

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *TROLLIUS* (*RANUNCULACEAE*) С ПОМОЩЬЮ ISSR-МАРКЕРОВ

Л.В. Буглова, Н.С. Нуждина

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: astro11@rambler.ru, nszvyagina@mail.ru

Выполнено ISSR-маркирование 12 видов рода *Trollius* (*Ranunculaceae*) для изучения их генетического родства с применением статистических методов обработки данных. Результаты исследования 116 межмикросателлитных повторов (ISSR) геномной ДНК, амплифицированных с помощью четырех праймеров, показали дифференциацию изученных видов на три дивергентные группы: европейскую, сибирскую и дальневосточную. Выявлено близкое родство между видами *T. altaicus*, *T. asiaticus*, *T. kytmanovii*, *T. sajanensis*, с интрогрессией между ними. Наибольшая генетическая дистанция ($D = 0.428$) определена для *T. sajanensis* и *T. vicarious*, наименьшая – для *T. altaicus* и *T. asiaticus* ($D = 0.091$). Для всех представителей *T. sajanensis* установлено гибридное происхождение.

Ключевые слова: *Trollius*, ISSR, кластерный анализ, метод главных компонент, виды, интрогрессия, морфологические признаки.

EVALUATION OF ISSR ANALYSIS FOR STUDYING OF THE GENUS *TROLLIUS* (*RANUNCULACEAE*) DIVERSITY

L.V. Buglova, N.S. Nuzhdina

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: astro11@rambler.ru, nszvyagina@mail.ru

The ISSR fingerprinting of the twelve *Trollius* species (*Ranunculaceae* family) was used in order to establish its inter-species relationships. Based on 116 ISSR markers obtained by PCR amplification with four ISSR primers three divergent groups of species were revealed: european, siberian and far-eastern. According to the ISSR data the species *T. altaicus*, *T. asiaticus*, *T. kytmanovii*, *T. sajanensis*, have close genetic relationships, therefore introgressive hybridization between these species is permitted. The greatest genetic distance ($D = 0.428$) was determined for the species *T. sajanensis* and *T. vicarious* and the smallest distance ($D = 0.091$) for *T. altaicus* and *T. asiaticus*. Based on ISSR profile all individuals of *T. sajanensis* have been treated as hybrids.

Key words: *Trollius*, ISSR, cluster analysis, principal component analysis, species, introgression, morphological features.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Trollius* L. (*Ranunculaceae*), широко распространенный в голарктическом биогеографическом регионе, включает около 30 видов многолетних поликарпических трав (Зиман, 1985; Doroszewska, 1974), обладающих выраженными декоративными и лекарственными свойствами (Полетико, Мишенкова, 1967; Пovyдыш и др., 2008; Wang et al., 2016).

Систематика этого, сравнительного небольшого, рода остается спорной. На основе анализа морфологических признаков авторы отмечают нечеткость межвидовых границ, высокую степень полиморфизма, интрогрессию видов в районах пересечения ареалов (Сипливинский, 1972; Зиман, 1985; Doroszewska, 1974). Степень проникновения генотипов в пределы соседних видов и критерии

оценки гибридизации не выявлены. Кроме того, эволюционным процессам внутри рода *Trollius* свойственна гомоплазия (конвергентная эволюция), что дополнительно усложняет выделение диагностических морфологических признаков для систематики рода (Pellmyr, 1992).

В ЦСБС СО РАН проводится изучение видов *Trollius* по программе VI.52.1. “Научные основы структурно-динамической организации биоразнообразия Северной Азии и его ресурсного потенциала: современное состояние и прогноз развития” методом родовых комплексов (Русанов, 1977). При работе с родовыми комплексами исследователи изучают не только видовой состав, но и образцы (представляющие популяции), которые интродуцируют из различных, зачастую погранич-

ных частей ареала вида. При этом растения, как правило, имеют морфологические отличия от типовых форм. Информация об их родственных связях в пределах рода является актуальной, а использование молекулярных методов наиболее перспективным.

С помощью генетического маркирования уточнен ряд вопросов, связанных с систематическим положением рода *Trollius*. Так, по локусам *atpB*, *rbcL* и *18S rDNA* выявлено значительное сходство между *Trollius* и *Adonis* L., формирующих отдельную кладу в филогенетическом древе семейства *Ranunculaceae* (Jensen, 1968, 1995; Hoot, 1995). В то же время отмечена незначительная степень родства между *Helleborus* L. и *Trollius* по молекулярному маркеру вариабельности сайтов рестрикции хлДНК (chloroplast DNA restriction site variation), рассматриваемых ранее по морфологическим данным как близкородственные. Другими молекулярными маркерами (Jensen et al., 1995) также выявлена значительная генетическая дистанция между этими таксонами. С помощью RAPD-метода изучено генетическое разнообразие 24 образцов *Trollius* в КНР (Li, Ding, 2010).

Анализ межмикросателлитных участков геномной ДНК (ISSR), хотя и имеет ряд преимуществ, таких как относительная коммерческая до-

ступность и воспроизводимость результатов, почти не использовался для изучения биоразнообразия рода *Trollius*. Этот метод позволяет оценить изменчивость по группе нейтральных локусов, равномерно расположенных по геному, что дает возможность оценивать меж- и внутривидовую дифференциацию, а также сравнивать потомство гибридных линий (Кашин, 2016; DeYoung, Honeycutt, 2005; Zhang et al., 2008; Arslan, Tamkoc, 2011; Pharamawati et al., 2015). С помощью ISSR-маркеров успешно изучена генетическая вариабельность популяций *Hedysarum theinum* Горного Алтая (Звягина, Дорогина, 2013), получены положительные результаты применения метода даже при работе с потомством клонов (Шейкина и др., 2012). Данные анализа генетических дистанций, выявленные с помощью ISSR-маркеров для четырех видов *Trollius*, включая *T. europaeus*, согласуются с современными представлениями о филогенетических взаимоотношениях между ними (Грушецкая и др., 2013).

Молекулярное генотипирование сибирских видов *Trollius*, произрастающих в труднодоступных регионах Сибири, Якутии и Дальнего Востока, до настоящего времени не проводилось. Цель настоящей работы – изучить генетическое разнообразие представителей рода *Trollius*, произрастающих в Северной Азии, с помощью ISSR-маркеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. При выполнении исследования использовали гербарные образцы (IRKU, свежие сборы на стадии подготовки для внесения в NS) и материалы Биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, № USU 440534. Для исследования было отобрано 48 образцов, представляющих различные степени родства: семенное потомство от одной особи, растения природных популяций, особи одного вида разных популяций, представители разных секций (табл. 1). В качестве генетического контроля использовали растения, полученные через международную систему обмена семян (виды *T. europaeus*, *T. chinensis*), и отборный образец № 46 гибридного происхождения как объекты, гарантированно не имеющие гибридных аналогов с изучаемыми экземплярами. Их видовая принадлежность была установлена к.б.н. Л.В. Бугловой, за исключением образцов № 22, 23, 25–28, 45 (определила к.б.н. Н.В. Степанцова), № 24 (к.б.н. И.В. Хан) и № 47 и 48 (к.б.н. Т.И. Фомина). В качестве объектов внешней группы использованы *Adonis vernalis* L. и *Caltha palustris* L.

Выделение ДНК и ISSR-анализ. Для выделения ДНК использовали воздушно-сухие листья, которые собирали с образцов в период бутониза-

ции–начала цветения. Экстракцию проводили с помощью NucleoSpin Plant II kit (Macherey and Nagel, USA). Чистоту и концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически с помощью Biophotometer (Eppendorf, Germany).

Для предварительного тестирования использовали 22 праймера, успешно зарекомендовавшие себя в предыдущих исследованиях по изучению молекулярного полиморфизма у растений (Грушецкая и др., 2013; Эрст и др., 2015; Zvyagina et al., 2016). Для проведения анализа выбирали те праймеры, которые характеризовались воспроизводимым четким полиморфным паттерном (табл. 2). Праймеры, при амплификации которых не было получено ПЦР-продукта или получен шмер, или не полиморфный паттерн, в анализе не использовали.

Таким образом, были отобраны четыре праймера, характеризующиеся наиболее высоким полиморфизмом и репрезентативностью ISSR-паттерна, для анализа генетического разнообразия фрагмента родового комплекса *Trollius* (табл. 3). Выявлено 116 фрагментов ДНК, из них 99 % полиморфных, что свидетельствует об их высокой разрешающей способности при анализе видов *Trollius*. Амплификация с каждым праймером осуществлялась в двух- или трехкратной повторности

Объекты исследований

Номер объекта (вида)	Вид/(гербарный лист)	Местонахождение	Высота, м над ур. м.
1 (1)	<i>T. asiaticus</i>	Новосибирская обл., Искитимский р-н, N 54.5789; E 83.3747	200–250
2 (1)	»	Новосибирская обл., Маслянинский р-н, мост р. Суенга	250–300
3 (1)	»	Респ. Саха (Якутия), окрестности г. Ленска	200–250
4 (1)	»	Респ. Тыва, Тоджинский р-н	1100–1300
5 (1)	»	Окр. ЦСБС, N 54.8969; E 83.1332	200
6 (1)	»	Респ. Тыва, Овюрский р-н	–
7 (1)	»	Алтай, Онгудайский р-н, парк Уч-Енмек	800–850
8 (1)	»	Респ. Тыва, Монгун-Тайгинский р-н	–
9 (1)	»	Респ. Тыва	–
10 (2)*	»	Ермаковский р-н, N 52.82888; E 93.32382	1339
11 (2)*	»	То же, N 52.82258; E 93.31082	1315
12 (2)*	»	», N 52.82888; E 93.32382	1339
13 (3)	»	Улаганский р-н, окр. пос. Акташ, N 50.34; E 87.75	2700–2800
14 (3)	<i>T. asiaticus</i> × <i>T. altaicus</i>	Усть-Канский р-н, Ябоганский пер., N 50.52.34, E 85.14.18	1490
15 (3)	<i>T. altaicus</i>	Алтай, Онгудайский р-н, парк Уч-Енмек, N 50; E 50.80	1800–1850
16 (3)	»	Улаганский р-н, окр. пос. Акташ, N 50.34; E 87.75	2700
17 (3)	»	Алтай, Онгудайский р-н, парк Уч-Енмек	1930
18 (3)	»	Улаганский р-н, окр. пос. Акташ	1350
19 (3)	»	Семинский перевал	1700
20 (4)	<i>T. sp. (asiaticus или kytmanovii)</i>	Монголия, пер. Хатангийн-даваа, N 48.57.74; E 107.04.27	1380
21 (5)	<i>T. kytmanovii</i>	Иркутская обл., р. Снежная, N 51.33.88; E 104.64.59	900–1300
22 (5)	<i>T. kytmanovii</i> (IRKU29696)	Бурятия, Кабанский р-н, N 51.38.94; E 106.50.40	491
23 (5)	<i>T. kytmanovii</i> (IRKU30291)	То же, N 51.95.79; E 106.35.22	475
24 (5)	<i>T. kytmanovii</i>	Кыринский р-н, N 49.35.10; E 111.00.30	1522
25 (6)	<i>T. sp. (kytmanovii × T. sajanensis)</i> (IRKU29834)	Респ. Бурятия, Кабанский р-н, юг оз. Байкал, N 51.43.71; E 104.82.21	492
26 (7)	<i>T. sajanensis</i> (IRKU29852)	То же, N 51.42.99; E 104.84.22	663
27 (7)	<i>T. sajanensis</i> (IRKU29867)	», N 51.37.80; E 104.86.79	1215
28 (8)	<i>T. sibiricus</i>	Иркутская обл., N 53.50.15; E 107.04.33	–
29 (9)	<i>T. sp. (T. asiaticus × T. sajanensis)</i>	Респ. Тыва, Сангилен, N 50.17.14; E 96.24.20	2267
30 (2)*	<i>T. sp. (T. asiaticus × T. sajanensis)</i>	Ермаковский р-н, N 52.82.24; E 93.31.04	–
31 (10)	<i>T. europaeus</i>	ГБС	–
32 (10)	»	ГБС	–
33 (10)	»	Город Chemnitz, Bundesrepublik Deutschland	–
34 (11)	<i>T. ledebourii</i> var. <i>polycephala</i>	Читинская обл.	–
35 (11)	»	Семенное потомство от № 34	–
36 (11)	»	То же	–
37 (12)	<i>T. sp. (riederianus)</i>	О. Кунашир	–
38 (12)	<i>T. riederianus</i>	Елизовский р-н, N 52.67.89; E 158.17.88	708
39 (12)	»	Быстринский р-н, N 56.33.23; E 157.56.14	600
40 (13)	<i>T. apertus</i>	Бот. сад, г. Кировск	–
41 (13)	»	То же	–
42 (9)	<i>T. sp. (T. asiaticus × T. sajanensis)</i>	Респ. Тыва, Тоджинский р-н	–
43 (12)	<i>T. sp. (riederianus)</i>	Konungariket Sverige	–
44 (14)	<i>T. chinensis</i>	Rostock university, Bundesrepublik Deutschland	–
45 (15)	<i>T. vicarius</i>	Кыринский р-н, N 49.54.10; E 112.47.13	842
46 (16)	<i>T. × hybridus</i>	Садовая форма из гибридов <i>T. europaeus</i>	–
47 (17)	<i>Adonis vernalis</i>	Новосибирская обл., Искитимский р-н	–
48 (17)	<i>Caltha palustris</i>	Кемеровская обл.	–

* Растения, произрастающие на хр. Ергак-Таргак-Тайга, определены согласно общепринятой классификации как *T. asiaticus*, однако в математической обработке имеют видовой номер, отличный от образцов, полностью соответствующих названному виду.

Таблица 2

Характеристики праймеров, испытанных для изучения ISSR-полиморфизма сибирских видов рода *Trollius* (жирным шрифтом выделены праймеры, использованные для анализа)

Номер п/п	Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	T _{отж.} , °C
1	814	(CT) ₈ TG	51
2	17898A	(CA) ₆ AC	45
3	17898B	(CA) ₆ GT	48
4	17899A	(CA) ₆ AG	48
5	17899B	(CA) ₆ GG	42
6	844A	(CT) ₈ AC	44
7	844B	(CT) ₈ GC	42
8	M1	(AC) ₈ CG	57
9	M2	(AC) ₈ YG	58
10	M3	(GA) ₈ YC	53
11	M7	(GAC) ₅	46
12	M9	(GACAC) ₄	57
13	M10	(CA) ₆ RG	49
14	M14*	(GACA) ₄	47
15	HB9	(GT) ₆ GG	48
16	HB10	(GA) ₆ CC	48
17	HB12	(CAC) ₃ GC	41
18	HB14	(CTC) ₃ GC	42
19	539*	(ATG) ₆	63
20	540*	(GAA) ₆	60
21	541*	(AC) ₈ AA	63
22	542*	(AC) ₈ TA	57

* Праймеры, рекомендованные в литературе (Грушецкая и др., 2013).

для выявления наиболее четких и стабильно воспроизводимых ISSR-фрагментов. Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводили с помощью C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Для этого готовили реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую 2.7 мМ MgCl₂, 1.25 мМ праймера, 0.4 мМ мононуклеотидов, 1x PCR-буфер, 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия) и 5 пмоль матрицы. Программа амплификации состояла из этапа денатурации ДНК в течение 1.30 мин при

Таблица 3

Характеристики ISSR-праймеров, использованных в работе (Rp – разрешающая сила праймера, РРВ – доля полиморфных фрагментов)

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Температура отжига, °C	Rp	Кол-во полиморфных фрагментов (РРВ, %)
HB12	CACCACCACGC	41	10.42	26 (100)
HB14	CTCCTCCTCGC	42	13.04	32 (100)
17898B	CACACACACACAGT	47	11.91	35 (100)
17899A	CACACACACACAAG	48	10.42	23 (95.8)
<i>Итого:</i>				116 (99.14)

94 °C и 35 циклов: 0.40 мин при 94 °C, 0.45 мин отжига праймера при 41–48 °C и 1.30 мин при 72 °C. Заключительный этап пролонгирования нуклеотидной цепи длился 5 мин при 72 °C. ПЦР-продукты, окрашенные 2x SYBR-Green (Life Technologies, USA), были разделены методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле в 1x TBE-буфере и идентифицированы с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA). Длину фрагментов ПЦР определяли с помощью молекулярного маркера массы (Медиген, Россия). В качестве примера на рис. 1 приведены результаты амплификации с использованием маркера 17898B.

Чистота полученных экстрактов ДНК в среднем составила 1.93. Концентрация ДНК варьировала от 22 до 219 нг/мкл и достигала в среднем 54.7 нг/мкл. Анализ продуктов ПЦР, полученных с использованием четырех ISSR-маркеров, выявил 116 фрагментов, из них полиморфных – 99 %; наибольшая информативность (Rp), равная 13.04, была отмечена для HB14.

Статистическая обработка данных. Каждый ISSR-маркер рассматривался как доминантный, и отмечалось его наличие (1) либо отсутствие (0), в результате чего была построена бинарная матрица. Генетические дистанции (D) между видами рассчитаны в программе TFPGA 1.3 (Nei, 1972; Miller, 1997). Информативность генетических маркеров (Informativeness of bands – Ib) определялась со-

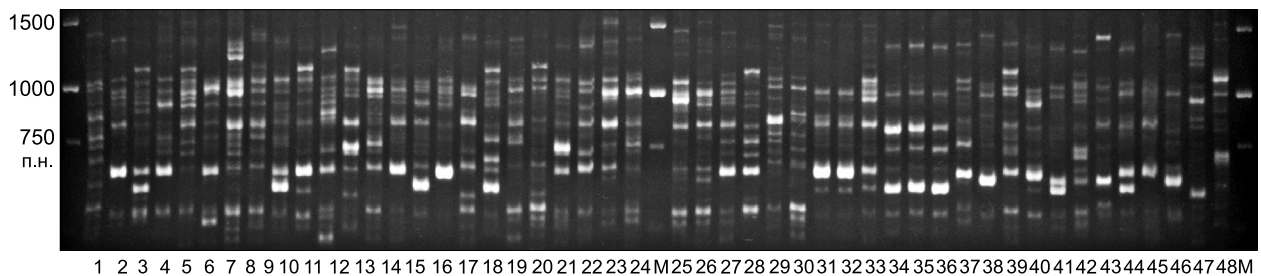


Рис. 1. Электрофореграмма межмикросателлитных повторов (ISSR) геномной ДНК видов рода *Trollius*, полученная при амплификации с праймером 17898B.

гласно уравнению A. Pevost, M. Wilkinson (1999): $Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$, где p – доля образцов, содержащих данный маркер. Разрешающая сила праймеров (Resolving power, Rp) была определена по формуле: $Rp = \sum Ib$.

Анализ методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и построение дендрограммы методом Neighbor-Joining выполнены с помощью PAST (Hammer et al., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе главных компонент в изучаемом родовом комплексе выявлены три дивергентные группы, при этом европейская, представленная видом *T. europaeus* L., отделяется наиболее четко от остальных. Дальневосточная группа включает виды: *T. ledebourii* Rchb., *T. riederianus* Fisch. et C.A. Mey, *T. chinensis* Bunge (рис. 2). Ее представители географически занимают территорию от Камчатки до Юго-Восточного Забайкалья. Сибирская группа представлена видами: *T. altaicus* C.A. Mey, *T. asiaticus* L., *T. apertus* Perfil. ex Igoschina, *T. kytmanovii* Reverd., *T. sajanensis* (Malyshev) Sipliv. Аналогичная топология наблюдалась при анализе генетической структуры рода (рис. 3): гипотетическое число K (при $2 \leq K \leq 17$) равно 4, где один кластер соответствует родовой дифференциации внешней группы и три соответствуют эколого-географической дивергенции внутри родового комплекса. Диагностические молекулярные маркеры для этих географических групп не установлены.

Разделение образцов на генетические классы проводили с помощью программы Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Earl, vonHoldt, 2012) при тестировании K от 1 до 17 с помощью Markov chain Monte Carlo simulations при использовании 100 тыс. итераций и 500 тыс. burn-in-генераций. Выбор оптимального значения K был осуществлен при расчете ΔK с помощью on-line приложения Structure Harvester (Evanno et al., 2005).

Полученные данные показывают, что Республика Бурятия и южные районы Забайкалья являются областями смешанного распространения сибирской и дальневосточной групп видов *Trollius*. Согласно гербарным образцам (LE, NSK) и экспедиционным сборам лаборатории Гербарий ЦСБС, *T. asiaticus* произрастает в Южном Забайкалье и Монголии, где соседствуют с видами дальневосточной группы, однако интрогрессия между ними не зарегистрирована. Кроме того, совместное выращивание сибирских и дальневосточных видов на коллекционном участке ЦСБС выявило их расхождение по феноритмотипам, делающее невозможным явления ауткроссинга (Буглова, 2011). По литературным данным, возможна только искусственная гибридизация между дальневосточными видами и представителями других секций без возвратного скрещивания (Doroszevska, 1965), что свидетельствует об их значительной дивергенции.

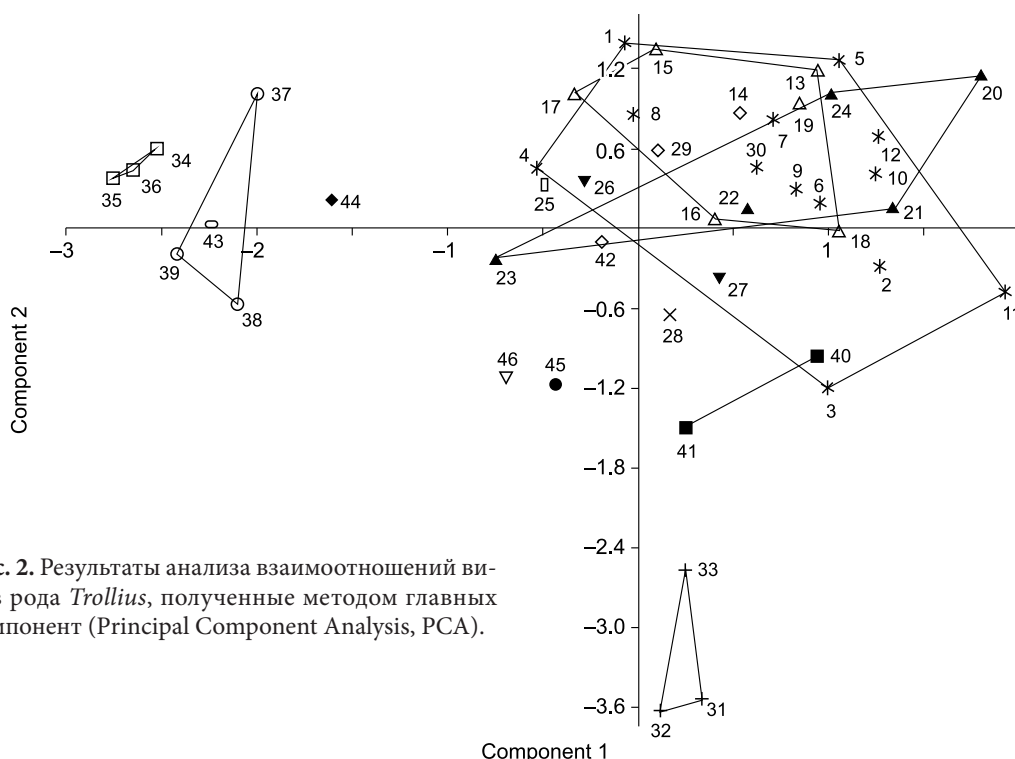


Рис. 2. Результаты анализа взаимоотношений видов рода *Trollius*, полученные методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA).

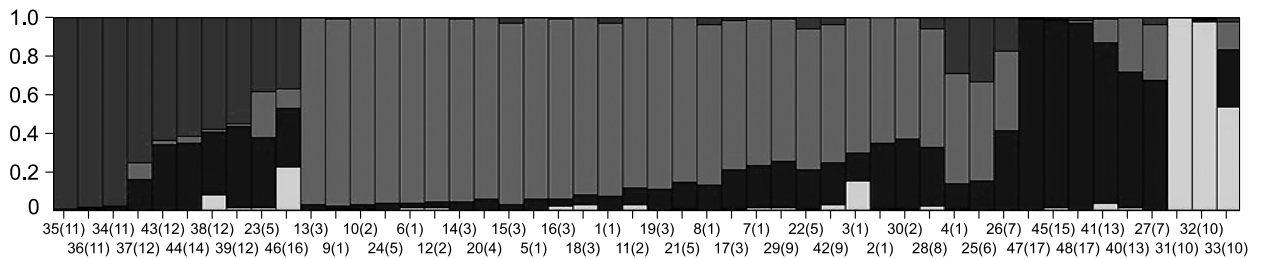


Рис. 3. Структура распределения генотипов по генетическим кластерам (апостериорная вероятность) при $K = 4$. По оси X – номера объектов (вид), по оси Y – доля частот соответствующего кластера.

Генотипирование с помощью ISSR-маркеров не прояснило пространственные закономерности внутри сибирской группы видов. Наиболее распространенный в Западной и Восточной Сибири *T. asiaticus* обладает ярко выраженным полиморфизмом, который отражается при анализе главных компонент в виде большого полигона (см. рис. 2). Однако попытки выделения подвидов и разновидностей в пределах этого вида на основании морфологических данных (Ревердатто, 1943; Егорова, Сипливинский, 1969) не получили поддержки при более поздних обработках рода ввиду отсутствия четких переходов и наличия большого количества популяций со смешанными признаками (Фризен, 1993; Черепанов, 1995; Малышев, 2012; Li, Tamura, 2001). Нами также не выявлено каких-либо ассоциаций при анализе образцов этого вида (см. рис. 2). Типизация морфологических критериев и, возможно, привлечение большего количества маркеров при генетическом анализе остаются актуальными для изучения внутривидового разнообразия *T. asiaticus*.

На графике главных компонент образцы сибирской группы, морфологически соответствующие и определяемые как *T. altaicus*, *T. kytmanovii*, *T. sajanensis*, *T. sibiricus* Schipcz, почти полностью располагаются в пределах полигона *T. asiaticus*, что объясняется устойчивыми процессами интрогрессии. Кластерный анализ (см. рис. 3) и генетическая структура рода (рис. 4) имеют сходную топологию: на дендрограмме все виды образуют родственные клады с *T. asiaticus*, наиболее тесные взаимоотношения для пары *T. asiaticus*–*T. altaicus* ($D = 0.091$). Можно с уверенностью сказать, что виды *T. asiaticus* и *T. altaicus* генетически близки. Хотя вид *T. altaicus* по достаточно большому комплексу морфофизиологических особенностей отличается от *T. asiaticus*, и его самостоятельность не вызывает сомнений, в отдельных случаях численные значения генетических расстояний между особями этих таксонов близки к таковым для представителей семенного потомства (№ 34–36). Близость этих видов подтверждается и кластерным анализом – их распределением главным образом по двум кладам,

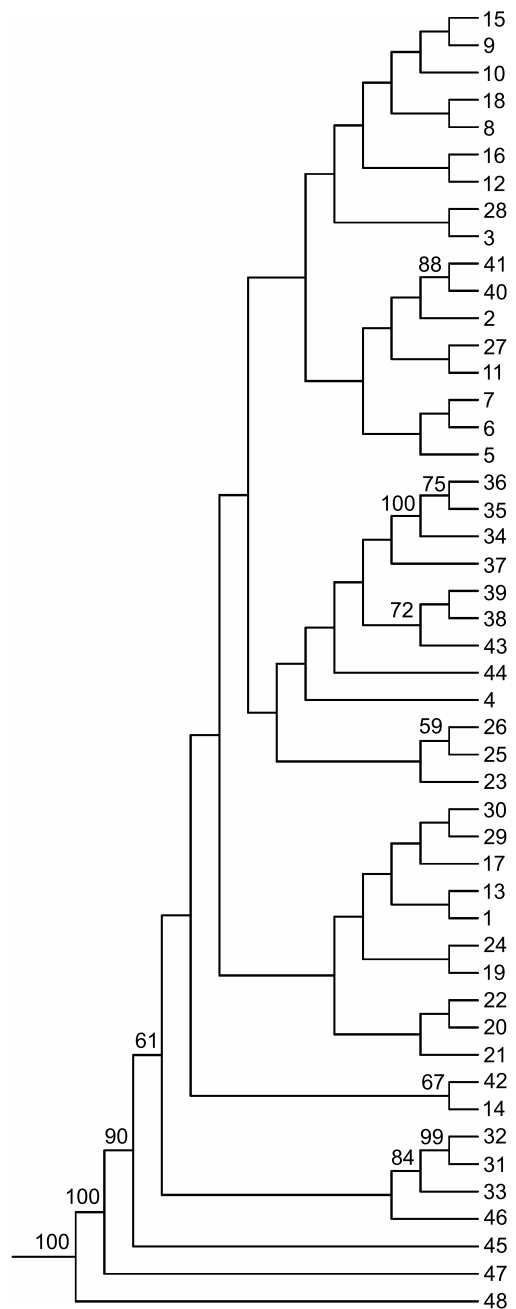


Рис. 4. Дендрограмма, построенная методом Neighbor-Joining и отражающая взаимоотношения видов рода *Trollius*. В узлах дендрограммы указана величина бутструп-поддержки, превышающая 50 %.

А и С, что может свидетельствовать о тесных эволюционных связях и наличии популяций, состоящих из гибридных растений. Слабая географическая изоляция способствует довольно глубокому генетическому дрейфу. Так, например, образец № 13, морфологически соответствующий *T. altaicus*, произрастает на расстоянии около 700 км от генетически близких образцов № 1 и 5 (*T. asiaticus*).

Данные ISSR-маркирования не выявили какой-либо специфичности у образцов с хр. Ергак-Таргак-Тайга, где был описан новый вид *T. vitalii* (Степанов, 1994). Растения, собранные с этого хребта, морфологически неоднородны: три образца (№ 10–12) находятся в пределах изменчивости *T. asiaticus*, а № 30 имеет более короткие лепестки и более длинные носики. Анализ генетической структуры (см. рис. 4) показывает их гибридное происхождение и близость с образцом гибридного происхождения с нагорья Сангилен (№ 29). Все растения с хр. Ергак-Таргак-Тайга также генетически родственны *T. altaicus*. Подобные молекулярные данные согласуются с выводами Д.Н. Шауло (2006), что в горных регионах Республики Тыва (в частности – на Западном Саяне и нагорье Сангилен) происходит формирование экоморф, не стабильных на данном этапе обособления. По нашим данным, они имеют сложное гибридное происхождение. Образцы, которые определены коллегами как *T. sajanensis*, включая те, которые по комплексу признаков не полностью соответствуют видовым и переопределены нами как гибриды от купальницы саянской (№ 20, 25, 29, 30), действительно имеют гибридное происхождение. Это позволяет выдвинуть гипотезу о происхождении многих популяций, морфологически соответствующих *T. sajanensis*, от *T. asiaticus* × *T. kytmanovii* × *T. altaicus* с наличием в природе возвратной гибридизации.

Генетическая гетерогенность установлена и для образцов, морфологически соответствующих *T. kytmanovii* (см. рис. 2). Большая их часть расположена в пределах правой части полигона *T. asiaticus*. На дендрограмме (см. рис. 3) наиболее близки ему *T. sajanensis*, *T. sp. kytmanovii* × *T. sajanensis* (№ 25 и 26), хотя и с относительно большим индексом бутстрепа – 59 %. Образцы № 21, 23 соотносятся с разными структурными кластерами (см. рис. 4). Результаты молекулярного анализа позволяют выдвинуть гипотезу о гомоплазии – двойственном происхождении экземпляров, морфологически определяемых как *T. kytmanovii*:

1) прямое происхождение от *T. asiaticus* и впоследствии обособление по горным хребтам Южной и Центральной Сибири;

2) результат интрогрессии *T. asiaticus* × *T. sibiricus* в условиях частичной изоляции, но перио-

дическими беккроссами с тем или иным родительским видом.

Таким образом, ISSR-маркированием не удалось выявить дивергенцию между близкими видами сибирской группы, однако по литературным данным, другими молекулярными маркерами также не удалось дифференцировать близкие виды *Trollius* (Wang et al., 2009; Cai et al., 2010). Это объясняется интрогрессией между видами с наличием возвратного ауткроссинга. С помощью молекулярных методов, и ISSR в частности, устанавливается генетическое родство организмов, а не причины, его обеспечивающие. При интрогрессии молекулярные методы выявляют гибридное генетическое родство, которое частично нивелирует дивергенцию при формообразовательных процессах.

Установленное по морфологическим критериям гибридное происхождение вида *T. apertus* (*T. asiaticus* × *T. europaeus*) согласуется с полученными молекулярными данными (Игошина, 1968). Изученные образцы имеют большее родство с *T. asiaticus* ($D = 0.185$), чем с *T. europaeus* ($D = 0.245$), которое свидетельствует о более длительных возвратных скрещиваниях в природе с первым прародительским видом, чем со вторым. Однако это указывает только на географическое происхождение изучаемых растений с азиатской территории Урала (Сипливинский, 1972).

Эндемичный вид *T. vicarius* по морфологическим признакам и месту произрастания близок к *T. ledebourii*, однако молекулярные данные показали большие генетические расстояния между ними. Наибольшая генетическая дистанция отмечена для видов *T. sajanensis* и *T. vicarius* ($D = 0.428$). Представители этих видов собраны из соседних районов в Республике Бурятия и в Забайкалье, однако близкое родство и гибридизация для них не зарегистрированы. Большие генетические расстояния при относительно близком географическом произрастании видов свидетельствуют об их репродуктивной изолированности. Полученные данные не противоречат выделению *T. vicarius* в качестве самостоятельного вида.

Образцы *T. riederianus* имеют морфологические различия по важному в таксономическом отношении признаку – длине лепестков. Фенотип с лепестками около 1 см – равными или чуть длиннее тычинок, отличается по данному признаку от типовых образцов (LE), представлен образцом с о. Кунашир (№ 35). Делектусный образец, полученный как *T. riederianus*, имеет еще более длинные лепестки, более соответствующие *T. chinensis* Bunge (Луферов, 1995), и более яркую – оранжевую окраску чашелистиков, однако отличается от последнего по комплексу остальных видовых при-

знаков. На основании этого мы изменили их название на *T. sp. (riederianus)*. По молекулярным данным все экземпляры *T. riederianus* показали близкое родство, скорее, подтверждающее их принадлежность к одному виду. Если дальнейшие результаты подтвердят принадлежность всех популяций с разной длиной лепестков к одному виду, то таксономическая значимость признака “длина лепестков” будет нуждаться в переоценке.

Таким образом, результаты, полученные при ISSR-маркировании, позволяют анализировать не только объекты исследования, но и морфологические признаки. Распределение активно используемого в таксономии купальниц признака – “длина лепестков” – не согласуется с молекулярными данными. Установлено значительное генетическое расстояние между видами, имеющими сходные по размеру и форме лепестки: *T. europaeus*–*T. riederianus* ($D = 0.303$), а фактически во всех трех дивергентных группах – дальневосточной, сибирской и европейской – есть виды, у которых длина лепест-

ков короче тычинок. Наиболее вероятно, что длина лепестков эволюционировала в сторону уменьшения параллельно у разных видов уже после репродуктивного обособления каждой группы. Эти данные подтверждают выводы О. Пеллмуг (1992) о гомоплазии признака “длина лепестков”, который используется в таксономии.

Кроме того, ISSR-анализ позволяет выявить гибридизацию в популяциях, в которых видовая принадлежность, определяемая по морфологическим признакам, не вызывает двойного толкования. Это может иметь хозяйственное значение. Например, сбор материала из гибридных популяций для создания культурных площадей *Trollius* лекарственного назначения не рекомендуется, поскольку они будут проявлять высокий полиморфизм и изменчивость. И наоборот, создание коллекции для декоративного использования предпочтительнее из гибридных популяций, где больше шансов получить высокодекоративные формы при последующем расщеплении.

ВЫВОДЫ

1. Методом ISSR-маркирования с использованием четырех праймеров выявлено 116 фрагментов ДНК, из них 99 % полиморфных, что свидетельствует об их высокой разрешающей способности при анализе видов рода *Trollius*.

2. Изучаемые виды четко разделены на три генетически дивергентные группы по географическому признаку – европейскую, сибирскую и дальневосточную. Есть основания считать, что морфологический признак “длина лепестков” эволюционировал конвергентно в каждой репродуктивно обособленной группе.

3. Установлена генетическая близость видов *T. altaicus*, *T. asiaticus*, *T. kytmanovii*. Подтверждена интрогрессия между *T. altaicus* и *T. asiaticus*, а так-

же гибридное состояние части образцов, определяемых как *T. kytmanovii*, и практически всех, морфологически соцветующих *T. sajanensis*.

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллегам, которые предоставили образцы для молекулярных исследований: А.Ю. Астащенко, В.В. Бурому, В.М. Доронькину, Ю.В. Овчинникову, Н.В. Степанцовой, Т.И. Фоминой, И.В. Хан, а также О.Ю. Васильевой за ценные советы и рекомендации при написании статьи.

В статье использовались материалы Биоресурсной коллекции ЦСБС СО РАН, УНУ “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, USU 440534.

ЛИТЕРАТУРА

- Буглова Л.В. Ритмы цветения некоторых видов *Trollius* L. в условиях Новосибирска // Науч.-практ. журн. Вестн. ИрГСХА. 2011. Вып. 44, № 3. С. 35–41.
- Грушецкая З.Е., Никитинская Т.В., Кубрак С.В., Дзюбан О.В., Кухарева Л.В., Титок В.В., Лемеш В.А., Парфенов В.И., Хотылева Л.В. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений // Вестн. БГУ. Сер. 2. Химия. Биология. География. 2013. Т. 2, № 3. С. 50–56.
- Егорова Т.В., Сипливинский В.Н. Флористические находки в северо-западном Прибайкалье // Новости сист. высш. раст. Л., 1969. Т. 6. С. 223–254.
- Звягина Н.С., Дорогина О.В. Генетическая дифференциация алтае-саянского эндемика *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) по данным межмикросателлитного анализа геномной ДНК // Генетика. 2013. Т. 49, № 10. С. 1–7. doi: 10.7868/S0016675813100135
- Зиман С.Н. Морфология и филогения семейства лютиковых / С.Н. Зиман. Киев, 1985. 248 с.
- Игошина К.Н. О видах рода *Trollius* на Полярном Урале // Бот. журн. 1968. Т. 53, № 6. С. 779–794.
- Кашин А.С., Крицкая Т.А., Шанцер И.А. Генетический полиморфизм *Tulipa gesneriana* L. по данным ISSR маркирования // Генетика. 2016. Т. 52, № 10. С. 1134–1145. doi:10.1134/S1022795416100045

- Луферов А.Н.** Купальница – *Trollius* L. // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. СПб., 1995. Т. 7. С. 15–21.
- Мальшев Л.И.** Семейство *Ranunculaceae* // Конспект флоры Азиатской России: сосудистые растения / под ред. К.С. Байкова. Новосибирск, 2012. С. 20–35.
- Повыдыш М.Н., Петрова Н.В., Медведева Л.И., Орлова Т.А.** Сем. *Ranunculaceae* // Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб.; М., 2008. С. 24–67.
- Полетико О.М.** Декоративные травянистые растения открытого грунта / О.М. Полетико, А.П. Мищенко. Л., 1967. 208 с.
- Ревердатто В.В.** Заметки о *Trollius* L. из Красноярского края // Сист. зам. по материалам Гербария им. П.Н. Крылова ТГУ. 1943. № 1. С. 1–2.
- Русанов Ф.Н.** Метод родовых комплексов в интродукции растений // Бюл. ГБС АН СССР. 1977. Т. 81. С. 15–20.
- Сипливинский В.Н.** Род *Trollius* L. на севере и востоке Азии // Новости сист. высш. раст. 1972. Т. 9. С. 163–182.
- Степанов Н.В.** Флорогенетический анализ (на примере северо-восточной части Западного Саяна) / Н.В. Степанов. Красноярск, 1994. 108 с.
- Фризен Н.В.** *Trollius* L. // Флора Сибири / под ред. Л.И. Малышева, Г.А. Пешковой. Новосибирск, 1993. Т. 6. С. 103–108.
- Черепанов С.К.** Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С.К. Черепанов. СПб., 1995. 992 с.
- Шауло Д.Н.** Флора Западного Саяна // *Turczaninowia*. 2006. Т. 9, № 1–2. С. 1–338.
- Шейкина О.В., Прохорова А.А., Новиков П.С., Криворотова Т.Н.** Разработка методики идентификации клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной (*Picea abies* L.) с использованием ISSR маркеров // Науч. журн. КубГАУ. 2012. Т. 83, № 9. С. 1–14.
- Эрст А.А., Звягина (Нуждина) Н.С., Новикова Т.И., Дорогина О.В.** Клональное микроразмножение редкого вида *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) и оценка генетической стабильности регенерируемых растений с помощью ISSR-маркеров // Генетика. 2015. Т. 51, № 2. С. 188–193.
- Arslan E., Tamkoc A.** The application of ISSR-PCR to determine the genetic relationship and genetic diversity between narrow leaved bluegrass (*Poa angustifolia*) and rough bluegrass (*Poa trivialis*) accessions // *Turk. J. Biol.* 2011. V. 35. P. 415–423. doi:10.3906/biy-0912-31
- Cai Y.-F., Li S.-W., Liu Y., Sun Q., Chen M., Xie Y.-F., Jiang H.-Z., Wei E.-Z., Yin N.-W., Wang L., Zhang R., Huang C.-I., He X.-H., Jiang M.-F.** Molecular phylogeny of *Ranunculaceae* based on *rbc* L sequences // *Biologia*. 2010. V. 65, No. 6. P. 997–1003. doi: <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0105-8>
- DeYoung R.W., Honeycutt R.L.** The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management // *J. Wildlife Manag.* 2005. V. 69, No. 4. P. 1362–1384. doi: [http://dx.doi.org/10.2193/0022-541X\(2005\)69\[1362:TMTGTI\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2193/0022-541X(2005)69[1362:TMTGTI]2.0.CO;2)
- Doroszewska A.** Observations on the *Trollinus chinensis* × *T. europaeus* // *Acta Soc. Bot. Pol.* 1965. V. 34, No. 3. P. 451–569.
- Doroszewska A.** The genus *Trollius* L. a taxonomical study // *Monogr. bot.* 1974. V. 41. P. 1–184.
- Earl D.A., vonHoldt B.M.** Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method // *Cons. Genet. Res.* 2012. V. 4. P. 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno G., Regnaut S., Goudet G.** Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D.** PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontol. Electron.* 2001. V. 4. 9 p.
- Hoot S.** Phylogeny of the *Ranunculaceae* based on preliminary *atp* B, *rbc* L and 18S nuclear ribosomal DNA sequence data // *Plant Syst. Evol.* 1995. V. 9 (Suppl.) P. 241–251. doi: 10.1007/978-3-7091-6612-3_24
- Jensen U.** Serologische Beiträge zur Systematik der *Ranunculaceae* // *Bot. Jahrb. Syst.* 1968. V. 88. P. 204–310.
- Jensen U.** Serological legumin data and the phylogeny of the *Ranunculaceae* // *Plant Syst. Evol.* 1995. V. 9. P. 217–227. doi: 10.1007/978-3-7091-6612-3_22
- Jensen U., Hoot S.B., Johansson J.T., Kosuge K.** Systematics and phylogeny of the *Ranunculaceae* – a revised family concept on the basis of molecular data // *Plant Syst. Evol.* 1995. V. 9. P. 273–280. doi: 10.1007/978-3-7091-6612-3_27
- Li Y., Ding W.L.** Genetic diversity assessment of *Trollius* accessions in China by RAPD markers // *Biochem. Genet.* 2010. V. 48, No. 1–2. P. 34–43. doi: 10.1007/s10528-009-9290-y. Epub 2009 Oct
- Li L.Q., Tamura M.** *Trollius* L. // *Flora of China* / Z.Y. Wu, P.H. Raven, D.Y. Hong (Eds.). Beijing, 2001. V. 6. P. 137–142.
- Miller M.P.** Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) Version 1.3: a Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. 1997. NAU Flagstaff. 30 p.
- Nei M.** Genetic distance between populations // *Am. Nat.* 1972. V. 106, No. 949. P. 283–292. doi: 10.1086/282771
- Pellmyr O.** The phylogeny of a mutualism: evolution and coadaptation between *Trollius* and its seed-parasitic pollinators // *Biol. J. Linnean Soc.* 1992. V. 47. P. 337–365. doi: 10.1111/j.1095-8312.1992.tb00674.x
- Pharmawati M., Yan G., McFarlane I.J.** Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae) // *Australian Syst. Bot.* 2015. V. 17. P. 49–61. doi: 10.1071/SB03016

- Prevost A., Wilkinson M.** A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // *Theor. Appl. Genet.* 1999. V. 98. P. 107–112. doi: 10.1007/s001220051046
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.** Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155. P. 945–959.
- Wang W., Lu A.-M., Ren Y., Endress M.E., Chen Z.-D.** Phylogeny and classification of Ranunculales: evidence from four molecular loci and morphological data // *Persp. Plant Ecol. Evol. Syst.* 2009. V. 11, No. 2. P. 81–110.
- Wang S., Tian Q., An F.** Growth inhibition and apoptotic effects of total flavonoids from *Trollius chinensis* on human breast cancer MCF-7 cells // *Oncology Letters*. 2016. V. 12, No. 3. P. 1705–1710. doi: 10.3892/ol.2016.4898
- Zhang L., Zhou Y., Ding C., Yang R., Liu S.** Genetic variation of the genus *Kengyilia* by ISSR markers // *Front. Biol. China*. 2008. V. 3, No. 2. P. 170–175. doi: 10.1007/s11515-008-0022-1
- Zvyagina (Nuzhdina) N.S., Dorogina O.V., Catalan P.** Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae) // *Biochem. Syst. Ecol.* 2016. V. 69. P. 176–187.