

УДК 575.17:582.579.2

ДИВЕРГЕНЦИЯ ВИДОВ СЕРИИ *Lacteae* РОДА *Iris* (Iridaceae) В РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАНАХ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

Е. В. Болтенков¹, Е. В. Артюкова², М. М. Козыренко²

¹Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690024

e-mail: boltenkov@rambler.ru

²Биологический институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690022

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

Виды серии *Lacteae* Doronkin рода *Iris* L., таксономический состав которой до настоящего времени остается спорным, встречаются в России на юге Сибири и Дальнего Востока и других регионах Азии. Анализ нуклеотидных последовательностей трех регионов хлоропластной ДНК (*rps4*, *trnL*–*trnF* и *trnS*–*trnG*) показал, что на территории России и сопредельных стран произрастают два генетически и географически обособленных вида серии *Lacteae*: на юге Дальнего Востока России – *I. oxypetala* Bunge, а в Сибири, Монголии и Казахстане – *I. lactea* Pall. Генетическая дифференциация между популяциями *I. lactea* крайне низка и недостоверна (индекс фиксации $\Phi_{ST} = 0.057$, $p > 0.05$), что указывает на единство генофонда и отсутствие других видов серии *Lacteae* на этой территории.

Ключевые слова: *Iris*, *Lacteae*, Iridaceae, дивергенция видов, *rps4*, *trnL*–*trnF* и *trnS*–*trnG* регионы, гаплотипы, хлоропластная ДНК.

DOI: 10.7868/S0016675816040032

Род *Iris* L. включает группы видов, таксономический состав которых является дискуссионным. Одну из таких групп образуют виды серии *Lacteae* Doronkin подрода *Eremiris* Spach [1], который был выделен в самостоятельный род *Eremiris* (Spach) Rodion. [2]. Виды серии *Lacteae* – многолетние травянистые короткокорневищные растения, приспособленные к широкому спектру условий среды обитания. Многие таксоны серии *Lacteae* описаны с территории России и сопредельных государств. *I. lactea* Pall. описан с юга Забайкальского края [3], позднее этот вид был повторно описан из Даурии как *I. pallasii* Fisch. [4], *I. biglumis* Vahl описан из Западной и Восточной Сибири [5], *I. oxypetala* Bunge – с северо-востока Китая [6], а *I. iliensis* Poljakov – с юго-востока Казахстана [7]. На основании изучения гербарных образцов нами установлено, что ирисы серии *Lacteae* встречаются в России на юге Сибири и Дальнего Востока, а также в Монголии, Казахстане, Узбекистане, Таджикистане, Киргизстане, Пакистане, Индии, Китае и на п-ове Корея.

Таксономический состав серии неоднократно подвергался пересмотру. Большинство зарубежных авторов признавали только один полиморфный вид *I. lactea* [8–13], который долгое время приводили под названием *I. ensata* Thunb. Мнения отечественных авторов различны. Федченко [14] для территории бывшего СССР приводил

один вид *I. ensata* auct. non Thunb., представленный несколькими географически обособленными формами, а Поляков [7] различал четыре вида: *I. biglumis* для Сибири и Монголии, *I. pallasii* для Алтая и Монголии, *I. ensata* auct. для востока Азии, *I. iliensis* для юго-востока Казахстана. Сергиевская [15] для Сибири, Монголии и Казахстана приводила *I. biglumis*, а для востока Азии – *I. ensata* auct. Грубов [16] признавал два вида: *I. lactea*, ареал которого включает юг Сибири, Монголию, Казахстан и Китай, и *I. oxypetala* – юг Дальнего Востока России, Корея и Китай. По мнению Пешковой [17], в Средней Сибири произрастают *I. lactea* и *I. biglumis*, а на Алтае и в Казахстане – *I. pallasii*. Алексеева [18] признает самостоятельность четырех видов: *I. lactea* (Восточная Сибирь, Казахстан, Монгolia, Китай), *I. biglumis* (Средняя Сибирь), *I. pallasii* (Западная Сибирь, Казахстан, Монгolia), *I. oxypetala* (юг Приморского края, Китай, Япония). Доронькин [19] приводит *I. biglumis* для Западной и Восточной Сибири, *I. pallasii* для Западной Сибири, *I. lactea* для Восточной Сибири, *I. oxypetala* для Дальнего Востока. Родионенко [2] включил в род *Eremiris* только два вида – *E. lactea* (Pall.) Rodion. и *E. oxypetala* (Bunge) Rodion. и, учитывая противоречивость взглядов на таксономический состав серии *Lacteae*, указал на необходимость изучения

Таблица 1. Образцы ирисов серии *Lacteae*, использованные в исследовании

Код	Место и год сбора, коллектор (акроним гербария)
POS	Россия, Приморский край, Хасанский р-н, пос. Посыт, 2011, Е.В. Болтенков (VBGI)
KH1	Россия, Приморский край, Хасанский р-н, 7 км от с. Гвоздево, 2008, А.Е. Кожевников (LE)
KH2	Россия, Приморский край, Хасанский р-н, мыс Мраморный, 2008, А.Е. Кожевников (LE)
USS	Россия, Приморский край, Уссурийский р-н, с. Путиловка, 2011, Е.В. Болтенков (VBGI)
ZAB	Россия, Забайкальский край, Борзинский р-н, берег оз. Харангур, 2011, О.Д. Чернова (VBGI)
ZAA	Россия, Забайкальский край, Могойтуйский район, 5 км от с. Догой, 1972, В. Куваев (MW)
ZON	Россия, Забайкальский край, Кыринский р-н, 5 км от с. Верхний Ульхун, 2001, А.В. Галанин (VBGI)
BUR	Россия, Бурятия, Тарбагатайский р-н, окр. с. Саратовка, 2011, А.В. Верхозина, Д.А. Кривенко (IRK)
PPA	Россия, Бурятия, Джидинский район, окр. с. Петропавловка, 2011, С.Е. Калинович (IRK)
TYV	Россия, Респ. Тыва, Овюрский р-н, окр. с. Ак-Чыраа, 1973, С. Тимохина, В. Амельченко (MW)
KHA	Россия, Хакасия, окр. г. Абакан (MHA)
KRA	Россия, Красноярский край, Ужурский р-н, пос. Златоруновск, 2012, Т.В. Полубоярова (VBGI)
ALB	Россия, Алтайский край, окр. г. Барнаул, 1981, М.С. Игнатов (MHA)
ALT	Россия, Респ. Алтай, Кош-Агачский р-н, окр. с. Актал, 1982, В.М. Доронькин (NSK)
AEM	Казахстан, Алматинская обл., национальный парк Алтын-Эмаль, 2008, Д. Рей (E)
ILI	Казахстан, Алматинская обл., окр. с. Илийск, 1957, Н.В. Павлов (MW)
AKB	Казахстан, Акмолинская обл., устье р. Байпак, 1955, Т.И. Исаченко (LE)
EK1	Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., берег ручья Сарыбулак, 1968, З.В. Карамышева (LE)
EK2	Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., оз. Бурлючак, 1968, Т.Г. Леонова (LE)
ARK	Монголия, Архангай, Тувшуулэх, 1979, И.А. Губанов (MW)
BUL	Монголия, Булган, 30 км от г. Булган, 1995, В.В. Неронов (MW)
GAG	Монголия, Говь-Алтай, долина р. Завхан, 1983, И.А. Губанов (MW)
SGB	Монголия, Умнеговь, Баяндалай, 1972, Н.П. Гуричева, Е.И. Рачковская (LE)
SGN	Монголия, Умнеговь, 100 км на юг от с. Номгон, 1981, И.А. Губанов (MW)
SGS	Монголия, Умнеговь, Сэвэрэй, пески Хонгорын-Элс, 2007, А.В. Галанин, А.В. Беликович (VBGI)
SHA	Монголия, Сэлэнгэ, сомон Шаамар, устье р. Орхон, 1988, Т.М. Заславская (LE)
ORK	Монголия, Уверхангай, окр. г. Хархорин, 2007, А.В. Галанин, А.В. Беликович (VBGI)
ULB	Монголия, Дорнод, сомон Баян-Уул, берег р. Ульдза, 2005, А.В. Галанин (VBGI)
ULN	Монголия, Хэнтий, сомон Норовлин, 2005, А.В. Беликович (VBGI)

Примечание. Расшифровка акронимов гербариев дана в разделе “Материалы и методы”.

этого вопроса с привлечением дополнительных методов исследования.

В последние годы для уточнения филогенетических связей между видами и установления границ видов в различных таксономических группах растений успешно используются молекулярные маркеры [20–25]. Анализ хлоропластного генома, который в роде *Iris* наследуется по материнской линии [26], способствует выяснению филогенетических связей между близкими видами [27–32].

Настоящая работа посвящена оценке степени дивергенции хлоропластного генома у видов серии *Lacteae* рода *Iris* с целью уточнения видового состава этой группы в России и сопредельных странах (Казахстан и Монголия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали растения, собранные в пяти природных популяциях (по 10–16 растений из каждой) Сибири и юга Дальнего Востока России (табл. 1, рис. 1), расположение которых соответствует распространению *I. pallasii* (ALT), *I. big-lumis* (BUR), *I. lactea* (ZAB) и *I. oxypetala* (POS, USS) согласно Алексеевой [18]. В анализ были вовлечены также растения (по 1–2 образца) из гербариев Ботанического института им. В.Л. Комарова (LE), МГУ им. Ломоносова (MW), Главного Ботанического сада им. Н.В. Цицина (MHA), Ботанического сада-института ДВО РАН (VBGI), Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (IRK), Центрального сибирского ботанического сада СО РАН им. М.Г. Попо-



Рис. 1. Карта-схема с указанием мест сбора растений серии *Lacteae* рода *Iris*. Код популяции см. табл. 1.

ва (NSK), Королевского ботанического сада (Эдинбург, Великобритания, Е), собранные в Приморском крае (2 местонахождения), Сибири (7 местонахождений), Монголии (10 местонахождений) и Казахстане (5 местонахождений). Всего проанализировано 92 растения из 29 местонахождений (табл. 1, рис. 1). В качестве внешней группы в филогенетических анализах использовали образцы *I. uniflora* Pall. ex Link (коллекция живых растений Ботанического сада-института ДВО РАН), относящегося к серии *Ruthenicae* (Diels) G.H.M. Lawr.

Тотальную ДНК выделяли модифицированным СТАВ методом [33]. Для анализа генетической дивергенции выбрали использованные нами ранее [27] три региона хлоропластной ДНК (хпДНК): межгенные спайсеры *trnS^{GCU}*–*trnG^{UUC}*, *trnL*–*trnF* и *rps4*–*trnS^{GGA}*, включающие *trnG* и *trnL* интроны и ген *rps4* соответственно. Амплификацию проводили, как описано в работе [27]. Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей, полученные после циклического секвенирования продуктов амплификации, определяли на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) и собирали с помощью пакета программ Staden Package [34]. Последовательности депонированы в EMBL/GenBank под номерами LN871604–LN871722.

Для каждого образца последовательности трех регионов выравнивали вручную с использованием программы SeaView [35] и объединяли. С помощью пакета программ Arlequin v. 3.5 [36] определяли число гаплотипов (*nh*), рассчитывали нуклеотидное (π) и гаплотипическое (*h*) разнообразие, индексы теста на нейтральность *D* [37], уровень дифференциации и распределение генетической изменчивости внутри и между популяциями и/или группами популяций (анализ молекулярной вариации, AMOVA). Степень дивергенции (K_s) между популяциями ALT, BUR, ZAB, USS и POS рас-

считывали на основе нуклеотидных замен с помощью пакета программ DnaSP v. 5.0 [38].

Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом Median Joining (MJ) в программе Network 4.6 [39], кодируя каждую делецию или вставку, независимо от их размера, как единичное мутационное событие. Филогенетический анализ последовательностей проводили методами максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML), ближайшего связывания (Neighbour-Joining, NJ) и максимальной экономии (Maximum Parsimony, MP) с помощью пакета программ PAUP v. 4.0b10 [40], используя в качестве внешней группы последовательности двух образцов *I. uniflora*, который образует сестринскую группу по отношению к серии *Lacteae* [41]. Оптимальную модель эволюции нуклеотидных последовательностей для ML и NJ анализов выбирали в программе Modeltest v. 3.06 [42] с использованием иерархических тестов. Для анализов ML и MP применяли эвристический поиск оптимальной топологии. Статистическую достоверность порядка ветвления оценивали с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев (Bootstrap Percentage, BP, %).

Исследование генетической структуры всей выборки для выявления в ней однородных групп проводили с помощью пакета программ BAPS6 [43], в котором используется байесовский подход и алгоритм стохастической оптимизации для оценки правдоподобия разделения индивидуумов на определенное число кластеров (K). Для определения наиболее вероятного числа кластеров (без учета принадлежности образцов к популяциям) использовали модуль программы “Clustering with linked loci”. Количество кластеров, при котором логарифм маргинального правдоподобия максимальен, соответствует наиболее вероятному числу генетических групп в исследуемой выборке. Анализ проводили десятикратно для

Таблица 2. Параметры генетической изменчивости в сибирских и дальневосточных популяциях ирисов по данным хпДНК

Параметры	Популяция				
	POS	USS	ZAB	BUR	ALT
<i>N</i>	15	15	16	11	10
<i>nh</i>	1	2	6	4	5
<i>S</i>	0	0	2	3	2
<i>I</i>	0	2	5	3	4
<i>h</i> (SD)	0	0.2476 (0.1307)	0.6833 (0.1200)	0.7818 (0.0749)	0.6667 (0.1633)
π (SD)	0	0.00015 (0.00015)	0.00122 (0.00072)	0.00382 (0.002108)	0.000702 (0.000474)

Примечание. *N* – число образцов; *nh* – число гаплотипов; *S* – число полиморфных нуклеотидных сайтов; *I* – число инделей; *h* – гаплотипическая изменчивость; π – нуклеотидная изменчивость; SD – стандартное отклонение. Код популяции см. табл. 1.

каждого значения К от 2 до 29. Для оценки вероятности отнесения образцов к выявленным кластерам и возможности смешанного происхождения популяций/образцов проводили admixture анализ, используя модель “Codon linkage”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 92 растений серии *Lactea* рода *Iris* и двух образцов *I. uniflora* определены нуклеотидные последовательности трех регионов хпДНК, из которых наиболее вариабельным оказался регион *trnS–trnG*. Общая длина объединенной последовательности трех регионов варьировала от 3243 (популяции USS, POS) до 3273 пн (BUR) и после выравнивания составила 3299 пн. В матрице нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов обнаружены вариации длины моно- и динуклеотидных повторов, индели разной длины и 34 вариабельных сайта, из которых 18 были информативны согласно методу максимальной экономии.

Популяционная изменчивость ирисов серии *Lactea* из Сибири и юга Дальнего Востока России

Анализ 65 растений из природных популяций Сибири (ALT, BUR, ZAB) и юга Дальнего Востока России (POS, USS) (табл. 1, рис. 1) выявил 16 гаплотипов, 7 из которых (44%) оказались уникальными. Наибольшее количество уникальных гаплотипов наблюдалось в популяциях ALT и ZAB (60 и 50% соответственно), в которых обнаружен также общий гаплотип H7, присутствующий с одинаковой частотой (около 10%). Уровни гаплотипической и нуклеотидной изменчивости исследованных популяций представлены в табл. 2. Наиболее высокие значения этих параметров характерны для популяции BUR. Большинство растений из дальневосточных популяций (26 расте-

ний из 28) содержали гаплотип H1. Гаплотипы дальневосточных популяций отличаются от гаплотипов сибирских популяций 12 нуклеотидными заменами и длиной динуклеотидного повтора. Дивергенция нуклеотидных последовательностей между сибирскими и дальневосточными популяциями в 5 раз выше, чем между сибирскими популяциями (табл. 3). Наибольшая дивергенция обнаружена между BUR и дальневосточными популяциями, а дивергенция BUR, ZAB и ALT, между которыми отсутствуют фиксированные нуклеотидные различия, значительно ниже и достигает минимального значения для пары ZAB и ALT (табл. 3).

На существенную дифференциацию хлоропластного генома исследуемых популяций и, следовательно, высокую степень генетической разобщенности между ними указывают высокие парные генетические дистанции (F_{ST}). Исключение составили дальневосточные популяции, между которыми величина F_{ST} мала и статистически незначима (табл. 3). Согласно результатам АМОVA (табл. 4), основная доля всей генетической изменчивости (более 85%) приходится на изменчивость между популяциями. Иерархический анализ распределения генетической изменчивости показал, что 73.6% от общей дисперсии обусловлено различиями между группами популяций из Сибири и Дальнего Востока, а генетические различия между популяциями и внутрипопуляционная изменчивость составили 16.6 и 9.8% соответственно.

Филогенетические деревья, построенные разными методами (MP, NJ, ML), не отличаются по топологии и с высокой достоверностью подтверждают монофилетичность клады, включающей все образцы из пяти исследуемых популяций. Растения из дальневосточных популяций образуют сестринскую группу (клада I, BP 100%) к

Таблица 3. Нуклеотидная дивергенция и генетические дистанции в сибирских и дальневосточных популяциях ирисов по данным хлДНК

Популяция	POS	USS	BUR	ZAB	ALT
K_S					
POS	—	0	14.182 (12)	12.118 (12)	12.900 (12)
USS	0	—	14.182 (12)	12.118 (12)	12.900 (12)
BUR	0.00521	0.00521	—	2.299 (0)	3.082 (0)
ZAB	0.00445	0.00445	0.00084	—	1.018 (0)
ALT	0.00473	0.00473	0.00112	0.00037	—
F_{ST}					
POS	0.00000				
USS	0.07143 ns	0.00000			
BUR	0.82848*	0.82076*	0.00000		
ZAB	0.93924*	0.93290*	0.62265*	0.00000	
ALT	0.97063*	0.96114*	0.55163*	0.42728*	0.00000

Примечание. K_S – нуклеотидная дивергенция, ниже диагонали – среднее число нуклеотидных замен на один сайт, выше диагонали – среднее число нуклеотидных различий между популяциями (в скобках число фиксированных различий); F_{ST} – парные генетические дистанции. * $p < 0.0001$ (1023 пермутации), ns – незначимое. Код популяции см. табл. 1.

Таблица 4. Анализ распределения генетической изменчивости между группами ирисов серии *Lacteae* на основе данных хлДНК

Источник дисперсии	% общей дисперсии между		
	группами	популяциями внутри групп	особями в популяции
Популяции ирисов из России			
1 группа: (POS + USS + ZAB + BUR + ALT)	—	85.61	14.39
2 группы: (POS + USS) и (ZAB + BUR + ALT)	73.64	16.60	9.76
3 группы: (POS + USS), (BUR) и (ZAB + ALT)	84.36	3.31	12.33
1 группа: (ZAB, BUR, ALT)	—	56.12	43.88
1 группа: (POS + USS)	—	7.14 ns	92.86
Ирисы серии <i>Lacteae</i> из 29 местообитаний			
1 группа: Сибирь, Казахстан и Монголия	—	5.73 ns	94.27
Кластеры, выявленные BAPS			
1 группа: (кластер 1 + кластер 2 + кластер 3)	—	87.45	12.55
2 группы: (кластер 1 + кластер 2) и (кластер 3)	69.10	21.02	9.88
1 группа: (кластер 1 + кластер 2)	—	60.89	39.11

Примечание. Код популяции см. табл. 1.

кластеру II, который объединяет с высокой степенью поддержки (ВР 94–95%) все растения из сибирских популяций (рис. 2,*a*). В кластере II не выявлено объединения гаплотипов в соответствии с их принадлежностью к разным популяциям, но с разной степенью поддержки выделяются две подгруппы. Одна подгруппа, с высокой статистической поддержкой (ВР 94–96%), содержит три из четырех гаплотипов популяции BUR, а

вторая, слабо поддержанная (ВР 61, 63 и 72% в MP, NJ и ML анализах соответственно), включает три из пяти гаплотипов популяции ALT (рис. 2,*a*).

Для выявления генеалогических связей между гаплотипами популяций Сибири и Дальнего Востока методом MJ построена сеть, в которой выделяются две гаплогруппы, отстоящие друг от друга более чем на 20 мутационных шагов (рис. 2,*b*). Первая гаплогруппа соответствует полученному в

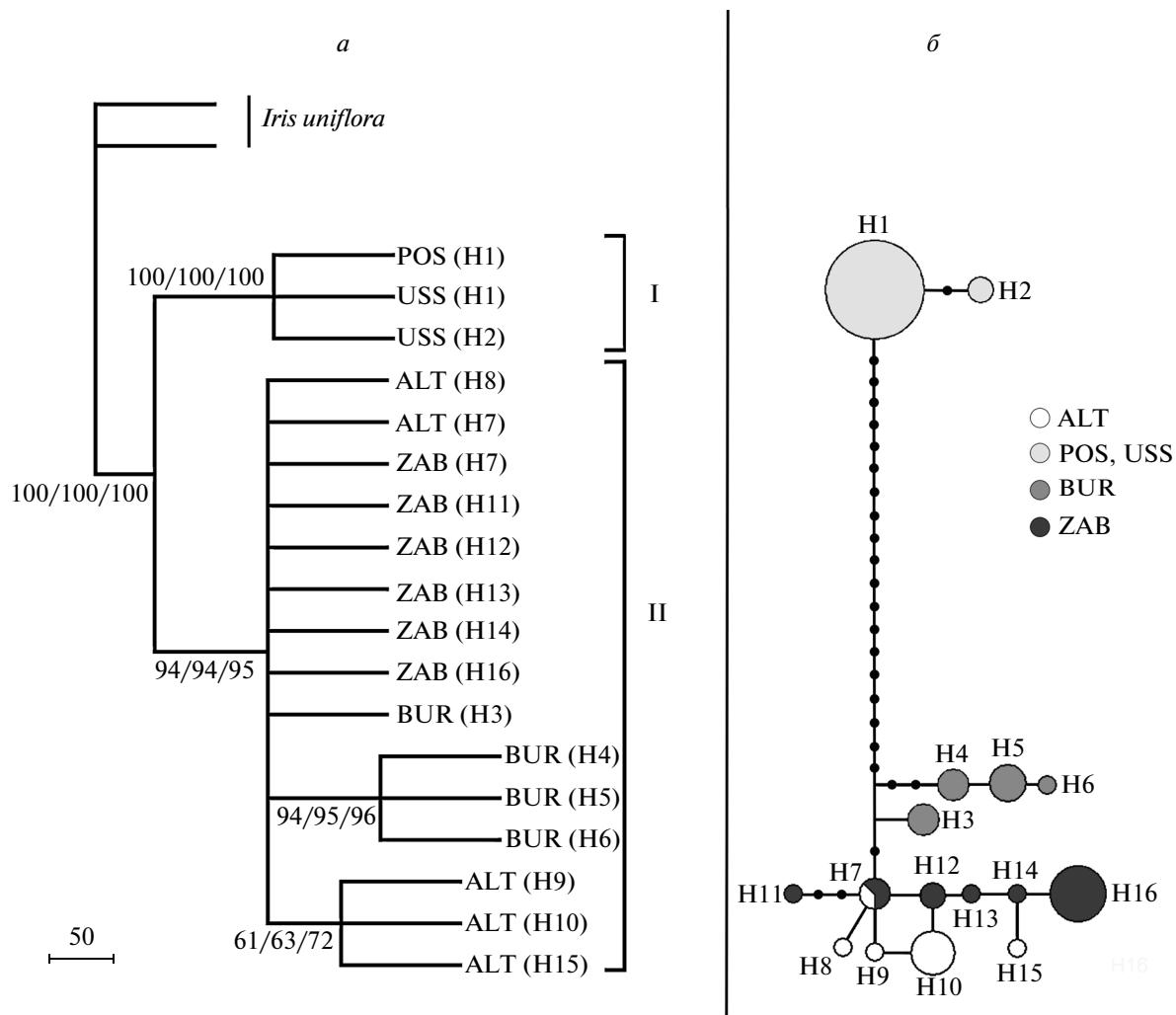


Рис. 2. Генетические связи представителей пяти популяций ирисов серии *Lacteae* на основании сравнения последовательностей трех регионов хлДНК: *а* – MP-дерево (длина – 131 шаг, индекс соответствия CI – 1.0, индекс гомоплазии HI – 0.0, индекс удерживания RI – 1.0). Числами обозначены значения индекса бутстрепа, рассчитанные для MP/NJ/ML методов (выше 50%); *б* – генеалогическая сеть гаплотипов, построенная с помощью MJ-метода. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки – гипотетические гаплотипы. Код популяций см. табл. 1.

филогенетических анализах кластеру I, в то время как три сибирские популяции (кластер II, рис. 2,*а*), образуют вторую гаплогруппу, в которой большинство гаплотипов находятся в одном мутационном шаге от соседнего и не подразделяются в соответствии с их популяционной принадлежностью (рис. 2,*б*). Выявленные в ней альтернативные связи (петлевые структуры в сети) не позволяют однозначно установить генеалогические взаимоотношения между популяциями ALT и ZAB.

Генетические взаимоотношения ирисов серии *Lacteae* из России, Монголии и Казахстана

При анализе всей выборки ирисов (92 образца) выявлено 34 гаплотипа, большинство из которых представлено только в одной из популяций. Сре-

ди 10 образцов из Монголии растения из ARK и SGB имеют гаплотип H4, который встречается с частотой 28% в популяции BUR. Гаплотип H7, общий для сибирских популяций ZAB и ALT, обнаружен в образце ЕК1 из Казахстана. Анализ распределения молекулярной изменчивости показал, что достоверная генетическая дифференциация между суммарными выборками растений из Сибири, Монголии и Казахстана (46, 10 и 6 образцов соответственно) отсутствует (индекс фиксации $\Phi_{ST} = 0.057, p > 0.05$, табл. 4).

Филогенетический анализ 34 гаплотипов методами MP, NJ и ML позволил построить деревья сходной топологии, которая принципиально не отличается от топологии для пяти популяций. Одно из двух деревьев, полученных при MP ана-

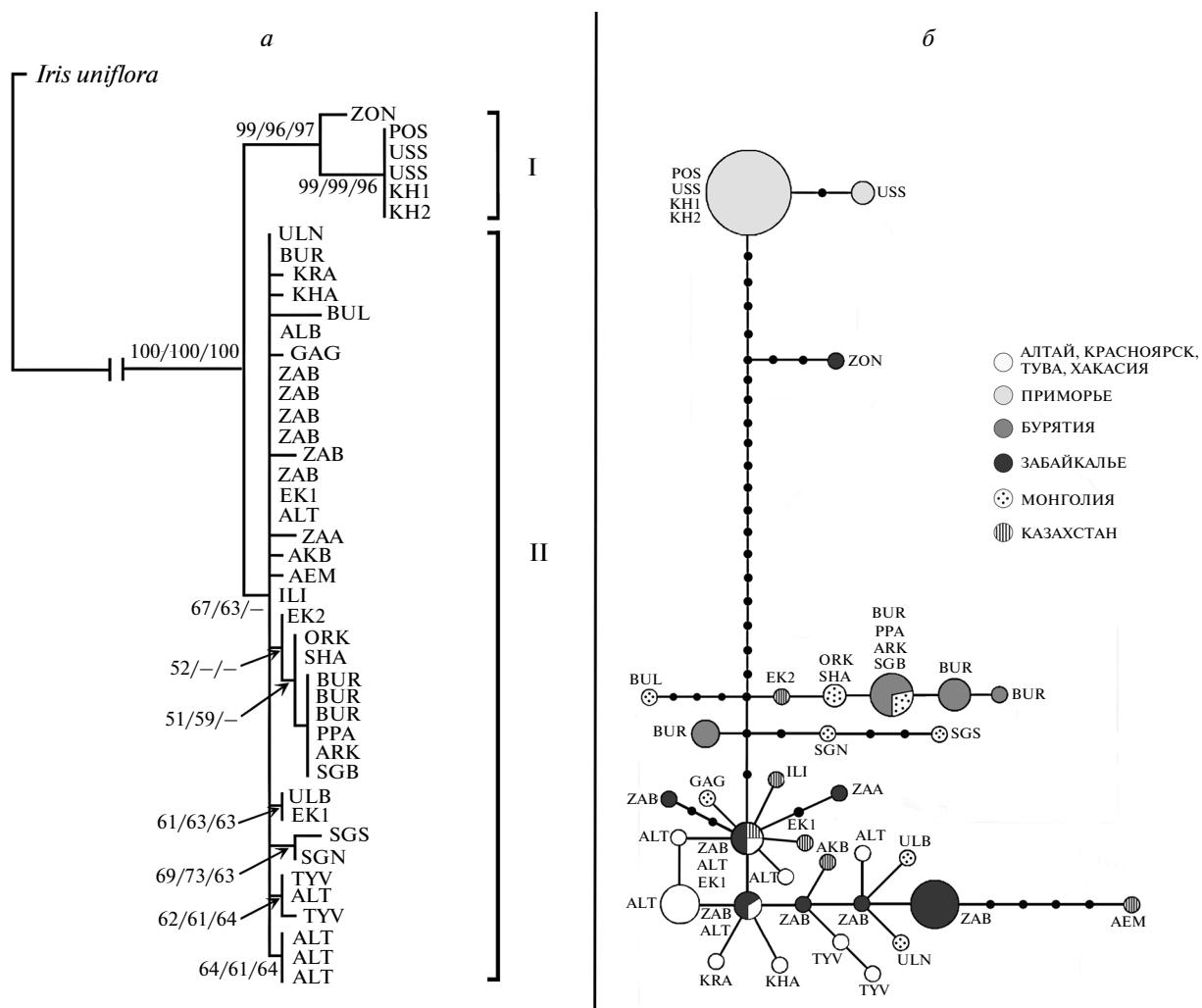


Рис. 3. Генетические взаимоотношения ирисов серии *Lactae* из 29 местонахождений на территории России, Монголии и Казахстана на основании сравнения последовательностей трех регионов хлДНК: *a* — MP-дерево (длина — 131 шаг, индекс соответствия CI — 0.9618, индекс гомоплазии HI — 0.0382, индекс удерживания RI — 0.9727). Числами обозначены значения индекса бутстрепа, рассчитанные для MP/NJ/ML методов (выше 50%); *б* — генеалогическая сеть гаплотипов, построенная с помощью MJ-метода. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки — гипотетические гаплотипы. Код популяций см. табл. 1.

лизе, приведено на рис. 3, *a*. Дальневосточные популяции и образец ZON из Забайкальского края с высокой статистической поддержкой (BP 96–99%) образуют кластер I, а все остальные образцы — кластер II, но статистическая поддержка невысока (BP 63 и 67% в MP и NJ соответственно) или незначима (ML анализ).

Сеть генеалогических связей (рис. 3, *б*) показывает характер взаимоотношений между гаплотипами из разных местонахождений. Две хорошо обособленные гаплогруппы соответствуют кластерам I и II в филогенетических деревьях (рис. 2, *a*, 3, *a*), при этом гаплотип ZON из Забайкальского края занимает промежуточное положение, но генетически ближе к популяциям с Дальнего Востока, чем из Сибири. Образцы, составляющие по филогенетическим построениям кластер II (рис. 3, *a*),

формируют вторую гаплогруппу (рис. 3, *б*). В этой группе гаплотипы растений из Забайкальского края, Западной Сибири, а также большинство гаплотипов из Казахстана и восточной Монголии образуют несколько звездчатых структур, центрами которых являются гаплотипы популяции ZAB (рис. 3, *б*). Это указывает на общность происхождения этих ирисов, а также на расширение ареала популяции ZAB в прошлом, которое подтверждается значением индекса Tajima's *D* теста ($D = -1.498$, $p < 0.05$).

Байесовский анализ генетической структуры ирисов без учета их популяционной принадлежности показал ($P = 0.99996$) подразделение на три кластера (рис. 4, *a*). В кластер I попали все образцы (кроме ZON) из Забайкальского края, представители западносибирских популяций (ALT,

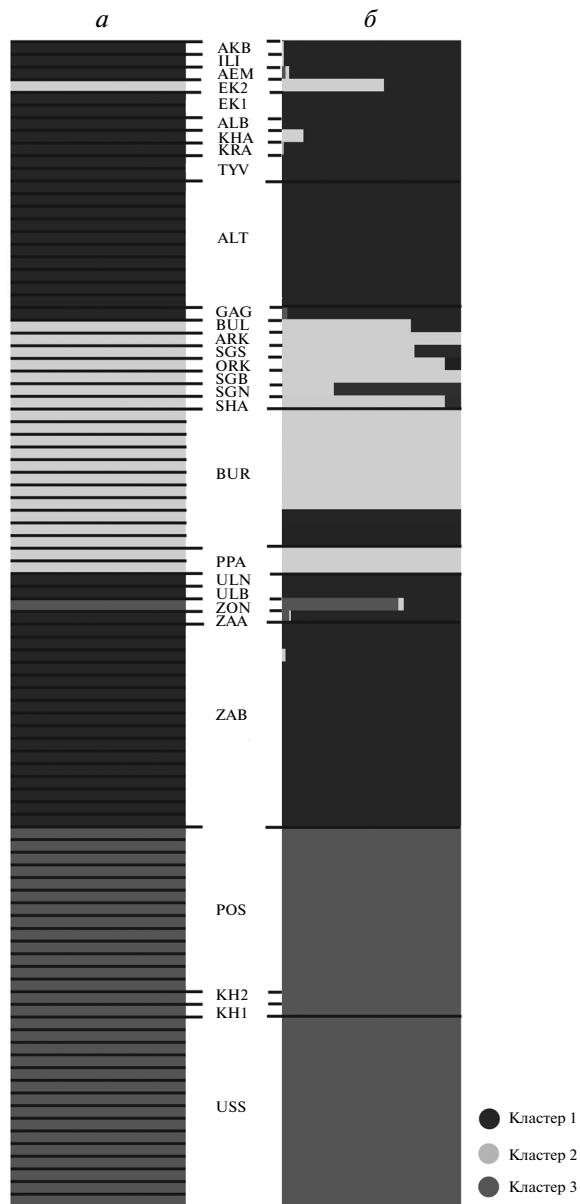


Рис. 4. Результаты байесовского анализа с помощью программы BAPS генетической структуры ирисов серии *Lacteae*, произрастающих на территории России, Монголии и Казахстана, по данным хлДНК: *a* – кластеризация 92 образцов без учета их принадлежности к популяциям; *б* – вероятность отнесения образцов к одному из трех кластеров при “admixture” анализе. Каждая горизонтальная полоса соответствует одному образцу, а относительная доля разных цветов в его окраске обозначает вероятность принадлежности данного образца к соответствующему кластеру. Код популяций см. табл. 1.

KHA, KRA, ALB и TYV), образцы из Монголии (ULB, ULN и GAG) и Казахстана (EK1, AKB, ILI, AEM). Растения популяций BUR и PPA из Бурятии, образцы BUL, ARK, SGN, SGS, SGB, ORK, SHA из Монголии и образец EK2 из Казахстана

оказались в кластере 2. Кластер 3 образуют образцы POS, USS, KH1 и KH2 с Дальнего Востока вместе с образцом ZON из Забайкальского края (рис. 4, *a*). При анализе генетического состава гаплотипов достоверно доказана генетическая однородность популяций POS и USS (кластер 3) и популяций ZAB и ALT (кластер 1). В целом оба кластера демонстрируют высокую гомогенность. Только для гаплотипов KHA (кластер 1) и ZON (кластер 3) выявлена возможность смешанного происхождения (рис. 4, *б*). В отличие от этих кластеров генетически неоднородными оказались кластер 2 и входящая в его состав популяция BUR, один из гаплотипов которой (H3), обнаруженный в трех из 11 растений, проявляет высокое генетическое сходство с гаплотипами кластера 1. Кроме того, входящие в кластер 2 гаплотипы образцов SHA, SGN, ORK, SGS и BUL из Монголии и EK2 из Казахстана также содержат в разной пропорции мутации, характерные для кластера 1, что указывает на смешанное происхождение этих гаплотипов. Распределение генетической изменчивости между кластерами подобно таковому для пяти популяций из России (табл. 4). Генетические дистанции между кластером 3 и любым другим (1 или 2) в 1.5 раза выше, чем между кластерами 1 и 2 (табл. 5), что свидетельствует о высокой степени генетической обособленности популяций с юга Дальнего Востока, составляющих кластер 3, и их длительной изоляции от всех остальных образцов, формирующих кластеры 1 и 2. Значения F_{ST} между этими двумя кластерами также достаточно велики, однако низкая нуклеотидная дивергенция между ними (табл. 5) указывает на тесные взаимосвязи в недалеком прошлом между географически разъединенными в настоящее время популяциями, составляющими эти кластеры.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическая сложность серии *Lacteae* связана со значительным полиморфизмом морфологических признаков у растений. Ранее неоднократно отмечалось, что характер морфологической изменчивости у растений *I. lactea* не имеет географической приуроченности, может проявляться в пределах одной популяции и связан с условиями произрастания [2, 12, 15–17]. Несмотря на это, изменчивые признаки использовали для разграничения видов серии *Lacteae*, а взгляды на распространение видов различались и были противоречивыми.

Полученные нами результаты анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей трех регионов хлДНК у видов серии *Lacteae*, произрастающих в России, Монголии и Казахстане, показали, что все исследованные растения распределились на два кластера: один образуют растения с юга Дальнего Востока, второй – все ис-

Таблица 5. Генетические дистанции и нуклеотидная дивергенция между тремя кластерами, выявленными в BAPS анализе представителей серии *Lacteae*

Кластер	K_S			F_{ST}		
	1	2	3	1	2	3
1	—	3.004 (0)	12.355 (7)	—	—	—
2	0.00093	—	14.332 (8)	0.60892*	—	—
3	0.00382	0.00443	—	0.91297*	0.92247*	—

Примечание. K_S – нуклеотидная дивергенция, ниже диагонали – среднее число нуклеотидных замен на один сайт, выше диагонали – среднее число нуклеотидных различий между популяциями (в скобках число фиксированных различий); F_{ST} – парные генетические дистанции. * $p < 0.0001$ (1023 пермутации).

следованные образцы из Сибири, Монголии и Казахстана. Высокая степень дифференциации между популяциями из Сибири и Дальнего Востока ($F_{ST} > 0.85$) свидетельствует о значительной генетической обособленности ирисов, которые произрастают в пределах ареалов *I. lactea* и *I. oxyptala*. Растения *I. oxyptala* отличаются низким уровнем генетической изменчивости и отсутствием общих гаплотипов с *I. lactea*. Нуклеотидная дивергенция между *I. lactea* и *I. oxyptala* сравнима с дивергенцией между видами секции *Psammiris* рода *Iris* [27, 28] и между близкородственными видами других родов, например, *Capsella* [21], *Oxytropis* [24] и *Megadenia* [25]. Генетические дистанции и индекс фиксации между популяциями ZAB, BUR и ALT, произрастающими в регионах Сибири, которые соответствуют ареалам *I. lactea*, *I. biglumis* и *I. pallasii* в России [18], также высоки (0.41, 0.61 и 0.56 соответственно). Однако низкая нуклеотидная дивергенция, отсутствие дифференцирующих нуклеотидных замен между этими популяциями, формирование в филогенетических построениях единого кластера, включающего гаплотипы всех образцов из Сибири, Монголии и Казахстана, позволяют предположить, что они относятся к одному виду, ареал которого соответствует *I. lactea* по Грубову [16].

Видовую самостоятельность *I. lactea* и *I. oxyptala* подтверждают результаты анализов филогенетических, генеалогических связей и генетической структуры выборки растений из 29 местонахождений (рис. 3, 4). Значительную вариабельность образцов *I. lactea* и их распределение в два кластера выявил байесовский анализ (рис. 4). Первый кластер объединяет популяции с юга Забайкальского края, Западной Сибири, Казахстана, запада и востока Монголии, второй – популяции из Бурятии и центральной части Монголии. Присутствие во второй группе образца ЕК2 с северо-востока Казахстана, гаплотип которого может быть отнесен как ко второй, так и к первой группе (58 и 42% сходства соответственно), требует изучения более представительной выборки растений из этого реги-

она. Обнаруженное во второй группе высокое содержание (>40%) гаплотипов, генетически близких гаплотипам первой группы из Забайкальского края и Западной Сибири, может свидетельствовать о происхождении от общего предшественника и сравнительно недавней дивергенции.

Таким образом, полученные результаты анализа хлоропластного генома показали, что на территории России и сопредельных стран произрастают два генетически и географически обособленных вида серии *Lacteae* – *I. lactea* и *I. oxyptala*. Вид *I. oxyptala* распространен на юге Дальнего Востока, а *I. lactea* – на юге Сибири, в Казахстане и Монголии. Однако для окончательного решения вопроса о таксономическом составе серии *Lacteae* и уточнении распространения видов необходимо исследование расширенной выборки растений в других регионах Азии.

Авторы выражают благодарность А.В. Верхозиной, В.М. Доронькину, Т.В. Полубояровой и О.Д. Черновой за помощь в сборе образцов из Сибири.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта ДВО РАН 12-1-П30-02.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доронькин В.М. Обзор сибирских видов рода *Iris* (Iridaceae) // Бот. журн. 1990. Т. 75. № 3. С. 409–416.
2. Родионенко Г.И. *Eremiris* – новый род семейства Iridaceae // Бот. журн. 2006. Т. 91. № 11. С. 1707–1712.
3. Pallas P.S. Reise durch verschiedene Provinzen des Russischen Reichs. V. 3. St. Petersburg, 1776. 760 p.
4. Treviranus L.C. Indicis seminum quae in horto botanico Wratislaviensi prostant, appendix III. 1821. s.p.
5. Vahl M. Enumeratio plantarum vel ab aliis, vel ab ipso observatarum, cum earum differentiis specificis, synonymis selectis et descriptionibus succinctis. V. 2. Hauiae, 1805. 423 p.
6. Bunge A.A. Enumeratio plantarum, quas in China boreali collegit Dr. Al. Bunge. Anno 1831. St. Petersburg, 1833. 73 p.

7. Поляков П.П. К ревизии *Iris ensata* Thunb. // Бот. матер. Бот. ин-та АН СССР. 1950. Т. 12. С. 88–90.
8. Baker J.G. A synopsis of the known species of *Iris*. VIII // Gard. Chron. 1876. В. 5. Р. 323–324.
9. Lynch R.I. The book of the *Iris* // Handbooks of practical gardening / Ed. Roberts H. L.; N.Y.: J. Lane, 1904. V. 21. 214 p.
10. Dykes W.R. The genus *Iris*. Cambridge Univ. Press, 1913. 245 p.
11. Lawrence G.H.M. A reclassification of the genus *Iris* // Gentes Herbarum. 1953. В. 8. Р. 346–371.
12. Mathew B. The *Iris*. 2nd ed. L.: Batsford, 1989. 215 p.
13. Zhao Y., Noltie H.J., Mathew B. Iridaceae // Flora of China. V. 24: Flagellariaceae through Marantacea / Eds Wu Z.-Y., Raven P.H. St. Louis: Missouri Bot. Gard. Press, 2000. P. 297–313.
14. Федченко Б.А. Iridaceae Lindl. // Флора СССР / Под ред. Комарова В.Л. Л.: Изд-во АН СССР, 1935. Т. 4. С. 498–588.
15. Сергиевская Л.П. Iridaceae // Флора Западной Сибири. Томск, 1961. Т. 12. С. 3207–3208.
16. Грубов В.И. Критические заметки по таксономии и номенклатуре некоторых видов рода *Iris* L. флоры СССР // Новости систематики высш. раст. 1970. Т. 6. С. 29–37.
17. Пешкова Г.А. О некоторых видах рода *Iris* L. из Средней Сибири // Новости систематики высш. растений. 1975. Т. 12. С. 135–140.
18. Алексеева Н.Б. Род *Iris* L. (Iridaceae) в России // Turczaninowia. 2008. Т. 11. № 2. С. 5–68.
19. Доронькин В.М. Iridaceae Juss. // Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения / Под ред. Байкова К.С. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 456–459.
20. Pleines T., Jakob S.S., Blattner F.R. Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses // Plant Syst. Evol. 2009. V. 282. P. 281–294. DOI: 10.1007/s00606-008-0036-9
21. Slotte T., Ceplitis A., Neuffer B. et al. Intrageneric phylogeny of *Capsella* (Brassicaceae) and the origin of the tetraploid *C. bursa-pastoris* based on chloroplast and nuclear DNA sequences // Am. J. Bot. 2006. V. 93. P. 1714–1724. DOI: 10.3732/ajb.93.11.1714
22. Артюкова Е.В., Гончаров А.А., Козыренко М.М. и др. Филогенетические связи дальневосточных аралиевых по результатам сравнения последовательностей ITS региона ядерной рДНК // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 800–810. DOI: 10.1007/S11177-005-0140-7
23. Abdelaziz M., Lorite J., Muñoz-Pajares A.J. et al. Using complementary techniques to distinguish cryptic species: A new *Erysimum* (Brassicaceae) species from North Africa // Am. J. Bot. 2011. V. 98. P. 1049–1060. DOI: 10.3732/ajb.1000438
24. 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. DOI: 10.1134/S1022795411110032
25. Artyukova E.V., Kozyrenko M.M., Boltenkov E.V., Gorovoy P.G. One or three species in *Megadenia* (Brassicaceae): insight from molecular studies // Genetica. 2014. V. 142. P. 337–350. DOI: 10.1007/s10709-014-9778-1
26. Cruzan M.B., Arnold M.L., Carney S.E., Wollenberg K.R. cpDNA inheritance in interspecific crosses and evolutionary inference in Louisiana irises // Amer. J. Bot. 1993. V. 80. P. 344–350.
27. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Журавлев Ю.Н. Самостоятельность видов *Iris vorobievii* N.S. Pavlova, *Iris mandshurica* Maxim. и *Iris humilis* Georgi (Iridaceae): доказательство из ядерного и хлоропластного геномов // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1575–1584. DOI: 10.1134/S1022795409110143
28. Reeves G., Chase M.W., Goldblatt P. et al. Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions // Am. J. Bot. 2001. V. 88. P. 2074–2087. DOI: 10.2307/3558433
29. Makarevich I., Golovnina K., Scherbik S., Blinov A. Phylogenetic relationships of the Siberian *Iris* species inferred from noncoding chloroplast DNA sequences // Int. J. Plant Sci. 2003. V. 164. P. 229–237. DOI: 10.1086/346160
30. Cornman R.S., Arnold M.L. Phylogeography of *Iris missouriensis* (Iridaceae) based on nuclear and chloroplast markers // Mol. Ecol. 2007. V. 16. P. 4585–4598. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03525
31. Wilson C.A. Phylogeny of *Iris* based on chloroplast *matK* gene and *trnK* intron sequence data // Mol. Phylog. Evol. 2004. V. 33. P. 402–412. DOI: 10.1016/j.ymp.2004.06.013
32. Wilson C.A. Phylogenetic relationships among the recognized series in *Iris* section *Limniris* // Syst. Bot. 2009. V. 34. P. 277–284. DOI: 10.1600/036364409788606316
33. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Болтенков Е.В., Лауве Л.С. Сомаклональная изменчивость *Iris pseudacorus* L. по данным RAPD- и цитогенетического анализа // Биотехнология. 2004. №. 2. С. 13–23.
34. Bonell J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999. DOI: 10.1093/nar/23.24.4992
35. 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
36. 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
37. Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism // Genetics. 1989. V. 123. P. 597–601.
38. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp187

39. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
40. Swofford D.L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.04. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc. 2003.
41. Mavrodiev E.V., Martínez-Azorín M., Dranishnikov P., Crespo M.B. At least 23 genera instead of one: The case of *Iris* L. s.l. (Iridaceae) // PLoS One. 2014. V. 9. № 8. e106459. DOI: 10.1371/journal.pone.0106459
42. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 817–818. DOI: 10.1093/bioinformatics/14.9.817
43. Corander J., Marttinen P., Sirén J., Tang J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. P. 539. DOI: 10.1186/1471-2105-9-539

Species Divergence in *Iris* Series *Lacteae* (Iridaceae) in Russia and Adjacent Countries Based on Chloroplast DNA Sequence Data

E. V. Boltenkov^a, E. V. Artyukova^b, and M. M. Kozyrenko^b

^aBotanical Garden-Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690024 Russia

e-mail: boltenkov@rambler.ru

^bInstitute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

In Russia, the species of the genus *Iris* L., series *Lacteae* Doronkin, the taxonomic structure of which still remains controversial, are found in the south of Siberia and the Russian Far East, as well as in other regions of Asia. Sequence analysis of three chloroplast DNA regions (*rps4*, *trnL*–*trnF*, and *trnS*–*trnG*) shows that, in Russia and adjacent countries, there are two genetically and geographically isolated *Lacteae* species. *I. oxyptala* Bunge grows in the south of the Russian Far East, and *I. lactea* Pall. grows in Siberia, Mongolia, and Kazakhstan. Genetic differentiation between the populations of *I. lactea* is extremely low and statistically insignificant (the fixation index $\Phi_{ST} = 0.057$, $p > 0.05$), pointing to the unity of the gene pool and the absence of other *Lacteae* species in this area.

Keywords: *Iris*, *Lacteae*, Iridaceae, species divergence, *rps4*, *trnL*–*trnF*, and *trnS*–*trnG* regions, haplotypes, chloroplast DNA.