

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОТНОШЕНИЯ *Glycyrrhiza glabra* L., *G. uralensis* Fisch. И *G. korshinskyi* Grig.
ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ МАРКЕРОВ
ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

© 2020 г. Е. В. Хантемирова^{1, *}, А. Ю. Беляев¹, О. С. Корчагина², И. А. Лалетина¹

¹Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, 620144 Россия

²Сахалинский филиал Ботанического сада-института Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Южно-Сахалинск, 693023 Россия

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 14.11.2019 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

Проведено исследование изменчивости хлоропластной ДНК трех видов солодки *Glycyrrhiza glabra* L., *G. uralensis* Fisch. и *G. korshinskyi* Grig. в основной части ареала в Северной Евразии с использованием межгенных спейсеров *16S-trnA*, *trnS-trnG*, *atpH-atpI* и *trnH-psbA*. В результате у 212 растений солодки в 40 популяциях и отдельных местонахождениях выявлено 14 гаплотипов. Обнаружены две основные генетические линии (западная и восточная) и значительная генетическая дифференциация между *Glycyrrhiza glabra* и *G. uralensis* ($F_{ST} = 84\%$). В то же время полученные данные свидетельствуют об интрогрессивной гибридизации этих видов солодки в прошлом и в современных популяциях, находящихся в зонах контакта разных видов, на Южном Урале и в Зауралье. С этим процессом связано происхождение третьего вида солодки — *G. korshinskyi*. Результаты нашей работы показывают возможность использования исследованных регионов хпДНК в комбинации с другими молекулярными маркерами и морфологическими характеристиками растений для идентификации разных видов и гибридов солодки.

Ключевые слова: *Glycyrrhiza*, хпДНК, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675820070061

Солодка (*Glycyrrhiza* L.) с XIX в. и по настоящее время вызывает большой интерес исследователей и практиков разных специальностей. Это связано прежде всего с высокой ценностью и широкими возможностями использования некоторых видов солодки как лекарственно-технических растений. Наиболее известны среди них три вида: солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.), солодка уральская (*G. uralensis* Fisch.) и солодка Коржинского (*G. korshinskyi* Grig.) [1]. Данные виды солодки имеют одинаковый диплоидный набор хромосом ($2n = 16$) [2]. Это длиннокорневищно-стержнекорневые поликарпики [3] с выраженной клоновой структурой популяций [4]. Их лекарственное сырье (корни и корневища) характеризуется сходными свойствами [5]. Первые два вида, включенные в государственные фармакопеи многих стран, в том числе и России [6], имеют обширные естественные ареалы в Евразии. Однако ненормированные заготовки сырья приводят к сокращению популяционных ареалов этих видов

во многих регионах Северной Евразии. В некоторых регионах Российской Федерации, где находятся краевые части ареала солодки (в частности, на Урале и сопредельных территориях), *G. glabra*, *G. uralensis*, *G. korshinskyi* были отнесены к числу редких растений и включены в региональные Красные книги [7]. Ареалы *G. glabra* и *G. uralensis* охватывают значительную часть степного и пустынного биомов Евразии. Они включают также интразональные ландшафты речных пойм и приозерных ложбин, пояса степной и лесостепной растительности в горных системах Европы (Кавказ) и Азии (Памиро-Алай, Тянь-Шань и др.) [5, 8]. Ареал солодки Коржинского как бы вклинивается между ареалами двух других видов (рис. 1), и на пространстве от среднего течения Волги до Аральского моря и верховьев Ишима имеются зоны контактов и перекрытия ареалов указанных видов солодки [8].

Солодка Коржинского (*G. korshinskyi* Grig.) в статусе вида была выделена из *G. uralensis* и описана

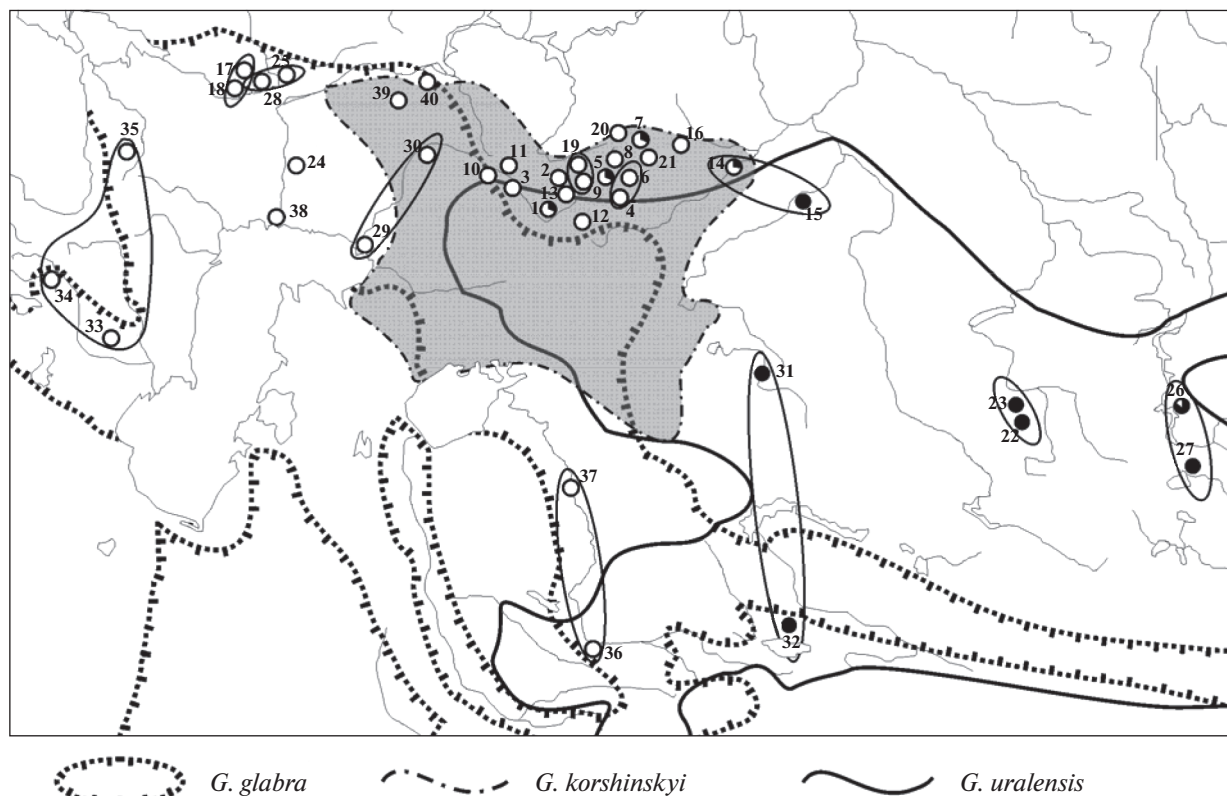


Рис. 1. Схема ареалов *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* и *G. korshinskyi* в Евразии. Серым цветом выделен ареал *G. korshinskyi*. 1–40 – номера популяций и отдельных образцов (см. табл. 1). Объединенные выборки обозначены овалами. В выборке доля гаплотипов, принадлежащая западной линии, обозначена белым цветом, а доля гаплотипов восточной линии – черным.

Ю.С. Григорьевым по образцам из Западного Казахстана [9]. Как в плане ареалогии, так и по морфологическим признакам этот вид занял промежуточное положение между *G. glabra* и *G. uralensis*, и автор таксона выдвинул предположение о его гибридном происхождении (*G. glabra* L. × *G. uralensis* Fisch.).

Используемая нами в данной работе трактовка видов *G. glabra* и *G. uralensis* соответствует их пониманию в широком смысле (по Е.А. Кругановой) [10] и принята во многих современных флористических сводках [2, 11]. Однако существует иная, более дробная, таксономическая система рода *Glycyrrhiza*, в которой указанные выше *G. glabra* и *G. uralensis* представлены группами таксонов видового ранга [12]. Следует признать явно недостаточным преимущественное использование морфологического критерия для таксономических построений в отношении представителей рода *Glycyrrhiza*. Очевидно, что для выявления объективно существующей дифференциации солодок необходимы прямые доказательства генетических связей и эволюционных взаимоотношений выделяемых таксонов. Они могут быть получены с использованием молекулярно-генетических методов. Знание популяционно-генетической структуры

видов солодки позволит отбирать для испытания в культуре наиболее разнообразный в генетическом отношении материал, организовать сохранение и рациональное использование генофонда солодки.

В отношении видов рода *Glycyrrhiza* L., как особо ценных лекарственных растений, проведение молекулярных исследований в значительной мере было обусловлено необходимостью их четкого разграничения. Так, на основе данных о содержании сапонинов и секвенировании последовательности *rbcL* [13, 14], а также в работах с использованием анализа ITS2 [15] установлено, что виды солодки, накапливающие глицирризин (*G. glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*), в генетическом отношении близки между собой, то есть могут рассматриваться как близкородственные. Использование маркера *rbcL*, кроме того, показало, что китайский вид *G. inflata* ближе к *G. uralensis*, чем к *G. glabra* [14]. В то же время в работе с применением большего числа маркеров, как ядерных, так и пластидных (ITS, *rbcL matK*, *trnH-psbA*), этот же вид оказался более тесно связан с *G. glabra*. При этом несколько образцов не получили точной оценки видовой принадлежности, а в исследо-

ванном материале были выявлены межвидовые гибриды солодки [16]. В недавней работе корейских исследователей *G. uralensis* и *G. glabra* хорошо разделились на филогенетическом дереве, построенном на основе анализа *CAPS* и *HRA*, однако некоторые образцы *G. glabra* оказались в одном кластере с *G. uralensis* [17]. Таким образом, точно определить видовую принадлежность ряда образцов солодки не удается. В чем причина таких различий, в явлении гибридизации или разном географическом происхождении образцов, еще предстоит выяснить. Кроме того, оказалось, что заволжско-казахстанский вид солодки *G. korshinskyi* в этих исследованиях совсем не фигурирует. Необходимо дальнейшее расширение исследований с использованием разных генетических маркеров и привлечением в анализ большого числа образцов разных видов солодки, имеющих различное географическое происхождение.

Предположение о том, что виды солодки гибридизируют между собой, высказывалось еще авторами “Флоры СССР” [18], но установленных фактов не было. В дальнейшем различными методами были получены прямые доказательства возможности возникновения и наличия в природных популяциях солодки межвидовых гибридов [19–21]. В связи с межвидовой гибридизацией структура генетического разнообразия в ареалах рассматриваемых видов солодки может оказаться очень сложной, а эволюционная история видов трудно восстанавливаемой. Однако, как показали результаты наших предварительных исследований, эти вопросы могут быть успешно решены путем проведения анализа изменчивости межгенных спейсеров хпДНК, а также аллозимных маркеров [22, 23].

Существует мнение, что современные ареалы трех рассматриваемых видов солодки формировались с начала четвертичного периода, для которого были характерны миграции видов растений и животных в степной зоне. Тогда же могло возникнуть перекрывание ареалов *G. glabra* и *G. uralensis*, и в зоне этого перекрывания возник предположительно гибридный вид – *G. korshinskyi* [5].

На территориях, примыкающих к южной части Урала, перекрываются ареалы нескольких видов солодки, поэтому в филогеографических исследованиях они заслуживают особого внимания. По данным литературы и наших собственных исследований, проведенных с использованием морфометрических методов и аллозимного анализа [21, 23], на Южном Урале и прилегающих территориях Предуралья и Зауралья наряду с типичными “чистыми” популяциями солодки Коржинского выявлены смешанные и гибридные популяции, сформировавшиеся с участием разных видов солодки (*G. korshinskyi*, *G. glabra* и *G. uralensis*). Возможность естественной межвидовой гибридизации у

солодки в уральской части ареала была подтверждена цитоэмбриологическими методами [20]. Гибридные формы в популяциях солодки помимо своеобразных сочетаний морфологических признаков характеризуются и различными вариантами сочетаний видоспецифичных аллелей аллозимных локусов [23].

Цель данной работы: изучение генетического разнообразия и филогенетических отношений близкородственных видов солодки (*G. glabra*, *G. uralensis* и *G. korshinskyi*) в центральной части Северной Евразии на основе анализа полиморфизма маркеров хлоропластной ДНК (хпДНК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В наше исследование с использованием маркеров хпДНК включено 212 образцов растений. Они были собраны в период с 2003 по 2017 г. в природных популяциях, либо получены при проращивании семян или из живых коллекций Ботанического сада УрО РАН, представляющих отдельные местонахождения в ареалах *G. korshinskyi*, *G. glabra* и *G. uralensis*. Всего материал исследован из 40 местонахождений (табл. 1, рис. 1). Для генетического анализа в каждой исследуемой популяции растения, относящиеся к разным генотипам (клонам), отбирались случайным образом. Для выделения ДНК у этих растений использовали листья, замороженные и хранившиеся в морозильнике при -80°C , либо молодые побеги, появившиеся при проращивании в лаборатории на отрезках корневищ. ДНК видовых образцов различного географического происхождения выделяли также из листьев молодых растений, выращенных из семян в лаборатории. Был собран гербарий всех видов солодки. Ваучерные гербарные образцы большинства исследуемых растений хранятся в Музее ИЭРиЖ УрО РАН в г. Екатеринбурге (SVER), а также в лаборатории молекулярной экологии растений этого же института. Определение их видовой принадлежности или гибридного происхождения проведено специалистами ИЭРиЖ и Ботанического сада УрО РАН.

Тотальная ДНК выделена с использованием СТАВ метода [24]. Для анализа генетической изменчивости использовали межгенные спейсеры *trnH-psbA*, *trnS-trnG*, *atpH-atpI* и *16S-trnA*. Амплификацию регионов *trnH-psbA*, *trnS-trnG*, *atpH-atpI* проводили с использованием универсальных праймеров, реакционных условий и температурных режимов, рекомендованных для этих участков [25, 26]. Амплификацию региона *16S-trnA* (В.Л. Семериков, неопубликованное) проводили с использованием праймеров 5'-gaaggctgggtagtgactg-3' и 5'-gagataagcggactcgaacc-3' при температуре отжига 60°C и времени 1 мин и времени элонгации 3 мин при 72°C . Использовался метод PCR-RFLP. Рестриктазы *Sse* и *Rsa* были примене-

Таблица 1. Исследуемые выборки видов *Glycyrrhiza*, распределение гаплотипов и параметры генетической изменчивости по данным хпДНК

№	Популяция, местонахождение	Координаты с.ш., в.д.	N	Вид, гибрид	Гаплотипы (число особей)	h	π
1	Таналык	51°55'32" 58°35'48"	14	к	Г5(8), Г8(6)	0.53	0.0029
2	Киндерли	52°13'27" 58°29'9"	5	к	Г5(5)	0.00	0.0000
3	Донгуз	51°43'47" 54°47'14"	11	к, к × у	Г5(4), Г6(5), Г7(2)	0.69	0.0017
4	Бреды	52°27'20" 60°19'31"	17	к, к × у	Г5(11), Г6(6)	0.47	0.0004
5	Морозовка	52°30'50" 59°54'39"	1	к	Г5(1)		
6	Аркаим	52°39'25" 59°37'55"	16	к, к × у	Г5(5), Г6(6), Г9(5)	0.71	0.0017
7	Степное	52°11'54" 58°39'40"	3	к × у	Г5(2), Г9(1)	0.67	0.0020
8	Петропавловский	54°01'50" 60°08'23"	3	к	Г5(2), Г6(1)	0.67	0.0005
9	Уртазымка	52°09'12" 58°44'52"	1	к	Г6(1)	1.00	0.0008
10	Целинное	52°11'54" 58°39'40"	1	к	Г5(1)		
11	Краснохолм	51°36'27" 54°02'29"	13	г, к × г, к × у	Г5(4), Г6(8), Г7(1)	0.56	0.0010
12	Домбаровский	50°46'59" 59°33'35"	6	к	Г5(4), Г6(2)	0.53	0.0004
13	Бакаловка	52°01'14" 58°28'18"	8	к	Г5(8)	0.00	0.0000
14	Озерное, Курганская обл.	54°25'01" 64°33'10"	10	к, к × у, к × г	Г1(1), Г5(3), Г6(4), Г11(2)	0.82	0.0025
15	Ишим	56°03'52" 69°33'00"	1	к, к × у	Г9(1)		
16	Картабыз	54°30'56" 62°32'16"	6	к	Г5(4), Г6(2)	0.53	0.0004
17	Суровикино	48°34'03" 42°46'13"	1	г	Г5(1)	0.80	0.0034
18	Тормосин	48°07'30" 42°44'06"	4	г	Г1(2), Г2(1), Г5(1)		
19	р. Черная	51°34'36" 54°09'18"	17	к, к × г	Г5(11), Г6(6)	0.48	0.0004
20	Уйское	54°19'52" 59°49'50"	3	к	Г5(2), Г6(1)	0.67	0.0005
21	Троицкий заказник	53°56'20" 61°14'16"	17	к	Г5(9), Г6(7), Г7(1)	0.58	0.0007

Таблица 1. Окончание

№	Популяция, местонахождение	Координаты с.ш., в.д.	<i>N</i>	Вид, гибрид	Гаплотипы (число особей)	<i>h</i>	π
22	Рубцовск	51°30'22" 81°14'27"	8	у	Г8(2), Г10(3), Г11(1), Г14(2)	0.81	0.0022
23	Поспелиха	52°47'14" 82°07'50"	1	у	Г14(1)		
24	Баскунчак	48°08'01" 46°55'07"	11	г	Г1(1), Г2(6), Г5(4)	0.62	0.0020
25	Убсу-Нур, Монголия	50°31'02" 93°15'55"	1	у	Г9(1)	0.81	0.0015
26	Минусинск	53°37'02" 91°39'28"	6	у, г × у	Г5(1), Г12(2), Г13(3)		
27	Иловля	49°38'42" 44°18'25"	4	г	Г2(3), Г5(1)	0.60	0.0013
28	Парк Донской	49°08'05" 43°51'20"	1	г	Г5(1)		
29	р. Урал	51°10'07" 51°21'17"	1	г	Г5(1)	1.00	0.0022
30	Уральск	47°14'00" 51°55'24"	1	г	Г2(1)		
31	Алма-Ата	43°07'50" 76°53'35"	3	у	Г9(3)	0.00	0.0000
32	Караганда	50°01'01" 72°58'52"	1	у	Г9(1)		
33	Кура-Араксинская, Азербайджан	40°01'36" 48°28'02"	2	г	Г3(1), Г5(1)	0.83	0.0028
34	Ереван	40°05'26" 44°22'50"	1	г	Г1(1)		
35	Минеральные воды	44°13'42" 43°05'47"	1	г	Г5(1)		
36	Аучи-Калачи, Таджикистан	40°07'33" 69°40'58"	5	г	Г4(5)	0.00	0.0000
37	Сырдарья	44°27'22" 66°05'17"	1	г	Г4(1)		
38	Старая Волга	46°03'07" 47°51'30"	2	г	Г2(1), Г5(1)	1.00	0.0022
39	Саратовская область	51°43'15" 50°23'04"	2	к	Г7(2)	0.00	0.0000
40	Августовка, Самарская область	52°14'54" 50°45'39"	2	г	Г5(2)	0.00	0.0000

Примечание. *N* – общее число особей, *h* – разнообразие гаплотипов, π – нуклеотидное разнообразие. Виды и гибриды солодки (г, у, к, к × г, г × у, к × у), выделенные по морфологическим признакам: г – *Glycyrrhiza glabra*, у – *G. uralensis*, к – *G. korshinskyi*. Серым и светло-серым фоном отражены варианты объединения.

ны к региону *trnS–trnG*, рестриктаза *TaqI* – к региону *atpH–atpI*, *Tru9* – к региону *trnH–psbA*, *TaqI* и *HinfI* – к региону *16S–trnA*. Продукты рестрикции индивидуально от каждого из 212 растений были разделены в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром. Все варианты изменчивых регионов хлДНК, идентифицированные методом PCR-RFLP, были использованы для последующего секвенирования методом Сэнгера. Всего секвенирование проведено для 112 образцов солодки. ПЦР-продукты были вырезаны из 1.0%-ного агарозного геля, изолированы с частицами SiO_2 [27] и затем использованы как темплаты для прямого секвенирования при помощи BigDye v. 3.1 kit (Gene Analyzers 3130; Applied Biosystems, Foster City, CA). Редактирование и выравнивание полученных последовательностей выполнялось вручную в программе BioEdit [28]. Гаплотип каждого растения был определен путем объединения паттернов разнообразия четырех регионов хлДНК. Сиквенсы всех регионов для каждого гаплотипа были депонированы в GenBank под следующими номерами: MN601933–MN601983 и MN620364–MN620380.

В некоторых популяциях не удавалось собрать достаточного количества образцов из-за выраженной клоновой структуры, присущей видам солодки. Поэтому для проведения статистического анализа генетического разнообразия некоторые одиночные образцы солодки были присоединены к географически близким популяционным выборкам, либо одиночные образцы объединялись в группы по 2–3 образца с учетом их географического происхождения и видовой принадлежности. Тем не менее следует учесть, что в некоторых выборках, содержащих число образцов меньше пяти, результаты анализа генетического разнообразия могут быть искажены.

С помощью пакета программ Arlequin v. 3.5.1.2 [29] определяли уровень дифференциации и распределение генетической изменчивости между группами гаплотипов (анализ молекулярной вариации, AMOVA). Значение F_{ST} было получено для измерения молекулярной дивергенции между популяциями и группами популяций. С помощью этой же программы вычисляли параметры молекулярного разнообразия, включающие число гаплотипов в каждой популяции, разнообразие гаплотипов (h) и нуклеотидное разнообразие (π).

Филогенетические отношения между гаплотипами хлДНК были реконструированы с помощью NETWORK ver. 4.6.1.2 (метод Reduced Median, RM) [30] и с помощью байесовского подхода в программе MrBayers ver. 3.2.3 [31] (с использованием модели нуклеотидного замещения GTR + G + I, выбранной с помощью jModeltest). Полные последовательности хлоропластных геномов *Astragalus mongolicus*

(KU666554.1) и *Glycyrrhiza lepidota* (KY038482.1) были взяты из GenBank и использованы в качестве комбинированной внешней группы. Тест на филогеографическую структуру проводили в программе PERMUT v1.0 [32]. С помощью этой программы при 1000 пермутаций были получены два показателя популяционной дифференциации (G_{ST} , N_{ST}), которые затем сравнивались друг с другом. Пространственный анализ молекулярной изменчивости (SAMOVA v1) [33] был использован для идентификации популяционных кластеров. Программа использует метод случайного подбора для определения географических групп популяций, которые однородны генетически и при этом максимально дифференцированы друг от друга. Морфологические признаки для идентификации видов изучались на гербарных образцах солодки, собранных в природных популяциях одновременно с материалом для молекулярно-генетических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длина выравненных сиквенсов регионов *16S–trnA*, *trnH–psbA*, *atpH–atpI* и *trnS–trnG* составила 1228, 402, 394 и 661 пн соответственно. Общая длина объединенных последовательностей четырех регионов хлДНК – 2685 пн, включая 11 точечных мутаций и 8 инделей. Сочетание изменчивости по четырем маркерным фрагментам позволило выявить среди всех 212 исследованных растений 14 гаплотипов (см. табл. 1, 2).

При анализе изменчивости хлДНК трех видов солодки обнаружены две разные генетические линии – западная и восточная (рис. 1, 2). Западная линия содержит гаплотипы Г1–Г7, где Г5 – наиболее распространенный гаплотип, который является общим для *G. glabra* и *G. korshinskyi* (табл. 1, рис. 2). В этой линии гаплотипы Г1–Г4 специфичны для *G. glabra*, а гаплотипы Г6 и Г7 характерны только для *G. korshinskyi*. Гаплотипы Г8–Г14 восточной линии, где предковым является гаплотип 9, характерны для *G. uralensis*. Но некоторые из них (Г8 и Г9) встречаются и у *G. korshinskyi*.

Анализ родства гаплотипов в программе NETWORK показывает две далеко отстоящие друг от друга группы гаплотипов, соответствующие генетическим линиям, которые разделяют пять точечных мутаций (рис. 2). В каждой группе гаплотипы образуют звездчатые структуры с одним преобладающим гаплотипом (Г5 в западной линии и Г9 в восточной) и несколькими связанными с ним дериватами. Это может свидетельствовать о недавней популяционной экспансии этих дериватов. В западной линии через две мутации и предполагаемый вымерший гаплотип в отдельную ветку выделяется гаплотип Г7, характер-

Таблица 2. Распределение полиморфных сайтов в нуклеотидных последовательностях выявленных гаплотипов регионов *16S-trnA*, *trnH-psbA*, *atpH-atpI*, *trnS-trnG* хпДНК у *G. glabra*, *G. uralensis*, *G. korshinskyi*

Номер гаплотипа	Позиция нуклеотида																			
	<i>16S-trnA</i>				<i>trnH-psbA</i>		<i>atpH-atpI</i>						<i>trnS-trnG</i>							
	<i>16S</i>			<i>trnA</i>																
	9	1	5	5	1	2	1	1	1	2	3	3	1	1	1	1	2	3	4	4
	3	9	4	0	5	9	0	9	9	4	0	1	0	7	9	9	0	4	4	6
	8	3	3	1	7	0	9	2	4	5	6	0	5	2	1	3	9	8	8	7
1	C	G	C	a	G	b	C	A	–	d	C	T	C	e	–	A T	f	C	C	
2	C	G	C	a	G	b	C	A	c	–	A	T	C	e	–	A T	f	C	C	
3	C	G	C	a	G	b	C	A	c	d	C	T	C	–	–	A T	f	C	C	
4	C	G	C	a	G	b	C	A	c	d	C	T	C	e	–	A T	f	A	A	
5	C	G	C	a	G	b	C	A	c	d	C	T	C	e	–	A T	f	C	C	
6	C	G	C	a	G	b	C	A	c	d	C	T	C	e	AT	A T	f	C	C	
7	C	G	G	–	G	b	C	A	c	d	C	T	C	e	–	A T	f	C	C	
8	A	A	G	a	T	b	C	T	c	d	C	C	C	e	–	–	–	C	C	
9	A	A	G	a	T	b	C	T	c	d	C	C	C	e	–	–	f	C	C	
10	A	A	G	a	T	–	C	T	c	d	C	C	C	e	–	–	f	C	C	
11	A	A	G	a	T	b	C	T	c	d	C	C	C	e	–	–	f	C	A	
12	A	A	G	a	T	b	T	T	c	d	C	C	C	e	–	A T	f	C	C	
13	A	A	G	a	T	b	T	T	c	d	C	C	T	e	–	–	f	C	C	
14	A	A	G	a	T	b	C	T	c	d	C	C	T	e	–	–	f	C	C	

Примечание. a – CACCTTGCAAC; b – ACTTT; c – TTTATGATGAT; d – CTTAT; e – ATAT; f – TTTTATA. Фоном показаны позиции возможных рекомбинаций.

ный для *G. korshinskyi*. Возможно, этот гаплотип является рекомбинантным, так как в регионе *16S-trnA* он совмещает в себе мутации *G. glabra* и *G. uralensis* (табл. 2). В восточной линии, по-видимому, таким рекомбинантным гаплотипом (см. регион *trnS-trnG*) является Г12, выделяющийся на графике родства гаплотипов в отдельную ветвь и встречающийся только в популяции из окрестностей Минусинска.

Иерархический AMOVA (табл. 3) показал значительную дифференциацию между генетическими линиями ($F_{ST} = 86\%$). Это соответствует степени дифференциации между видами *G. glabra* и *G. uralensis* ($F_{ST} = 84\%$). Различия между всеми тремя видами меньше ($F_{ST} = 64\%$). При этом *G. korshinskyi* оказалась генетически ближе к *G. glabra* ($F_{ST} = 35\%$), чем к *G. uralensis* ($F_{ST} = 77\%$). В результатах теста на филогеографическую структуру, который указывает

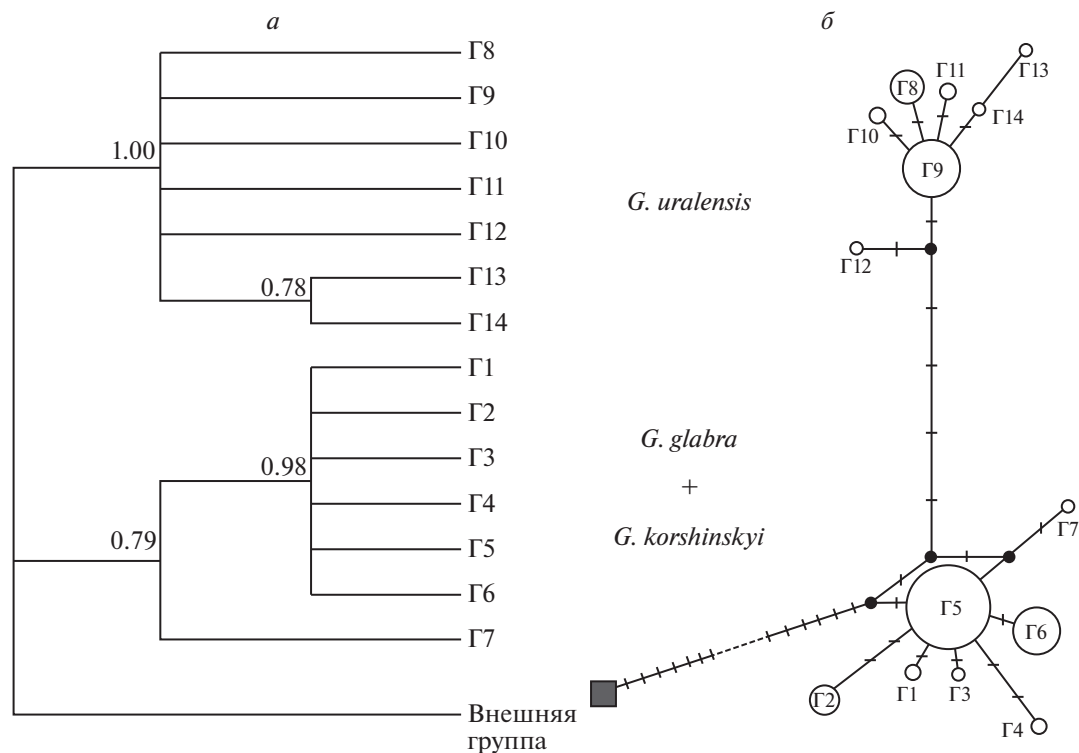


Рис. 2. Генетические взаимоотношения *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* и *G. korshinskyi* на основании сравнения последовательностей выявленных гаплотипов четырех регионов хпДНК: *a* – филогенетическое дерево, построенное в программе MrBayers ver. 3.2.3. Числами обозначены значения апостериорной вероятности (Posterior Probabilities, PP); *b* – генеалогическая сеть гаплотипов, построенная с помощью RM-метода. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки – гипотетические гаплотипы. Г1–Г7 – гаплотипы западной линии, Г8–Г14 – восточной.

на тенденцию родственных гаплотипов сосуществовать совместно, параметр N_{ST} (0.431) превышает G_{ST} (0.252), однако эти различия незначимы, т.е. ясный филогеографический сигнал отсутствует. С помощью программы SAMOVA географически все популяции разделились только на две группы: в одной оказались популяции и группы образцов типичной *G. uralensis* (Рубцовск с Поспелихой, Алма-Ата с Карагандой, Минусинск и Убсу-Нур) и во второй все остальные популяции.

Параметры генетического разнообразия представлены в табл. 1. В целом исследуемые популяции характеризуются средними значениями гаплотипического и низкими нуклеотидного разнообразия. Однако в некоторых популяциях эти показатели достаточно высоки. Наибольшим генетическим разнообразием отличаются популяции Озерное (Курганская обл.) и Аркаим, где преобладает *G. korshinskyi* и имеются гибридные формы, Тормосин и Баскунчак (состоят из форм *G. glabra*), а также Рубцовск и Минусинск (состоят из *G. uralensis*). Уникальный гаплотип обнаружен в Азербайджане (Г3) и один гаплотип (Г4)

специфичен только для популяций Средней Азии (Аучи-Калачи, Сырдарья).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа изменчивости межгенных спейсеров хпДНК в исследованном комплексе трех видов солодки в центральной части Северной Евразии мы выявили две филогенетические линии (западную и восточную) и обнаружили существенные генетические различия между *Glycyrrhiza glabra* L. s.l. и *G. uralensis* Fisch. s.l. Это согласуется с результатами других исследований, в которых были использованы различные молекулярные маркеры [15–17]. В то же время нами получены данные, свидетельствующие об интрогрессивной гибридизации и перемешивании генных потоков между популяциями разных видов солодки в прошлом, что также отмечается в указанных выше публикациях.

Способность к межвидовой гибридизации у солодки стала, по-видимому, важным фактором формирования солодки Коржинского как нового биологического вида, происхождение которого в

Таблица 3. Распределение суммарной генетической изменчивости по данным хпДНК

Изменчивость	<i>d.f.</i>	SSD	CV	%	Индекс фиксации
Западная и восточная генетические линии					
Между линиями	1	197.398	3.50978	86.21	$F_{ST} = 0.86208$ $P < 0.0001$
Внутри линий	192	107.808	0.56150	13.79	
Общая	193	305.206	4.07128		
<i>G. glabra</i> , <i>G. uralensis</i> и <i>G. korshinskyi</i>					
Между видами	2	110.429	1.16959	54.42	$F_{ST} = 0.64322$ $P < 0.0001$
Внутри видов	25	58.684	0.21279	45.58	
Общая	27	169.113	1.38238		
<i>G. glabra</i> и <i>G. korshinskyi</i>					
Между видами	1	33.023	0.46880	18.20	$F_{ST} = 0.35404$ $P < 0.0001$
Внутри видов	23	114.933	0.44315	17.20	
Общая	24	147.936	0.91195		
<i>G. korshinskyi</i> и <i>G. uralensis</i>					
Между видами	1	91.271	2.51247	71.62	$F_{ST} = 0.76824$ $P < 0.0001$
Внутри видов	18	42.937	0.18254	5.2	
Общая	19	133.208	2.69501		
<i>G. glabra</i> и <i>G. uralensis</i>					
Между видами	1	85.479	3.17509	75.64	$F_{ST} = 0.83683$ $P < 0.0001$
Внутри видов	9	20.803	0.33768	8.04	
Общая	10	106.282	3.51277		

Примечание. *d.f.* – число степеней свободы; SSD – сумма квадратов; CV – абсолютное значение компоненты изменчивости; % – процент генетической изменчивости; F_{ST} – компонента изменчивости, связанная с межвидовой/межпопуляционной изменчивостью, *P* – уровень значимости.

основе своей связано с солодкой голой, о чем свидетельствует преобладание в исследованных популяциях этих видов общего и эволюционно исходного в западной линии гаплотипа 5. Специфичные для солодки Коржинского и распространенные в ареале только этого вида Г6 и Г7 связаны в своем происхождении с Г5, а Г7 сформировался, вероятно, как рекомбинантный гаплотип. Это свидетельствует о древней и довольно длительной обособленности предковых популяций *G. korshinskyi* от *G. glabra*. Формирование солодки Коржинского происходило, по всей видимости, при непосредственном контакте с *G. uralensis*, при котором предковые формы *G. korshinskyi* участвовали в гибридизации с *G. uralensis* в основном как материнские растения (хлоропластная ДНК в семействе Fabaceae Lindl. s.l. передается потомкам от материнских особей) [34]. При этом первоначально возникшие гибриды в дальнейшем уже участвовали в гибридизации преимущественно с формами со-

лодки уральской. Об этом свидетельствует (судя по результатам аллозимного анализа) насыщение ядерного генома солодки Коржинского генами солодки уральской [23]. В некоторых популяциях *G. korshinskyi* (Таналык, Аркаим) имеется значительная доля растений (клонов) с гаплотипами Г8 и Г9, что указывает и на участие особей солодки уральской в качестве материнских растений в процессе становления солодки Коржинского. Возможно, что такие растения солодки Коржинского являются потомками от возвратных скрещиваний с *G. uralensis*, и это свидетельствует о наличии интрогрессии в исследуемом комплексе видов [35]. Все это в целом подтверждает гипотезу Ю.С. Григорьева о гибридном происхождении солодки Коржинского. Таким образом, этот эндемик прошел длительный период формирования как гибридогенный вид. Вероятно, период его становления мог охватывать плиоцен и плейстоцен.

Известно, что степной пояс, протянувшийся от Средней Азии до Юго-Восточной Европы, образовался в результате похолодания в конце плиоцена (2.5–1.6 млн лет назад). Он претерпевал значительные изменения, связанные с сужениями и разрывами примерно в области 60°–70° восточной долготы во время ледниковых периодов. С переходом плиоцена в плейстоцен Каспийское море в несколько раз расширилось на север, вплоть до южных границ Уральских гор и волжско-камского бассейна. Тем не менее область к северу от Черного моря вдоль среднего и нижнего Дона не пострадала от морских трансгрессий, и поэтому степная растительность сохранялась там [36–38]. Вероятно там же выжили и популяции *G. glabra*, и отсюда этот вид вторично расселился по всей Европе. Star-like филогения с преобладанием анцестрального гаплотипа Г5 указывает на событие “бутылочного горлышка” в эволюционной истории этого вида. Наличие единственного общего и часто встречающегося редкового гаплотипа 5 во многих популяциях *G. glabra* подтверждает это. Несмотря на относительно небольшое количество проанализированных образцов *G. glabra*, можно заключить, что распространение специфичных для этого вида гаплотипов (Г1–Г4), производных от Г5, указывает на постгляциальные *in situ* мутации. Вероятно, гаплотип 4 характерен только для популяций Средней Азии, он сохранился и расселился там в условиях длительной изоляции.

В Западной Сибири во время раннего плейстоцена (0.9–0.4 млн лет назад, мансийско-шайтанского оледенения) ледники продвинулись на юг до 64°–62° с.ш. Речная система Обь–Иртыш–Тобол была запружена ледниками, а заводи достигли предгорий Казахстанского нагорья и Алтайских гор. Ландшафт был превращен в систему озер и болотистых мест, чередующихся с таежной растительностью, которая не пригодна для степных растений [36, 39]. В конце среднего плейстоцена во время ледникового периода (260000–130000 лет назад) речная система Обь–Иртыш–Тобол снова была запружена, но описанная выше система озер/болот была менее обширной и не влияла на Омскую и Казахстанскую степные области [36]. Ледниковый покров вызывал подпрудные явления, в связи с чем возникали обширные подпрудно-ледниковые бассейны. Лишь южные приподнятые Приалтайские, Приобские и, возможно, Приказахстанские равнины не заливались подпрудными водами. Накопление генетического разнообразия в восточной группе популяций (Минусинск и Рубцовск) свидетельствует о выживании региональных геномов *G. uralensis* в течение нескольких ледниковых циклов в разных регионах Азии.

Таким образом, можно предположить, что при изменении ландшафтов и климата в четвертичном периоде ареал солодки был разорван водными преградами на несколько обособленных, географически и экологически изолированных частей, в которых сформировались самостоятельные виды – *G. glabra*, *G. uralensis* и *G. korshinskyi*.

Установлено, что генетическое разнообразие видов *Glycyrrhiza*, несмотря на их клоновую структуру, близко к средним значениям разнообразия, известным для широко распространенных и долгоживущих травянистых растений [40]. Причем в Азии, включая Китай, оно оказалось значительно выше, чем в других регионах [17, 41, 42]. Например, анализ AFLP, проведенный в природных популяциях *G. uralensis* в Китае [43], показал средний уровень генетического разнообразия (уровень полиморфизма составил 53.3%, $H_e = 0.1932$). При этом он значительно варьировал от популяции к популяции, что авторы связывают с различиями в уровнях осадков и pH почвы. Высокое морфологическое и генетическое разнообразие солодки в ряде популяций на Южном Урале и смежных территориях и в Сибири, существование там популяций с присутствием гаплотипов из разных линий мы объясняем гибридизацией между представителями западной и восточной групп. Это могло происходить в результате вторичного контакта, возникшего после дегляциации и исчезновения водных преград, во время межледниковий и/или в голоцене. Так как при наступлении благоприятных периодов популяции разных генетических линий расширяли свои ареалы, распространяясь из разных рефугиумов, они должны были формировать контактные зоны. В этих зонах происходили перемешивание генных потоков разных популяций и, возможно, даже рекомбинация хпДНК, что является редким событием для этого типа генетических маркеров. Признаки интрогрессии прослеживаются даже на очень больших расстояниях от зон контакта ареалов. Например, во внутренней части ареала *G. uralensis* в выборке из Минусинска встретился гаплотип 5, относящийся к западной генетической линии солодки.

При расселении на Южном Урале, в Предуралье и Зауралье в голоцене солодка Коржинского могла претерпеть сложные трансформации в результате вторичных контактов с двумя другими видами. В частности, это проявилось в том, что в ряде территорий сформировались сложные гибридные комплексы, в которых выявлены специфичные гаплотипы каждого из трех исследуемых видов солодки (например, в популяции Озерное). Эти процессы способствовали повышению обще-

го генетического разнообразия солодки Коржинского.

В периферийных частях ареала популяции исследуемых видов солодки состоят из немногочисленных, обособленных куртин-клонов различных размеров и формы. Возраст наиболее крупных клонов может достигать многих десятков (возможно, и сотен) лет [4]. В связи с этим в популяциях солодки может длительно сохраняться генетический материал, появившийся в результате очень давних межпопуляционных и межвидовых взаимодействий. Известно, что у перекрестноопыляемых растений, в том числе и у солодки, семенное размножение является фактором увеличения их генетического разнообразия. Однако в природных местообитаниях солодки генеративные особи семенного происхождения появляются редко [4], т.е. смена семенных поколений происходит очень медленно, а эффективная численность популяций невысока. Вследствие этого в таких популяциях может быть выражен дрейф генов и эффект основателя, что усложняет выявление структуры генетического разнообразия солодки как в местных популяциях, так и на обширном ареале.

Большинство известных публикаций, связанных с генетическими исследованиями видов *Glycyrrhiza*, посвящено выявлению дифференцирующих маркеров и установлению филогенетических связей между видами. При этом недостаточно внимания уделяется вопросам оценки генетического разнообразия в популяциях. Полученные нами данные впервые позволяют с помощью маркеров хпДНК оценить структуру генетического разнообразия в комплексе трех видов солодки в Северной Евразии. Для получения более ясной картины популяционной структуры и генетического разнообразия у *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* и *G. korshinskyi* требуется исследование популяций с достаточно большими выборками клонов из многих районов ареала с использованием разных типов генетических маркеров.

Мы благодарим В.П. Гранкину за предоставленные нам образцы семян солодки, а также сотрудников Ботанического сада УрО РАН Е.С. Васфилову и А.Г. Быструшкина за помощь в сборе материала.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН и при финансовой поддержке Комплексной программы УрО РАН, проект № 18-4-4-43.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мусаев И.Ф., Надеждина Т.П., Серых Г.А. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений / Под ред. Чикова П.С. М.: ГУГК, 1980. С. 301–302.
2. Yakovlev G.P., Sytin A.K., Roskov Y.R. Legumes of North Eurasia // Publ. By Royal Bot. Gardens. Kew, 1996. P. 289–292.
3. Надеждина Т.П. О подземных органах солодок секции *Euglycyrrhiza* Boiss, распространенных на территории СССР // Вопр. изучения и использования солодки в СССР. М.; Л.: Наука, 1966. С. 27–34.
4. Беляев А.Ю., Васфилова Е.С. Особенности клоновой структуры и некоторые характеристики куртин-клонов солодки в популяциях на Южном Урале и в Приуралье // Вестник ОГУ. 2010. № 5(111). С. 87–93.
5. Толстиков А.Г., Балтина Л.А., Гранкина В.П. и др. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск: Гео, 2007. 311 с.
6. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. IV. М., 2018. С. 6429–6437. <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
7. Плантариум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран. 2007–2019. <http://www.plantarium.ru/>.
8. Мусаев И.Ф. Ареаграфическая характеристика видов солодки // Ареалы растений флоры СССР. Л., 1976. Т. 3. С. 85–112.
9. Григорьев Ю.С. К систематике рода *Glycyrrhiza* L. // Изв. Глав. бот. сада СССР. 1930. Т. 29. № 1–2. С. 92–98.
10. Круганова Е.А. К систематике и географии рода *Glycyrrhiza* L. // Вопр. изучения и использования солодки в СССР. М.; Л.: Наука, 1966. С. 19–26.
11. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб.: Мир и семья, 1995. С. 468.
12. Гранкина В.П. Система рода *Glycyrrhiza* L. (Fabaceae) // Новости систематики высших растений. 2008. Т. 40. С. 89–108.
13. Hayashi H., Hosono N., Kondo M. et al. Phylogenetic relationship of *Glycyrrhiza* plants based on *rbcL* sequences // Biol. Pharm. Bull. 1998. V. 21. № 7. P. 782–783.
14. Hayashi H., Honoso N., Kondo M. et al. Phylogenetic relationship of six *Glycyrrhiza* species based on *rbcL* sequences and chemical constituents // Biol. Pharm. Bull. 2000. V. 23. P. 602–606.
15. Lim J.M., Ahn Y.S., Park C.G. et al. Authentication of traded medicinal herb, *Glycyrrhiza* spp. (Licorice), based on nrDNA-ITS2 sequence analysis // J. Korean Soc. Int. Agric. 2012. V. 24. P. 435–443.

16. Kondo K., Shiba M., Yamaji H. et al. Species identification of Licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. № 8. P. 1497–1502.
17. Jo I.H., Sung J., Hong C. et al. Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and high-resolution melting (HRM) markers from the chloroplast genome of *Glycyrrhiza* species // 3 Biotech. 2018. V. 8. № 5. P. 220–230.
18. Григорьев Ю.С., Васильченко И.Т. Род солодка – *Glycyrrhiza* L. // Флора СССР / Под ред. Комарова В.Л. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. Т. 13. С. 230–240.
19. Ashurmetov O.A. Selection of parental pairs for obtaining hybrids in the genera *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch. et Mey // Genet. Resour. Crop Ev. 1996. V. 43. P. 167–171.
20. Зимницкая С.А. Состояние репродуктивной системы популяций видов рода *Glycyrrhiza* L. (Fabaceae) // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16. № 4. С. 629–634.
21. Беляев А.Ю., Васфилова Е.С. Близкородственные виды *Glycyrrhiza* L. на северном пределе распространения в Зауралье // Флора Урала в пределах бывшей Пермской губернии и ее охрана: мат-лы межрегион. конф. Пермь, 2007. С. 32–37.
22. Беляев А.Ю., Дымяшкова О.С., Васфилова Е.С., Кутлунина Н.А. О возможности использования данных по геногеографии солодок Северной Евразии для изучения вопросов флорогенеза // Методы аналитической флористики и проблемы флорогенеза: Материалы I Междунар. науч.-практич. конф. Астрахань, 2012. С. 54–59.
23. Беляев А.Ю., Васфилова Е.С. Географическая структура морфологического и генетического разнообразия солодки (*Glycyrrhiza* L.) на Южном Урале и прилегающих территориях // Вест. Курган. гос. ун-та. Сер. естеств. науки. 2015. № 4(38). С. 13–17.
24. Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N., Neale D.B. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 673–679.
25. Grivet D., Heinze B., Vendramin G.G., Petit R.J. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA // Mol. Ecol. Notes. 2001. V. 1. P. 345–349.
26. Hamilton M.B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 521–523.
27. Vogelstein B., Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from 600 agarose // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 615.
28. Hall T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acid Symp. 1999. V. 41. P. 95–98.
29. Excoffier L., Lischer H. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. 2010. V. 10. P. 564–567.
30. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
31. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 754–755.
32. Pons O., Petit R.J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles // Genetics. 1996. V. 144. P. 1237–1245.
33. Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 2571–2581.
34. Doyle J.J., Doyle J.L., Rauscher J.T., Brown A.H.D. Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*) // New Phytol. 2004. V. 161. P. 121–132. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00949.x>
35. Грант В. Видообразование у растений. М.: Мир, 1984. 528 с.
36. Архипов С.А., Волкова В.С. Геологическая история, ландшафты и климаты плейстоцена Западной Сибири. Новосибирск: НИЦ ОИГГМ СО РАН, 1994. 105 с.
37. Величко А.А., Ахлестина Е.Ф., Борисова О.К. и др. Восточно-Европейская равнина // Изменение климата и ландшафтов за последние 65 миллионов лет: кайнозой (от палеоцена до голоцена) / Под ред. Величко А.А. М.: ГЕОС, 1999. С. 43–83.
38. Franzke A., Hurka H., Janssen D. et al. Molecular signals for Late Tertiary/Early Quaternary range splits of an Eurasian steppe plant: *Clausia aprica* (Brassicaceae) // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 2789–2795.
39. Архипов С.А., Волкова В.С., Зольников И.Д. и др. Западная Сибирь // Изменение климата и ландшафтов за последние 65 миллионов лет: кайнозой (от палеоцена до голоцена) / Под ред. Величко А.А. М.: ГЕОС, 1999. С. 84–109.
40. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources / Eds Brown A.H., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. Massachusetts: Sinauer Associates, 1989. P. 43–46.
41. Erayman M., Ilhan E., Güzel Y., Eren A.H. Transferability of SSR markers from distantly related legumes to *Glycyrrhiza* species // Turk. J. Agric. For. 2014. V. 38. I. 1. P. 32–38.
42. Um Y., Jin M.L., Lee Y. et al. Genetic diversity analysis of *Glycyrrhiza uralensis* 8 novel polymorphic microsatellite markers // J. Plant Biotechnol. 2016. V. 43. P. 174–180.
43. Zhang J.-T., Xu B., Li M. Genetic diversity of populations of an endangered medicinal plant species (*Glycyrrhiza uralensis*) in different environments of North China // J. Med. Plants Res. 2010. V. 4. I. 9. P. 830–836. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.127>

Genetic Differentiation and Phylogenetic Relationships of the *Glycyrrhiza glabra* L., *G. uralensis* Fisch. and *G. korshinskyi* Grig. Inferred from Chloroplast DNA Variation

E. V. Hantemirova^{a,*}, A. Yu. Belyaev^a, O. S. Korchagina^b, and I. A. Laletina^a

^aInstitute of Plant and Animal Ecology, Ural of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia

^bSakhalin Branch of Botanical Garden Institute, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Yuzhno-Sakhalinsk, 693023 Russia

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

A study of the three licorice species *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* and *G. korshinskyi* of in the main part of area in North Eurasia was performed using the four chloroplast DNA regions (*16S-trnA*, *trnS-trnG*, *atpH-atpI* and *trnH-psbA*). We examined 212 specimens from 40 localities resulting in 14 haplotypes. We revealed two genetic lines in *Glycyrrhiza* (a western and eastern) and significant genetic differences between *Glycyrrhiza glabra* L. and *G. uralensis* ($F_{ST} = 84\%$). At the same time, we obtained data indicating possible introgressive hybridization and mixing of gene flows between populations of different licorice species in the past and an increase genetic diversity in populations located in the contact zones in the Southern Urals and Transural. Given overlapping distribution these species, we suggest that *G. korshinskyi* could have originated due to ancient introgressive hybridization following species diversification. This study illustrates the potential for certain DNA regions to be used as novel internet biological information carrier through combining DNA sequences with existing morphological character for identification licorice species and hybrids.

Keywords: *Glycyrrhiza*, cpDNA, genetic diversity.