287 и 1723, G в позиции 1513), а гаплотипы *O. gracillima* — одну (Т в позиции 403) и вставку пяти нуклеотидов (AGTAA в позиции 1759), отсутствующую у всех других. Гаплотип V63 *O. pumila* связан с гаплотипом H21 *O. bargusinensis* через три мутационных шага, два из которых: вставка семи нуклеотидов (GAATTAT, позиции 1435–1441) и делеция пяти нуклеотидов (ACCTT, позиции 1796–1800), отличают *O. pumila* от всех остальных. Гаплотип H63 *O. mongolica* связан с гаплотипом V26 *O. myriophylla* через десять мутационных шагов, из них шесть нуклеотидных замен (Т в позициях 158 и 1382, А в позициях 1457 и 1765, G в позициях 1704 и С в позиции 1715), вставка шести нуклеотидов (TATATC, позиции 1383–1388) и делеция двух нуклеотидов (AT, позиции 1146–1147) отличают *O. mongolica* от всех остальных. Одну большую гаплогруппу формируют все гаплотипы видов *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii*, *O. bargusinensis* и гаплотип Т6 *O. tompudae*. В ней присутствуют хорошо выраженные “звездчатые” структуры с одним из общих гаплотипов V27, V31, V38 и V42 в центре, которые связаны друг с другом через один мутационный шаг (рис. 2), что свидетельствует о недавнем происхождении популяций на исследованной части ареала.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами изучение популяций *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* и *O. gracillima* секции *Verticillares* по данным полиморфизма межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК выявило высокое гаплотипическое (h изменялось от 0.634 до 1.000) и относительно низкое нуклеотидное (π от 0.0003 до 0.0045) разнообразие (табл. 2). Уровень генетического разнообразия по данным изменчивости этих же регионов сравним с таковым в популя-

циях *O. glandulosa*, расположенных в Баргузинском ($h = 0.703$, $\pi = 0.0036$) и Курумканском районах Бурятии ($h = 0.911$, $\pi = 0.0059$) [20], у эндемичных видов *O. bargusinensis* ($h = 0.844$, $\pi = 0.0013$), *O. interposita* ($h = 0.769$, $\pi = 0.0015$) и *O. triphylla* ($h = 0.915$, $\pi = 0.0020$) [21], а также у *O. chankaensis* ($h = 0.718$, $\pi = 0.0005$) по данным изменчивости *psbA–trnH*, *trnL–trnF*, *trnS–trnG* и *petG–trnP* хпДНК [15]. Сочетание высоких значений гаплотипического разнообразия при низких значениях нуклеотидного разнообразия предполагает быстрый рост популяции из древней популяции с низким эффективным размером [34], при этом временной интервал должен быть достаточным для восстановления гаплотипического разнообразия посредством мутаций, но недостаточным для накопления значительных различий в последовательностях.

Отсутствие популяционной дифференциации у *O. myriophylla* ($\Phi_{ST} = 0.008$, $P > 0.37$), как и у *O. bargusinensis* ($\Phi_{ST} = 0.027$, $P > 0.20$) [21], обусловлено, вероятно, не прекращающимся обменом генами через цепь промежуточных локальных местообитаний. Унимодальное распределение парных нуклеотидных различий в большинстве исследуемых популяций видов *O. lanata*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis* и *O. gracillima* (рис. 1) свидетельствует о возможной недавней демографической экспансии [35, 36] или о пространственном расширении с высоким уровнем генного потока между соседними популяциями [37]. Демографические сценарии для объединенных выборок каждого из видов *O. lanata* и *O. oxyphylla* подтверждаются также высокими и статистически значимыми ($P < 0.05$) отрицательными значениями $Fu's F_s$ (–12.82981 и –11.32100 соответственно). Бимодальный характер наблюдаемого распределения в популяциях ОХУ3 и ОХУ4 *O. oxyphylla* указывает на то, что они, вероятно, находятся в демографическом равновесии.

Высокие генетические дистанции между видами *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. gracillima*, *O. interposita* и *O. tompudae* (табл. 4), а также выявленные маркерные нуклеотидные замены и индели у *O. lanata*, *O. gracillima*, *O. interposita*, *O. pumila* и *O. mongolica* указывают на существенную дифференциацию их хлоропластных геномов. Объединение всех гаплотипов видов *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii*, *O. bargusinensis* и гаплотипа Т6 *O. tompudae* в одну гаплогруппу (рис. 2) не случайно. Проведенное нами ранее [21] изучение филогенетических связей *O. triphylla*, *O. bargusinensis*, *O. interposita* с близкородственными видами подтвердило сформированное на основе морфологических признаков представление о происхождении *O. bargusinensis* и *O. tompudae* в результате межсекционной гибридизации и показало, что для гаплотипа Т6 *O. tompudae* родитель по-

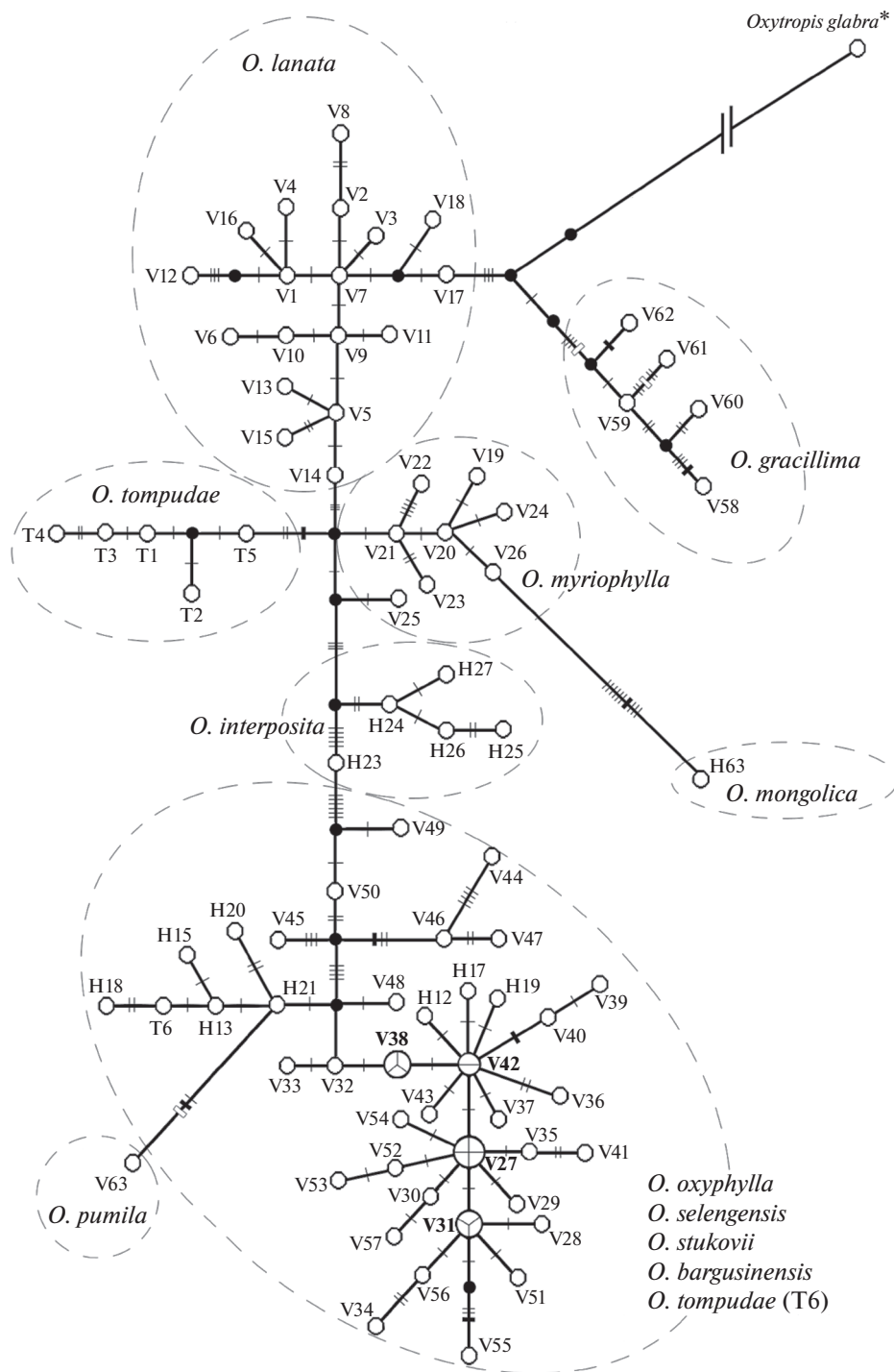


Рис. 2. Генеалогическая сеть гаплотипов видов *Oxytropis*, построенная с помощью MJ-метода. Размер окружностей гаплотипов отражает частоту их встречаемости, маленькие черные кружки — медианные векторы, поперечные тонкие штрихи на ветвях — число мутационных событий, черные толстые штрихи — вставка нуклеотидов; белые толстые штрихи — делеция нуклеотидов. Пунктирной линией объединены гаплотипы одного вида или группы видов. * Мутации для *O. glabra*, используемой в качестве внешней группы, не рассматриваются и не указаны.

материнской линии был близок к *O. bargusinensis*, и это могли быть *O. oxyphylla* или *O. turczaninovi*. Обнаруженные общие гаплотипы у видов *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* и *O. bargusinensis*

(табл. 1, см. “Результаты”), присутствие в медианной сети “звездчатых” структур с одним из общих гаплотипов в центре (рис. 2), слабая дифференциация между этими видами ($\Phi_{ST} = 0.137$), которая

оказалась ниже, чем между популяциями у видов *O. lanata* ($\Phi_{ST} = 0.245$) и *O. oxyphylla* ($\Phi_{ST} = 0.229$), низкие значения генетических дистанций (табл. 3, 4), соответствующие межпопуляционным, а также отсутствие дифференцирующих молекулярных маркеров — все в целом указывает на общность происхождения этих четырех видов, их относительно недавнюю дивергенцию и на высокую степень межвидовой гибридизации.

Полученные результаты, с одной стороны, подтверждают мнения авторов, основанные на морфологических признаках, что *O. selengensis* может быть мелкоцветковой формой *O. oxyphylla* с низкими простертыми цветоносами [13] или эколого-географической расой *O. oxyphylla* [27], что некоторые экземпляры *O. selengensis*, возможно, гибридного происхождения, так как совмещают признаки *O. oxyphylla* [14], и, с другой стороны, ставят под сомнение предположение о том, что *O. stukovii* — это промежуточная раса между *O. prostrata* и *O. mongolica* [13]. Для решения вопроса о таксономическом статусе *O. selengensis* и *O. stukovii* необходимо исследование расширенной выборки растений вышеперечисленных видов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 16-04-01399) и программы Президиума РАН “Дальний Восток” (проект № 18-4-011).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пешкова Г.А. Степная флора Байкальской Сибири. М.: Наука, 1972. 207 с.
2. Пешкова Г.А. Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири. Новосибирск: Наука, 2001. 192 с.
3. Малышев Л.И., Пешкова Г.А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск: Наука, 1984. 364 с.
4. Намзалов Б.Б. К вопросу о реликтах во флоре и растительности степных экосистем Байкальской Сибири // Растительный мир Азиатской России. 2012. № 2. С. 94–100.
5. Намзалов Б.Б. Байкальский фитогеографический узел как новейший центр эндемизма Внутренней Азии // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16. № 4. С. 563–571.
6. Положий А.В. К вопросу о происхождении и эволюции рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Бот. журн. 2003. Т. 88. № 10. С. 55–59.
7. Юрцев Б.А. Основные пути эволюции остролодочников секции *Baicalia* Vge. // Бот. журн. 1964. Т. 49. № 5. С. 634–648.
8. Васильченко И.Т. К вопросу о генезисе рода остролодочник *Oxytropis* DC. // Бот. журн. 1965. Т. 50. № 3. С. 313–323.
9. Положий А.В. Флорогенетический анализ остролодочников Средней Сибири // Уч. зап. Томск. гос. ун-та. Биология и почвоведение. 1965. № 51. С. 18–38.
10. Пешкова Г.А. Флора Центральной Сибири. Т. 2. Новосибирск: Наука, 1979. С. 623–624.
11. Сипливинский В.Н. Флористические находки в северо-восточном Прибайкалье // Новости систематики высших растений. М.; Л.: Наука, 1966. С. 272–291.
12. Малышев Л.И. Фенетика в секции *Verticillares* рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Бот. журн. 2007. Т. 92. № 6. С. 793–807.
13. Понов М.Г. Флора Средней Сибири. Т. 1. М.; Л.: Изд-во. АН СССР, 1957. С. 347.
14. Положий А.В. *Oxytropis* DC. // Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1994. Т. 9. С. 74–151.
15. 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. doi 10.1007/s10709-010-9539-8
16. Archambault A., Stromvik M.V. Evolutionary relationships in *Oxytropis* species, as estimated from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences point to multiple expansions into the Arctic // Botany. 2012. V. 90. № 8. P. 770–779. doi 10.1139/B2012-023
17. Gao L., Lu P., Jin F. et al. *TrnL-F* sequences analysis and molecular phylogeny of 10 species of *Oxytropis* // Acta Bot. Boreali-Occident. Sin. 2013. № 2. P. 266–271.
18. Lu P., Gao L., Jin F., En He-Ba-Ya-Er. Molecular phylogeny of 10 species of *Oxytropis* based on *psbA-trnH* sequences // Acta Bot. Yunnanica. 2014. № 3. P. 279–284.
19. Холина А.Б., Козыренко М.М., Артюкова Е.В. и др. Филогенетические взаимоотношения видов *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* и *Phacoxytropis* (Fabaceae) Азиатской России на основе анализа нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хлоропластного генома // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 895–909.
20. Kholina A., Kozyrenko M., Artyukova E. et al. Plastid DNA variation of the endemic species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae) // Turk. J. Bot. 2018. V. 42. P. 38–50. doi 10.3906/bot-1706-11
21. 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.
22. Tekpinar A., Karaman Erkul S., Aytac Z., Kaya Z. Phylogenetic relationships among native *Oxytropis* species in Turkey using *trnL* intron, *trnL-F* IGS, and *trnV* intron cpDNA regions // Turk. J. Bot. 2016. V. 40. P. 472–479. doi 10.3906/bot-1506-45
23. Shavvon R.S., Kazempour-Osaloo S., Maassoumi A.A. et al. 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. doi 10.1111/jse.12269

24. Zhang M.-L., Wen Z.-B., Hao X.-L. et al. Taxonomy, phylogenetics and biogeography of *Chesneya* (Fabaceae), evidenced from data of three sequences, ITS, *trnS-trnG*, and *rbcL* // Biochem. Syst. Ecol. 2015. V. 63. P. 80–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2015.09.017>.
25. Xie Y.-P., Meng Y., Sun H., Nie Z.-L. Molecular phylogeny of *Gueldenstaedtia* and *Tibetia* (Fabaceae) and their biogeographic differentiation within Eastern Asia // PLoS One. 2016. V. 11. № 9. e0162982. doi 10.1371/journal.pone.0162982
26. Артюкова Е.В., Козыренко М.М. Филогенетические отношения *Oxytropis chankaensis* Jurtz. и *Oxytropis oxyphylla* (Pall.) DC. (Fabaceae) по данным секвенирования ITS рибосомного оперона ядерной ДНК и межгенных спейсеров хлоропластного генома // Генетика. 2012. Т. 48. № 2. С. 186–193.
27. Малышев Л.И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России // Turczaninowia. 2008. Т. 11. № 4. С. 5–141.
28. 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.
29. Bonfeld J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999. doi 10.1093/nar/23.24.4992
30. 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. doi 10.1093/molbev/msp259
31. 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. doi 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
32. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452. doi 10.1093/bioinformatics/btp187
33. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
34. Avise J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 2000. 441 p.
35. Slatkin M., Hudson R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations // Genetics. 1991. V. 129. P. 555–562.
36. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. № 3. P. 552–569.
37. Excoffier L. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 853–864.

The Divergence of *Oxytropis* Species of Section *Verticillares* (Fabaceae) of the Steppe Flora of Baikal Siberia Based on Chloroplast DNA Sequence Data

A. B. Kholina^{a,*}, M. M. Kozyrenko^a, E. V. Artyukova^a, and D. V. Sandanov^b

^aFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^bInstitute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia

*e-mail: kholina@biosoil.ru

Analysis of the nucleotide polymorphism of intergenic spacers *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *trnS-trnG* of chloroplast DNA in *Oxytropis lanata*, *O. myriophylla*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* section *Verticillares* of the steppe flora of Baikal Siberia showed that the populations are characterized by a high haplotype (0.634–1.000) and relatively low nucleotide (0.0003–0.0045) diversity. Statistically significant values of genetic distances between populations of one species vary from 0.19382 to 0.43449. Marker nucleotide substitutions and indels in haplotypes species *O. lanata*, *O. gracillima*, *O. interposita*, *O. pumila* and *O. mongolica* have been identified, which indicate a significant divergence of their chloroplast genomes. Weak differentiation between *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii* and *O. bargusinensis* ($\Phi_{ST} = 0.137$, $P < 0.0001$), low values of genetic distances (0.08939–0.32339), the absence of differentiating molecular markers, the formation of a single haplogroup in the median network, and the presence of common haplotypes indicate that these species represent a genetically homogeneous group that was formed, probably as a result of a relatively recent and rapid divergence from a common ancestor, as well as a high degree of interspecific hybridization.

Keywords: *Oxytropis*, Fabaceae, genetic diversity, species divergence, haplotypes, chloroplast DNA, Baikal Siberia.