

УДК 575.22: 582.736

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ *OXYTROPIS EVENORUM* (FABACEAE) ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

А. Б. Холина^{1*}, М. М. Козыренко¹, Е. В. Артюкова¹, Е. А. Андриянова², Д. В. Санданов³,
И. Ю. Селютина⁴, М. Г. Хорева²

¹ ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
г. Владивосток

² ФГБУН Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан

³ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ

⁴ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск

E-mail: kholina@biosoil.ru

По данным полиморфизма межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлоропластной ДНК изучены генетическое разнообразие и филогенетические связи *Oxytropis evenorum* Jurtz. et Khokhr., распространенного на территории северо-восточной Азии. Гаплотипическое разнообразие в популяциях из Магаданской области варьирует от 0.356 до 0.857, нуклеотидное – от 0.0001 до 0.0016. Популяция с Камчатки оказалась мономорфной. В целом вид характеризуется высоким уровнем гаплотипического (0.909) и относительно низким уровнем нуклеотидного (0.0032) разнообразия. Статистически достоверные значения генетических дистанций между популяциями варьируют от 0.42120 до 0.98043. Анализ молекулярной дисперсии показал, что около 81% всей генетической изменчивости приходится на межпопуляционную компоненту ($\Phi_{ST} = 0.80959$; $P < 0.0001$). Реконструкция филогенетических связей близкородственных видов согласуется с представлением о гибридогенном происхождении *O. evenorum* с участием *O. ochotensis*.

Ключевые слова: *Oxytropis evenorum*, Fabaceae, генетическое разнообразие, филогенетические отношения, хлоропластная ДНК.

DOI: 10.34078/1814-0998-2019-2-117-125

Oxytropis evenorum Jurtz. et Khokhr. (остролодка эвенов) относится к секции *Orobia* Bunge подрода *Oxytropis* DC. рода *Oxytropis* DC. (Малышев, 2008а). Вид впервые описан Юрцевым и Хохряковым (1977) как колымско-североохотский гипоарктический горный вид, обнаруженный в ряде пунктов Колымского нагорья, от левобережья верхнего течения Колымы и от верхнего течения Омолона до верховий рек, текущих к Охотскому морю. Позднее (Юрцев, 1986; Павлова, 1989; Малышев, 2008а) было установлено, что его ареал охватывает значительную часть северо-востока Азии – от Маньчжурии до Корякии и *O. evenorum* является эндемичным видом, но в дальнейшем у Малышева (2012) такая характеристика таксона

отсутствует. Ряд авторов (Юрцев, Хохряков, 1977; Юрцев, 1986) отмечали внешнее сходство *O. evenorum* и *O. maydelliana* Trautv. (остролодка Майделя, вид, распространенный на крайнем северо-востоке Азии и в Северной Америке). Однако они отличаются окраской венчика: белый или лиловато-белый с лиловым пятном на лодочке у *O. evenorum* и зеленовато-желтоватый без лилового пятна (иногда с неярким желтым пятном) у *O. maydelliana*, а также более короткими зубцами чашечки, меньшей мощностью и более слабым опушением всего растения. Павлова (1989) указывала, что растения из Охотского, южной части Анадырско-Пенжинского, Корякского и Камчатского флористических районов Дальнего Востока России, ранее определяемые как *O. maydelliana*, следует относить к *O. evenorum*, после выделения последней в самостоятельный вид. Кроме этого, *O. evenorum* обнаруживает сходство по

многим признакам (кирпично-красные прилистники, относительно короткие бобы с брюшной перегородкой, без спинной перегородки, короткие зубцы чашечки и др.) с *O. ochotensis* Bunge (остролодка охотская), но резко отличается от нее окраской венчика и формой его частей (Юрцев, Хохряков, 1977; Юрцев, 1986). Ареалы этих видов существенно перекрываются в верховьях Колымы, где встречается также *O. dorogostajskiyi* Kuzen. (остролодка Дорогостайского), сходная с *O. evenorum* по окраске и форме венчика, довольно коротким бобам с брюшной перегородкой, без спинной перегородки, опушению и отчасти общему облику, но отличающаяся цветом прилистников (Юрцев, Хохряков, 1977; Юрцев, 1986). По мнению этих авторов, *O. evenorum* является продуктом древней гибридизации *O. dorogostajskiyi* и *O. ochotensis*.

Фенетический анализ видов секции *Orobia* на основе 47 диагностических признаков (Малышев, 2008б) показал определенную близость *O. evenorum* и *O. dorogostajskiyi*, входящих в одну ветвь, тогда как *O. ochotensis* и *O. maydelliana* оказались в составе другой ветви, в которой последняя была в высокой степени близка с *O. sordida* (Willd.) Pers. (остролодка грязноватая, вид с чрезвычайно обширным ареалом). Исходя из этого, Малышев (2008б) предложил понизить таксономический статус *O. maydelliana* до подвида – *O. sordida* subsp. *maydelliana* (Trautv.) **Malyshev**. Однако в последующих работах он (Малышев, 2008а, 2012) приводит *O. maydelliana* в ранге вида. Якубов и Чернягина (2004) полагали, что правильнее рассматривать *O. evenorum* в качестве внутривидовой формы *O. maydelliana*, а ее, в свою очередь, считать синонимом *O. sordida*. Кроме того, Павлова (1989) и Малышев (2008а) указывали, что растения *O. sordida*, произрастающие на северо-востоке Азии, нужно относить к *O. sordida* subsp. *schamurinii* Jurtzev.

Перечисленные морфологически сходные виды вместе с рядом других представителей секции *Orobia* образуют на горном северо-востоке Азии сложный комплекс, в формировании которого немалая роль принадлежит гибридогенезу и аллополиплоидии. Так, для *O. evenorum* известны хромосомные числа 48 и 96, *O. maydelliana* – 96, *O. ochotensis* – 64, *O. sordida* – 48 и 64, *O. sordida* subsp. *schamurinii* – 96 (Малышев, 2008а).

В настоящее время для изучения генетического разнообразия редких и эндемичных видов рода *Oxytropis*, решения спорных вопросов систематики, популяционной и видовой идентификации, реконструкции филогенетических связей внутри рода широко используются моле-

кулярные маркеры хлоропластного генома (Artyukova et al., 2011; Gao et al., 2013; Lu et al., 2014; Холина и др., 2016, 2018; Kholina et al., 2018). Цель данного исследования – изучить генетическую изменчивость природных популяций *O. evenorum* и уточнить филогенетические связи *O. evenorum* с близкородственными видами по данным полиморфизма межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хлоропластной ДНК (хпДНК).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили 49 растений из природных популяций *O. evenorum* (табл. 1). Для реконструкции филогенетических отношений близкородственных видов секции *Orobia* в анализы были включены образцы *O. sordida*, *O. ochotensis*, *O. maydelliana* и *O. sordida* subsp. *schamurinii* (табл. 1). Всего проанализировано 66 растений из 12 местонахождений. В качестве внешней группы в филогенетических анализах использовали полученные нами ранее нуклеотидные последовательности межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК (номера доступа в ENA/EMBL/GenBank **LT856572**, **LT856585** и **LT856598** соответственно) *O. glabra* (Lam.) DC. секции *Mesogaea* Bunge подрода *Phacoxytropis* Bunge (Холина и др., 2018).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены из высушенной листовой ткани по методике (Артюкова и др., 2004). Для анализа генетической изменчивости выбрали использованные нами ранее (Холина и др., 2016, 2018; Kholina et al., 2018) межгенные спейсеры *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК. Амплификацию регионов проводили с универсальными праймерами, в реакционных условиях и температурных режимах, рекомендуемых для этих участков (Taberlet et al., 1991; Shaw et al., 2005). Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей определяли на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, USA), затем редактировали и собирали с помощью пакета программ Staden Package v. 1.5 (Bonfeld et al., 1995). Для каждого образца последовательности трех регионов выравнивали вручную в программе SeaView v. 4 (Gouy et al., 2010) и объединяли. Полученную матрицу использовали для расчета гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия в пакете программ Arlequin v. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010), генного потока (Nm) и степени дивергенции (Ks) между популяциями на основе нуклеотидных замен в программе DnaSP v. 5.0 (Librado, Rozas, 2009). Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) – определение

Таблица 1. Исследуемые популяции видов *Oxytropis* и распределение гаплотипов
 Table 1. Studied populations of *Oxytropis* species and distribution of haplotypes

Вид/подвид	Код популяции	Место и год сбора, коллектор (кол-во образцов)	Гаплотип (кол-во образцов)
<i>O. evenorum</i>	KAM	Центральная Камчатка, окр. пос. Эссо, перевал Гаргачан. 2000. В. В. Якубов (3)	H7 (3)
	MEDV	Магаданская обл., окр. г. Магадан, верховья р. Медвежка. 2014. Е. А. Андриянова (3)	H8 (1) H9 (2)
	EVE	Магаданская обл., окр. г. Магадан, о. Недоразумения, побережье Охотского моря. 2014. Е. А. Андриянова (1)	H8 (1)
	OLA	Магаданская обл., верховья р. Ола, берег реки. 2017. Д. В. Санданов, И. Ю. Селютин (11)	H10 (3) H11 (2) H12 (4) H13 (2)
	OPL	Магаданская обл., верховья р. Ола, Ольское плато. 2017. Д. В. Санданов, И. Ю. Селютин (13)	H13 (6) H14 (1) H15 (5) H16 (1)
	ATA	Магаданская обл., м. Атарган. 2017. Д. В. Санданов, И. Ю. Селютин (8)	H15 (1) H17 (2) H18 (3) H19 (1) H20 (1)
	ARM	Магаданская обл., перевал Арманский. 2017. Д. В. Санданов, И. Ю. Селютин (10)	H8 (8) H21 (2)
<i>O. sordida</i>	SORD	Республика Бурятия, окр. с. Ина, берег реки. 2014. Д. В. Санданов (8)	H1 (1) H2 (1) H3 (4) H4 (1) H5 (1)
<i>O. sordida</i> subsp. <i>schamurinii</i>	SSCHA	Чукотка, о. Врангеля, бух. Сомнительная. 2017. М. Г. Хорева (2)	H22 (1) H23 (1)
<i>O. maydelliana</i>	MAYD	Восточная часть Чукотского п-ова, оз. Коолень, северное побережье. 1970. Ю. П. Кожевников, А. А. Нечаев, Б. А. Юрцев (1)	H6 (1)
<i>O. ochotensis</i>	OCHK	Центральная Камчатка, влк. Ключевская Сопка, р-н сопки Подкова. 2005. В. П. Верхолат (5)	H24 (4) H25 (1)
	OCHM	Магаданская обл., окр. пос. Штурмовой, перевал Штурмовой. 2009. Д. С. Лысенко (1)	H26 (1)

уровня дифференциации (F_{ST}) и распределение генетической изменчивости внутри и между популяциями (индекс фиксации Φ_{ST}), проводили в пакете программ Arlequin v. 3.5. В качестве генетических дистанций использовали матрицу попарных значений индексов F_{ST} между популяциями. Статистическую значимость (P) индексов фиксации оценивали на основе 1023 пермутаций. Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом Median Joining (MJ) в программе NetWork v. 5.0 (Bandelt et al., 1999), кодируя каждую делецию или вставку, независимо от их размера, как единичное мутационное событие.

Работу выполняли с использованием оборудования ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* у 66 образцов *O. evenorum*, *O. sordida*, *O. ochotensis*, *O. maydelliana* и *O. sordida* subsp. *schamurinii* выявил низкую нуклеотидную изменчивость. Длина каждого из регионов у исследованных образцов разная вследствие присутствия моно- и динуклеотидных повторов. В последовательностях *psbA-trnH* обнаружены два переменных сайта, которые были информативны согласно методу максимальной экономии, длина варьировала от 453 до 457 пн вследствие присутствия мононуклеотидного поли-А мотива (A_9-A_{13}); в *trnL-trnF* – четыре переменных сайта, один из них был информативен соглас-

но методу максимальной экономии, длина варьировала от 758 до 777 пн вследствие присутствия мононуклеотидного поли-Т мотива (T_9-T_{12}) и динуклеотидного АТ-мотива, в котором от 6 до 16 повторов; в *trnS* – *trnG* – четыре переменных сайта, два из них были информативны согласно методу максимальной экономии, длина варьировала от 1184 до 1193 пн вследствие присутствия одного поли-А мотива (A_9-A_{15}) и двух поли-Т мотивов (T_8-T_9 и T_8-T_{11}). Длина объединенных и выравненных последовательностей трех регионов хпДНК, включая индели, составила 2430 сайтов, из них 2383 мономорфных и 10 переменных. Пять нуклеотидных замен были информативны согласно методу максимальной экономии. Все последовательности *O. sordida* имеют четыре маркерные (синапоморфные) нуклеотидные замены (Т в позициях 101, 740 и 742, А в позиции 1458). Нуклеотидные замены и индельные вариации в 66 последовательностях объединенной матрицы выявили 26 гаплотипов (Н1–Н26), последовательности которых для каждого региона депонированы в ENA/EMBL/GenBank под номерами доступа LS991870–LS991947.

У *O. evenorum* из 15 гаплотипов (Н7–Н21, см. табл. 1) только три были общими: гаплотип Н8 обнаружен в популяциях MEDV и EVE из окрестностей г. Магадана и популяции ARM с перевала Арманский; Н13 – в популяциях OLA и OPL, расположенных в верховьях р. Ола, Н15 – в OPL и популяции АТА с м. Атарган. Большинство исследуемых популяций из Магаданской области характеризуются высоким уровнем гаплотипического разнообразия (0.667–0.857), кроме популяции ARM (0.356), а популяция с Камчатки оказалась мономорфной (табл. 2).

Таблица 2. Параметры генетической изменчивости в популяциях *Oxytropis evenorum* по данным хпДНК

Table 2. Parameters of genetic variability of the *Oxytropis evenorum* populations according to cpDNA data

Код популяции	Генетическое разнообразие	
	гаплотипическое (стандартное отклонение)	нуклеотидное (стандартное отклонение)
КАМ	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)
MEDV	0.667 (0.314)	0.0016 (0.0014)
OLA	0.800 (0.075)	0.0010 (0.0007)
OPL	0.679 (0.088)	0.0004 (0.0003)
АТА	0.857 (0.108)	0.0015 (0.0010)
ARM	0.356 (0.159)	0.0001 (0.0002)
В целом	0.909 (0.020)	0.0032 (0.0017)

Примечание. Код популяции см. в табл. 1.

Однако в целом вид характеризуется высоким уровнем гаплотипического и относительно низким уровнем нуклеотидного разнообразия (0.909 и 0.0032 соответственно). Дивергенция нуклеотидных последовательностей достигает наибольших значений между популяцией MEDV и каждой из популяций КАМ, OLA, OPL и АТА, а между популяциями КАМ и АТА, EVE и ARM отсутствует (табл. 3).

Генетические дистанции (F_{ST}) между популяциями также варьируют в значительных пределах (см. табл. 3). Статистически достоверное наименьшее значение (0.42120) определено между популяциями OLA и АТА, а наибольшее (0.98043) – между популяциями КАМ и ARM. На значительную дифференциацию популяций *O. evenorum* указывают и результаты анализа молекулярной дисперсии – основная доля (около 81%) всей генетической изменчивости приходится на межпопуляционную компоненту и только около 19% – на внутривидовую (индекс фиксации $\Phi_{ST} = 0.80959$; $P < 0.0001$). Генный поток между популяциями практически отсутствует ($Nm = 0.09$).

В табл. 4 представлены данные о дивергенции нуклеотидных последовательностей и генетических дистанциях между исследуемыми таксонами, из которых следует, что значения этих показателей между *O. evenorum*–*O. ochotensis* и *O. evenorum*–*O. sordida* subsp. *schamurinii* соответствуют межпопуляционному уровню *O. evenorum* (см. табл. 3).

Для уточнения филогенетических отношений между близкородственными видами построена медианная сеть генеалогических связей между гаплотипами (см. рисунок).

Одну гаплогруппу образуют все гаплотипы *O. sordida* (Н1–Н5), вторую – гаплотипы *O. evenorum* (Н7–Н21), *O. sordida* subsp. *schamurinii* (Н22, Н23) и *O. ochotensis* (Н24–Н26). Гаплотип *O. maydelliana* (Н6) занимает промежуточное положение между двумя гаплогруппами. Дифференциация гаплотипов *O. sordida* и *O. maydelliana* друг от друга и от всех остальных подтверждается высокими значениями нуклеотидной дивергенции и генетических дистанций (см. табл. 4). Распределение гаплотипов во второй гаплогруппе не соответствует ни популяционной, ни таксономической принадлежности. AMOVA показал, что в этой полиморфной гаплогруппе на межпопуляционную составляющую приходится чуть более 72% и около 28% изменчивости находится внутри популяций ($\Phi_{ST} = 0.72176$, $P < 0.0001$), генный поток составил 0.15 мигранта на поколение.

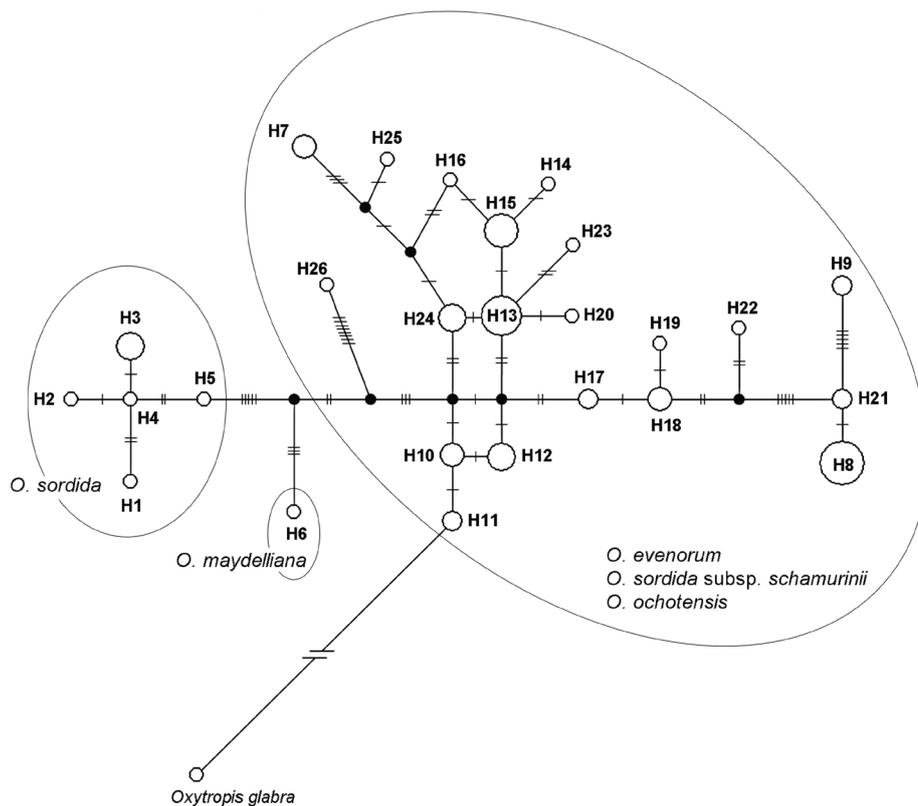
Таблица 3. Нуклеотидная дивергенция (K_S) и генетические дистанции (F_{ST}) между популяциями *Oxytropis evenorum* по данным хпДНКTable 3. Nucleotide divergence (K_S) and pairwise genetic distances (F_{ST}) between populations of the *Oxytropis evenorum* according to cpDNA data

Код популяции	КАМ	MEDV	EVE	OLA	OLP	ATA	ARM
K_S							
КАМ		2.667 (2)	2.000 (2)	0.182 (0)	0.077 (0)	0.000 (0)	2.000 (2)
MEDV	0.00111		0.667 (0)	2.606 (2)	2.641 (2)	2.667 (2)	0.667 (0)
EVE	0.00083	0.00028		2.182 (2)	2.077 (2)	2.000 (2)	0.000 (0)
OLA	0.00008	0.00108	0.00091		0.231 (0)	0.182 (0)	2.182 (2)
OPL	0.00003	0.00110	0.00087	0.00010		0.077 (0)	2.077 (2)
ATA	0.00000	0.00110	0.00083	0.00008	0.00003		2.000 (2)
ARM	0.00083	0.00028	0.00000	0.00091	0.00083	0.00083	
F_{ST}							
КАМ	0.00000						
MEDV	0.86667 ns	0.00000					
EVE	1.00000 ns	0.00000 ns	0.00000				
OLA	0.81537**	0.74866*	0.81351 ns	0.00000			
OPL	0.88841*	0.86616**	0.92169 ns	0.68842*	0.00000		
ATA	0.78351**	0.61361**	0.64374 ns	0.42120*	0.65800*	0.00000	
ARM	0.98043**	0.68551**	0.77778 ns	0.88805*	0.94259*	0.81791*	0.00000

Примечание. Здесь и в табл. 4 K_S : выше диагонали – среднее число нуклеотидных различий (число фиксированных различий), ниже диагонали – среднее число нуклеотидных замен на один сайт; * $P < 0.0001$; ** $0.009 < P < 0.050$; ns – незначимое. Уровень значимости определен на основе 1023 пермутаций. Код популяции см. в табл. 1.

Таблица 4. Нуклеотидная дивергенция (K_S) и генетические дистанции (F_{ST}) между *Oxytropis evenorum*, *O. maydelliana*, *O. sordida*, *O. ochotensis* и *O. sordida* subsp. *schamurinii* по данным хпДНКTable 4. Nucleotide divergence (K_S) and pairwise genetic distances (F_{ST}) between *Oxytropis evenorum*, *O. maydelliana*, *O. sordida*, *O. ochotensis*, and *O. sordida* subsp. *schamurinii* according to cpDNA data

Вид	<i>O. evenorum</i>	<i>O. maydelliana</i>	<i>O. sordida</i>	<i>O. ochotensis</i>	<i>O. sordida</i> subsp. <i>schamurinii</i>
K_S					
<i>O. evenorum</i>		4.102(3)	5.148(3)	0.745(0)	0.673(0)
<i>O. maydelliana</i>	0.00171		7.250(7)	3.833(3)	4.000(4)
<i>O. sordida</i>	0.00215	0.00302		4.083(3)	5.250(5)
<i>O. ochotensis</i>	0.00031	0.00160	0.00171		0.167(0)
<i>O. sordida</i> subsp. <i>schamurinii</i>	0.00028	0.00167	0.00219	0.00007	
F_{ST}					
<i>O. evenorum</i>	0.00000				
<i>O. maydelliana</i>	0.43240*	0.00000			
<i>O. sordida</i>	0.64608*	0.82857 ns	0.00000		
<i>O. ochotensis</i>	0.13615**	0.42529 ns	0.75124*	0.00000	
<i>O. sordida</i> subsp. <i>schamurinii</i>	-0.01497 ns	0.65517 ns	0.88073**	0.08096 ns	0.00000



Генеалогическая сеть гаплотипов представителей *Oxytropis evenorum*, *O. maydelliana*, *O. sordida*, *O. ochotensis* и *O. sordida* subsp. *schamurinii*, построенная с помощью MJ-метода. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки – медианные векторы, пересекающие линии – мутации. В качестве внешней группы использован образец *O. glabra*

The genealogical haplotype network of representatives of the *Oxytropis evenorum*, *O. maydelliana*, *O. sordida*, *O. ochotensis*, and *O. sordida* subsp. *schamurinii*, constructed using the MJ method. The size of circles reflects the haplotype occurrence frequency; small black circles are median vectors, and cross lines are mutations. An *O. glabra* sample was used as an outgroup

ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическая сложность рода *Oxytropis* связана с полиморфизмом морфологических признаков у растений, с высокой степенью межвидовой гибридной дивергенции как в пределах одной секции, так и межсекционной, а также с полиплоидией. Анализ нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* хпДНК у 49 образцов *O. evenorum* из 7 популяций, расположенных на территории северо-восточной Азии, показал, что уровень гаплотипического разнообразия в популяциях из Магаданской области изменяется от низкого (0.356) до высокого (0.857), а популяция с Камчатки оказалась мономорфной. Ранее нами (Холина и др., 2013) с помощью аллозимного анализа была исследована популяция *O. evenorum* из этого же локалитета Камчатки, которая характеризовалась средним уровнем изменчивости: доля полиморфных локусов составила 40.0%, наблюдаемая гетерозиготность – 0.200, ожидаемая гетерозиготность – 0.280. Принимая во внимание разную

природу двух классов маркеров – аллозимов, позволяющих лишь опосредованно охарактеризовать ядерную ДНК (ядДНК) и хпДНК, первичная структура которой в ходе эволюции накапливает изменения медленнее, чем яДНК, между полученными данными противоречий нет. Отсутствие генетического разнообразия хлоропластного генома может указывать на недавнее происхождение камчатской популяции из небольшой группы близкородственных растений.

В целом по результатам изменчивости хпДНК *O. evenorum* характеризуется высоким гаплотипическим и низким нуклеотидным разнообразием ($h = 0.909$, $\pi = 0.0032$, см. табл. 2), которое сравнимо с таковым в баргузинских популяциях *O. glandulosa* Turcz. (h изменяется от 0.703 до 0.911, π – от 0.0036 до 0.0059) (Kholina et al., 2018), у эндемичных видов Байкальской Сибири *O. bargusina* Peschk. ($h = 0.844$, $\pi = 0.0013$), *O. interposita* Sipl. ($h = 0.769$, $\pi = 0.0015$) и *O. triphylla* (Pall.) Pers. ($h = 0.915$, $\pi = 0.0020$) (Холина и др., 2018), а также у эндемика западного по-

бережья оз. Ханка *O. chankaensis* Jurtz. ($h = 0.718$, $\pi = 0.0005$) (Artyukova et al., 2011). Высокие значения h и низкие значения π характерны для популяций с быстрым ростом численности от изначально небольшого числа основателей, когда прошло достаточное время для восстановления гаплотипической изменчивости за счет мутационного процесса, но не достаточное для того, чтобы накопились значительные различия между нуклеотидными последовательностями (Абрамсон, 2007).

Высокие значения нуклеотидной дивергенции и генетических дистанций между *O. sordida* и *O. maydelliana*, и каждого из них от всех других видов (см. табл. 4), а также выявленные маркерные нуклеотидные замены у *O. sordida* и формирование гаплотипами отдельных гаплогрупп в сети (см. рисунок) подтверждают видовую самостоятельность этих таксонов. Низкие значения нуклеотидной дивергенции и генетических дистанций между *O. evenorum*, *O. ochotensis* и *O. sordida* subsp. *schamurinii* (см. табл. 4), отсутствие маркерных нуклеотидных замен и филогенетических групп в сети (см. рисунок) указывают на общность их происхождения и относительно недавнюю дивергенцию. Полученные нами результаты подтверждают мнения авторов (Юрцев, Хохряков, 1977; Юрцев, 1986) о гибридогенном происхождении *O. evenorum* с участием *O. ochotensis* и о видовой самостоятельности *O. evenorum* и *O. maydelliana*, что отмечал и Малышев (2008а, 2012). Сходство *O. ochotensis* и *O. sordida* subsp. *schamurinii* может быть, с одной стороны, проявлением параллельной дифференциации с формированием гомологов, с другой – следствием взаимодействия процессов гибридогенеза и полиплоидизации, учитывая высокую пloidность данных видов (Малышев, 2008а).

Таким образом, анализ хлоропластного генома показал, что *O. evenorum*, *O. ochotensis* и *O. sordida* subsp. *schamurinii* образуют единый генетический комплекс на северо-востоке Азии. В целом взаимоотношения близкородственных видов секции *Orobia* остались до конца неразрешенными, что говорит о необходимости изучения дополнительного материала всех исследуемых в данной работе таксонов и других видов, в частности, *O. dorogostajski*, и применение, возможно, других молекулярных маркеров.

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

ЛИТЕРАТУРА

Абрамсон Н. И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Информационный вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 2. С. 307–331.

Артюкова Е. В., Холина А. Б., Козыренко М. М. и др. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD маркеров // Генетика. 2004. Т. 40, № 7. С. 877–884.

Малышев Л. И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России // Turczaninowia. 2008а. Т. 11, № 4. С. 5–141.

Малышев Л. И. Род *Oxytropis* DC. // Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения / ред. К. С. Байков. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 237–248.

Малышев Л. И. Фенетика и хорология остролодок секции *Orobia* Bunge (род *Oxytropis* DC., Fabaceae) в Азиатской России // Растительный мир Азиатской России. 2008б. № 1. С. 3–9.

Павлова Н. С. Бобовые – Fabaceae // Сосудистые растения советского Дальнего Востока / отв. ред. С. С. Харкевич. Л.: Наука, 1989. Т. 4. С. 191–339.

Холина А. Б., Наконечная О. В., Якубов В. В. и др. Генетическая изменчивость шести видов рода *Oxytropis* DC. (Fabaceae) п-ова Камчатка // Генетика. 2013. Т. 49, № 10. С. 1174–1182.

Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В. и др. Современное состояние популяций эндемичных видов *Oxytropis* Байкальской Сибири и их филогенетические связи по данным секвенирования маркеров хлоропластной ДНК // Там же. 2018. Т. 54, № 7. С. 795–806.

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.

Юрцев Б. А., Хохряков А. П. Два новых вида рода *Oxytropis* DC. (секция *Orobia* Bunge) из Северо-Восточной Азии // Ботан. журн. 1977. Т. 62, № 11. С. 1620–1623.

Юрцев Б. А. *Oxytropis* DC. // Арктическая флора СССР / отв. ред. Б. А. Юрцев. – Л.: Наука, 1986. Вып. 9. Ч. 2. С. 61–146.

Якубов В. В., Чернягина О. А. Каталог флоры Камчатки (сосудистые растения). П.-Камчатский: Камчатпресс, 2004. 165 с.

Artyukova E. V., Kozyrenko M. M., Kholina A. B. et al. High chloroplast haplotype diversity in the endemic legume *Oxytropis chankaensis* may result from independent polyploidization events // Genetica. 2011. Vol. 139, No. 2. P. 221–232.

Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16, No. 1. P. 37–48.

Bonfeld J. K., Smith K. F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23. P. 4992–4999.

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. Resour. 2010. Vol. 10. P. 564–567.

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. No. 2. P. 266–271.

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. Vol. 27. P. 221–224.

Kholina A., Kozyrenko M., Artyukova E. et al. Plastid DNA variation of the endemic species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae) // *Turk. J. Bot.* 2018. Vol. 42. P. 38–50. DOI: 10.3906/bot-1706-11

Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25, No. 11. P. 1451–1452.

Lu P., Gao L., Jin F. et al. Molecular phylogeny of 10 species of *Oxytropis* based on *psbA-trnH* sequences // *Acta Bot. Yunnanica.* 2014. No. 3. P. 279–284.

Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T. et al. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // *Am. J. Bot.* 2005. Vol. 92. P. 142–166. DOI: 10.3732/ajb.92.1.142

Taberlet P., Gielly L., Pautou G. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Mol. Biol.* 1991. Vol. 17, No. 5. P. 1105–1109.

Поступила в редакцию 15.08.2018 г.

Поступила после доработки 07.12.2018 г.

GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *OXYTROPIS EVENORUM* (FABACEAE) BASED ON THE DATA OF SEQUENCING THE INTERGENIC SPACERS OF THE CHLOROPLAST DNA

A. B. Kholina¹, M. M. Kozyrenko¹, E. V. Artyukova¹, E. A. Andrianova², D. V. Sandanov³, I. Y. Selyutina⁴, M. G. Khoreva²

¹ Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok

² Institute of the Biological Problems of the North, FEB RAS, Magadan

³ Institute of General and Experimental Biology, SB RAS, Ulan-Ude

⁴ Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk

Based on polymorphism of the *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *trnS-trnG* intergenic spacers of the chloroplast DNA, the genetic diversity and phylogenetic relationships of *Oxytropis evenorum* Jurtz. et Khokhr., spread in Northeast Asia, were studied. Haplotype diversity in populations from Magadan Oblast varies from 0.356 to 0.857; nucleotide diversity, from 0.0001 to 0.0016. The population from Kamchatka is monomorphic. In general, the species is characterized by a high level of haplotype (0.909) and relatively low level of nucleotide (0.0032) diversity. Statistically significant values of genetic distances between populations vary from 0.42120 to 0.98043. Molecular dispersion analysis (AMOVA) showed that about 81% of all genetic variability is due to variability among populations ($\Phi_{ST} = 0.80959$, $P < 0.0001$). The reconstruction of phylogenetic relationships of closely related species confirms the idea of the hybridogenic origin of *O. evenorum*, involving *O. ochotensis*.

Keywords: *Oxytropis evenorum*, Fabaceae, genetic diversity, phylogenetic relationships, chloroplast DNA.

REFERENCES

Abramson, N. I., 2007, Phylogeography: Results, Problems, Prospects, *The Herald of VSGBS*, 11, 2, 307–331 [In Russian].

Artyukova, E. V.; Kholina, A. B.; Kozyrenko, M. M. et al., 2004, Analysis of Genetic Variability in Rare Endemic Species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) using RAPD Markers, *Russian Journal of Genetics*, 40, 7, 710–716.

Artyukova, E. V.; Kozyrenko, M. M.; Kholina, A. B. et al., 2011, High Chloroplast Haplotype Diversity in the Endemic Legume *Oxytropis chankaensis* May Result from Independent Polyploidization Events, *Genetica*, 139, 2, 221–232, DOI: 10.1007/s10709-010-9539-8.

Bandelt, H.-J.; Forster, P.; Röhl, A., 1999, Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies, *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1, 37–48.

Bonfeld, J. K.; Smith, K. F.; Staden, R., 1995, A New DNA Sequence Assembly Program, *Nuclear Acids Research*, 23, 4992–4999.

Excoffier, L.; Lischer, H. E. L., 2010, Arlequin Suite ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.

Gao, L.; Lu, P.; Jin, F. et al., 2013, *TrnL-F* Sequences Analysis and Molecular Phylogeny of 10 Species of *Oxytropis*, *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2, 266–271.

- Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O., 2010, SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building, *Molecular Biology and Evolution*, 27, 221–224.
- Kholina, A. B.; Kozyrenko, M. M.; Artyukova, E. V. et al., 2016, Phylogenetic Relationships of the Species of *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* and *Phacoxytropis* (Fabaceae) from Asian Russia Inferred from the Nucleotide Sequence Analysis of the Intergenic Spacers of the Chloroplast Genome, *Russian Journal of Genetics*, 52, 8, 780–793, DOI: 10.1134/S1022795416060065.
- Kholina, A. B.; Kozyrenko, M. M.; Artyukova, E. V. et al., 2018, Modern State of Populations of Endemic *Oxytropis* Species from Baikal Siberia and Their Phylogenetic Relationships Based on Chloroplast DNA Markers, *Ibid.*, 54, 7, 805–815, DOI: 10.1134/S1022795418070050.
- Kholina, A. B.; Kozyrenko, M. M.; Artyukova, E. V. et al., 2018, Plastid DNA Variation of the Endemic Species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae), *Turkish Journal of Botany*, 42, 38–50, DOI: 10.3906/bot-1706-11
- Kholina, A. B.; Nakonechnaya, O. V.; Yakubov, V. V. et al., 2013, Genetic Variation in Six Species of the Genus *Oxytropis* DC. (Fabaceae) from Kamchatka Peninsula, *Russian Journal of Genetics*, 49, 10, 1021–1029, DOI: 10.1134/S1022795413100049.
- Librado, P.; Rozas, J., 2009, DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data, *Bioinformatics*, 25, 11, 1451–1452.
- Lu, P.; Gao, L.; Jin, F. et al., 2014, Molecular Phylogeny of 10 Species of *Oxytropis* Based on *psbA-trnH* Sequences, *Acta Botanica Yunnanica*, 3, 279–284.
- Malyshev, L. I., 2008a, Diversity of the Genus *Oxytropis* in Asian Russia, *Turczaninowia*, 11, 4, 5–141 [In Russian].
- Malyshev, L. I., 2008b, Phenetics and Chorology of the Section *Orobia* Bunge (Genus *Oxytropis* DC., Fabaceae) in Asian Russia, *Plant Kingdom of Asian Russia*, 1, 3–9 [In Russian].
- Malyshev, L. I., 2012, Genus *Oxytropis* DC, *Conspectus Florae Rossiae Asiaticae: Plantae Vasculares*, Novosibirsk, SB RAS, 237–248 [In Russian].
- Pavlova, N. S., 1989, Legumes – Fabaceae, *Vascular Plants of the Soviet Far East*, Leningrad, Nauka, 4, 191–339 [In Russian].
- Shaw, J.; Lickey, E. B.; Beck, J. T. et al., 2005, The Tortoise and the Hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast DNA Sequences for Phylogenetic Analysis, *American Journal of Botany*, 92, DOI: 10.3732/ajb.92.1.142
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G. et al., 1991, Universal Primers for Amplification of Three Non-Coding Regions of Chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17, 5, 1105–1109.
- Yakubov, V. V.; Chernyagina, O. A., 2004, Flora Catalog of Kamchatka (Vascular Plants), Petropavlovsk-Kamchatsky, Kamchatpress [In Russian].
- Yurtsev, B. A., 1986, *Oxytropis* DC., *Flora Arctica URSS*, Leningrad, Nauka, Iss. 9, Part 2, 61–146 [In Russian].
- Yurtsev, B. A.; Khokhryakov, A. P., 1977, Two New Species of the Genus *Oxytropis* DC. (sect. *Orobia* Bunge) from Northeastern Asia, *Botanical Journal*, 62, 11, 1620–1623 [In Russian].