

УДК 575.22:575.17:582.736

Т.Е. Крамина, И.Г. Мещерский, М.М. Белоконов, И.А. Шанцер

T.E. Kramina, I.G. Meschersky, M.M. Belokon, I.A. Schanzer

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИДОВ СЕКЦИИ *LOTUS* РОДА *LOTUS* (LEGUMINOSAE) В АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ И НА СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ПО ДАННЫМ ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ *TRNL-TRNF* ХП ДНК

GENETIC VARIABILITY OF SPECIES OF THE GENUS *LOTUS* SECTION *LOTUS* (LEGUMINOSAE) IN ASIAN PART OF RUSSIA AND ADJACENT TERRITORIES AS INFERRED FROM NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS AND PLASTID *TRNL-TRNF* DNA MARKERS

В популяциях видов комплекса *Lotus corniculatus* с территории Северной Евразии изучена генетическая изменчивость по составу аллелей в восьми микросателлитных локусах ядерной ДНК и по полиморфизму последовательностей участка *trnL-F* хлоропластной ДНК. Основное внимание уделено диплоидным видам: европейским *Lotus tenuis* и *L. stepposus*, евразийскому *L. frondosus* и азиатскому *L. krylovii*. Данные по генетическому разнообразию проанализированы и обсуждены в географическом и таксономическом контексте.

Род *Lotus* (лядвенец) – крупнейший род трибы *Loteae* семейства бобовые, объединяющий 120–130 видов, распространенных в Европе, Макаронезии, Африке, Азии, Австралии и на островах Тихого океана. Род включает ряд проблемных в таксономическом отношении групп. Разработка таксономии в роде *Lotus* осложнена наличием полиплоидии и гибридизации, приводящих к размыванию видовых границ между некоторыми видами. Молекулярно-филогенетические исследования рода *Lotus* и близких родов (Allan et al., 2003, 2004; Degtjareva et al., 2006, 2008), основанные на участке внутреннего транскрибируемого спейсера (*ITS-1-2*) рибосомальной ядерной ДНК (ядДНК), позволили разрешить лишь часть таксономических вопросов.

Секция *Lotus* – одна из наиболее проблематичных внутри рода. Секция объединяет около 30 видов однолетних и многолетних травянистых растений, распространенных на обширной территории в Старом Свете. Ряд видов секции, преимущественно из родства *Lotus corniculatus*, имеют вторичные ареалы на всех континентах, кроме Антарктиды. Таким образом, эта секция обладает наиболее широким географическим ареалом среди всего рода *Lotus*. Секция *Lotus* включает пять видовых групп: 1) наиболее крупную и сложную в таксономическом отношении группу *Lotus corniculatus*, 2) монотипную группу *Lotus conimbricensis*, 3) группу *Lotus angustissimus*, 4) группу *Lotus pedunculatus*, 5) группу *Lotus parviflorus*. Монофилию секции в таком составе подтверждает маркер *5'ETS* (внешний транскрибируемый спейсер) яДНК, а маркер *ITS-1-2* выделяет две монофилетические группы (1+2+3+4 и 5), тогда как набор из двух пластидных маркеров (спейсер *psbA-trnH* и интрон *rps16*) разделяет секцию на две монофилетические клады (1+2 и 3+4+5) (Kramina et al., неопубликованные данные).

До настоящего времени наиболее полно в роде *Lotus* (и секции *Lotus*, в частности) был изучен маркер *ITS-1-2* яДНК. Он показал, что группа *Lotus corniculatus* выделяется как высоко поддерживаемая монофилетическая клада, однако внутри группы этот маркер не позволяет разрешить взаимоотношения между видами. Наблюдается лишь тенденция к географической и таксономической дифференциации. Очевидно, что для анализа генетической структуры видов этой группы необходимы более быстро эволюционирующие маркеры.

Цель настоящего исследования – оценить генетическую структуру комплекса *Lotus corniculatus* в Северной Евразии с использованием подходящих молекулярных маркеров для прояснения эволюционной истории этой группы и решения таксономических вопросов.

Нами были выбраны два типа молекулярных маркеров: микросателлиты ядерной ДНК и последовательности *trnL-F* хлоропластной ДНК (хпДНК). Ядерные микросателлиты – участки tandemных повторов

с мотивом 2-6 п.о. Это кодоминантные маркеры, характеризующиеся бипарентальным наследованием, высокой мутационной активностью и обычно таксонспецифичностью. Вторым маркером, *trnL-F* хпДНК (Taberlet et al., 1991), широко применяется в молекулярно-филогенетических, филогеографических и популяционно-генетических исследованиях по разным таксонам растений.

Материалы и методы

Материалом для микросателлитного исследования послужили выборки из 17 локальных популяций диплоидных видов группы *Lotus corniculatus*: *L. tenuis* (1 популяция из Херсонской обл. Украины), *L. frondosus* (5 популяций из юго-восточной части Украины, Ниж. Поволжья и Туркмении), *L. krylovii* (5 популяций из Казахстана, Алтайского края и Монголии), *L. stepposus* (6 популяций из юго-восточной части Украины и Ниж. Поволжья). Генотипировано по 16 или 8 образцов на популяцию (общий объем выборки $n = 192$). Для анализа отобраны 8 микросателлитных локусов, известных, как распределенные по хромосомам гаплоидного набора *Lotus japonicus*: TM0113 – хромосома 1, TM0035, TM0127 – хромосома 3, TM0030 – хромосома 4, TM0186 – хромосома 5, TM0014, TM0055, TM0139 – хромосома 6 (Kai et al., 2010).

Для филогеографического анализа группы *Lotus corniculatus* по участку *trnL-F* число локалитетов было увеличено до 58 (в каждом изучено от 1 до 4 образцов). В исследование также включены 9 представителей остальных групп секции *Lotus* (групп *Lotus angustissimus*, *L. pedunculatus*, *L. parviflorus* и *L. conimbricensis*) и в качестве внешней группы – *Lotus fulgurans*, представитель секции *Dorycnium*. Всего изучено 112 последовательностей, из которых 102 относятся к группе *Lotus corniculatus*.

Выделение ДНК проводили из высушенных листьев набором Nucleospin Plant (Macherey Nagel).

Подбор праймеров к микросателлитным локусам проводился по литературе (Kai et al., 2010). ПЦР проводили с использованием флуоресцентно-меченых праймеров, синтезированных в НПК Синтол. Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполняли на секвенаторе 3500 Genetic Analyzer в присутствии размерного стандарта GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems). Полученные спектрограммы обрабатывали в программе GeneMapper. Затем совокупность значений длин фрагментов вручную разделяли на дискретные классы – аллели, в соответствии с ожидаемым размером тандемного повтора. Обработку данных проводили в программах GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006), Arlequin v.3.1 (Excoffier et al., 2005), STRUCTURE ver. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).

Для анализа хлоропластных последовательностей *trnL-F* у видов *Lotus* ПЦР с праймерами, синтезированными в ЗАО Евроген, проводили по отработанной методике (Valiejo-Roman et al., 2002). ПЦР-продукты очищали набором Cleanup Standard (ЗАО Евроген). Секвенирование проводили на секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), используя ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v. 3.1. Секвенировали прямые и обратные последовательности. Последовательности выравнивали вручную в программе BioEdit (Hall, 1999). Индели были включены в анализ после кодирования методом простой кодировки (Simmons et al., 2001) в программе GapCoder (Young & Healy, 2003). Далее строили сеть гаплотипов в программе TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000).

Результаты

Микросателлитный анализ

Микросателлитный анализ по 8 локусам показал, что все изученные популяции и все диплоидные виды (*L. tenuis*, *L. frondosus*, *L. krylovii*, *L. stepposus*) достоверно отличаются друг от друга по частотам аллелей. Согласно матрице генетических дистанций (Fst), наиболее удалены от других популяций и друг от друга популяции *L. krylovii* из Алтайского края и Монголии. Напротив, шесть популяций *L. stepposus* наиболее близки друг другу.

Основные параметры генетического разнообразия 17 изученных популяций диплоидных видов приведены в таблице. Представлены: объем выборки (N), доля (%P) полиморфных локусов из 8 изученных, среднее генное разнообразие (GD), среднее число аллелей на локус (Na), наблюдаемая (No) и ожидаемая (He) гетерозиготность. Показатели генетического разнообразия варьируют как между видами, так и между отдельными популяциями в пределах вида. Однако в целом можно отметить, что наиболее полиморфными оказались популяции европейских видов *L. tenuis* и *L. stepposus*. Для них характерны высокий процент полиморфных локусов (75–100 %) и высокое среднее генетическое разнообразие (обычно выше 0,6, кроме популяции VB). Также довольно высоки эти показатели для популяции *L. frondosus* из Туркмении (87,5 % и 0,53, соответственно). В остальных популяциях *L. frondosus* и во всех популяциях *L. krylovii* генетическое разно-

Таблица

Параметры генетического разнообразия изученных популяций диплоидных видов *Lotus*. Пояснения в тексте

	Вид	Популяция	Регион, страна	N	%P	GD	Na	Ho	He	Гаплотипы trnL-F
1	<i>L. tenuis</i>	GER	Херсон. обл. (Украина)	16	100 %	0,626	5,375	0,501	0,647	A
2	<i>L. frondosus</i>	BEL1	Донецкая обл. (Украина)	16	62,5 %	0,196	2,4	0,338	0,274	D
3	<i>L. frondosus</i>	SN	Волгоград. обл.	8	62,5 %	0,208	2,167	0,321	0,291	D-2
4	<i>L. frondosus</i>	SR	Волгоград. обл.	8	37,5 %	0,114	2,333	0,333	0,303	D
5	<i>L. frondosus</i>	DO	Волгоград. обл.	8	37,5 %	0,204	3,25	0,295	0,513	D, D-1
6	<i>L. frondosus</i>	PAR	Туркмения	16	87,5 %	0,53	3,75	0,392	0,546	E
7	<i>L. krylovii</i>	SEL	Алтайский край	16	62,5 %	0,235	3,4	0,275	0,377	E, E-1
8	<i>L. krylovii</i>	SH	Алтайский край	8	37,5 %	0,385	2,714	0,375	0,440	E
9	<i>L. krylovii</i>	KAR	Зап. Казахстан	16	50 %	0,246	4,5	0,391	0,492	E
10	<i>L. krylovii</i>	MUN	Монголия	8	0 %	0				E
11	<i>L. krylovii</i>	UBS	Монголия	8	25 %	0,11	2	0,500	0,383	E
12	<i>L. stepposus</i>	S	Волгоград. обл.	8	75 %	0,443	2,667	0,75	0,59	C-2
13	<i>L. stepposus</i>	KON	Донецкая обл. (Украина)	16	100 %	0,677	5	0,625	0,677	C-2, C-3
14	<i>L. stepposus</i>	MAR	Донецкая обл. (Украина)	8	100 %	0,639	3,875	0,656	0,639	C-3
15	<i>L. stepposus</i>	VB	Волгоград. обл.	8	87,5 %	0,441	2,571	0,607	0,504	B-3, B-4, B-5
16	<i>L. stepposus</i>	H	Донецкая обл. (Украина)	16	100 %	0,642	5,25	0,706	0,648	C-5
17	<i>L. stepposus</i>	SB	Донецкая обл. (Украина)	8	87,5 %	0,639	4	0,779	0,647	C-2, C-5

образии снижается и достигает минимума в двух популяциях лядвенца Крылова из Монголии, число полиморфных локусов в которых составляет 0–25 %, а среднее генное разнообразие – 0,00–0,11.

Анализ молекулярной изменчивости AMOVA четырех групп популяций (соответствующих видам) показал, что доля межпопуляционной изменчивости в пределах каждого вида (около 35 %) превышает долю межвидового варьирования (18 %). Наибольшую долю изменчивости составляет внутривидовая (более 44 %).

Трехмерная диаграмма разброса, отражающая распределение образцов по четырем видовым кластерам в соответствии с частотами аллелей, построена в программе GenAlex ver. 6.5 (рис. 1). Диаграмма показывает четкое разделение видов лишь с незначительным перекрытием облаков, соответствующих *L. frondosus* и *L. krylovii*.

Байесовский анализ в программе Structure ver. 2.3.4 показал возможность нескольких вариантов кластеризации в пределах общей совокупности индивидуальных генотипов, в зависимости от выбранной модели. Наиболее подходящей для наших данных оказалась модель генетического смешения с поправкой на локальную приуроченность образцов (admixture-locprior). При применении этой модели наиболее вероятно, что наш массив данных состоит из семи отдельных кластеров, при этом в большинстве вариантов счета виды *L. tenuis* и *L. stepposus* составляли два отдельных видовых кластера, а каждый из видов *L. frondosus* и *L. krylovii* распадался на две или три группы. Один из вариантов кластеризации представлен на рис. 2, где исследованные популяции обозначены порядковыми номерами, указанными в таблице.

Анализ последовательностей trnL-F

Длина выравнивания составила 841 позицию. Общее число варьирующих сайтов 132, без учета отличий от внешней группы – 91. Внешняя группа, вид *Lotus fulgurans* из секции *Dorycnium*, отличается от изучаемой группы двумя протяженными инделями (делецией в 21 п.о. и вставкой в 20 п.о.). Еще четыре длинных инделя (6, 14, 2–6 и 10 п.о.) отличают группу *Lotus corniculatus* от трех других групп секции *Lotus* (*Lotus angustissimus*, *Lotus pedunculatus* и *Lotus subbiflorus*). Между собой эти группы также хорошо различимы несколькими мононуклеотидными заменами. Четвертая монотипная группа, *Lotus conimbricensis*, более близка к группе *Lotus corniculatus* и отличается от нее лишь тремя длинными инделями из четырех (6, 2–6 и 10 п.о.).

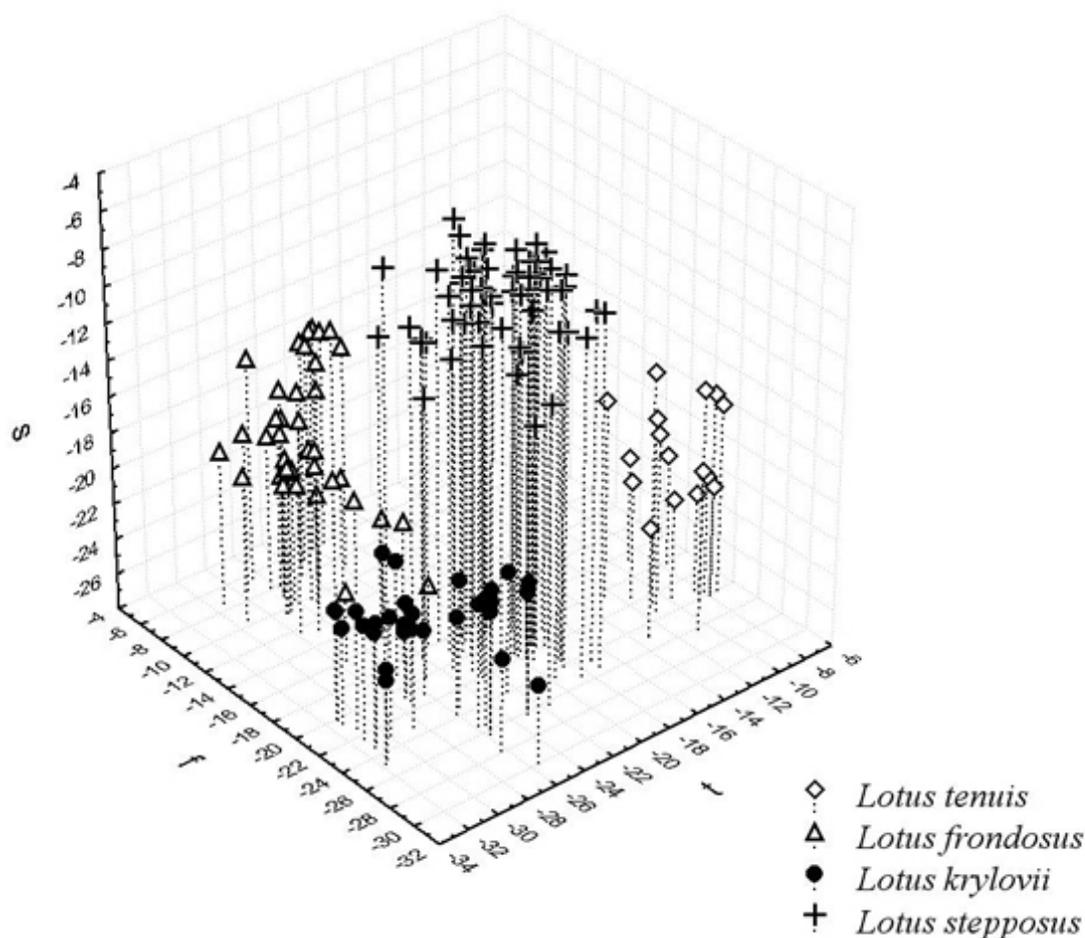


Рис. 1. Диаграмма разброса, отражающая распределение образцов по четырем видовым кластерам в соответствии с частотами аллелей восьми микросателлитных локусов, построенная в программе GenAlex ver. 6.5.

Исследование участка *trnL-trnF* в программе TCS v.1.21 показало, что изученные 112 последовательностей образуют одну сеть и относятся к 36 гаплотипам, обозначенным буквами с цифровыми индексами (рис. 3). Гаплотипы H, I, J, K и L относятся к видам внешней группы (*L. fulgurans* (L) и четырем группам секции *Lotus* (H-K)). Остальные гаплотипы относятся к группе *Lotus corniculatus*. В участке сети группы *Lotus corniculatus* выявлены три замкнутые петли, которые несколько затрудняют интерпретацию эволюционных преобразований в участке *trnL-F*.

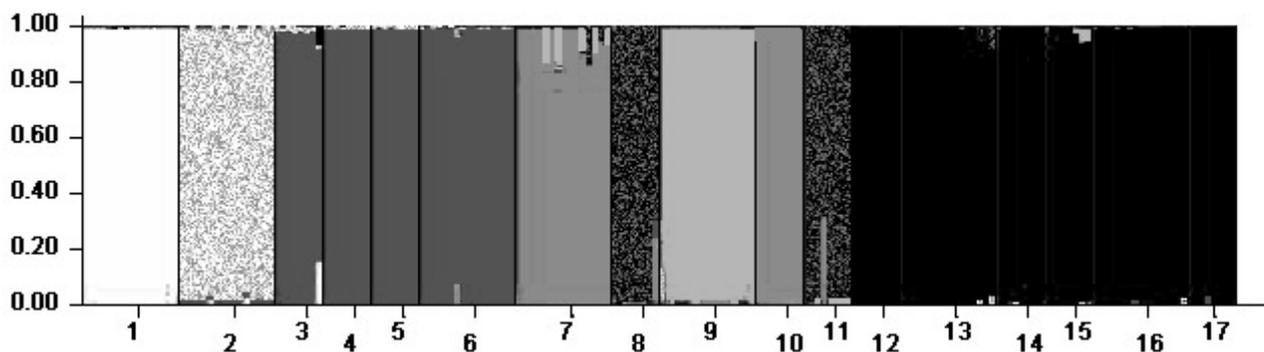


Рис. 2. Результаты Байесовского анализа данных по микросателлитам в программе Structure ver. 2.3.4. для числа кластеров $K=7$. Для каждого образца показана апостериорная вероятность отнесения к кластерам. Номера популяций (1 – 17), отмеченные на графике, взяты из первой колонки таблицы.

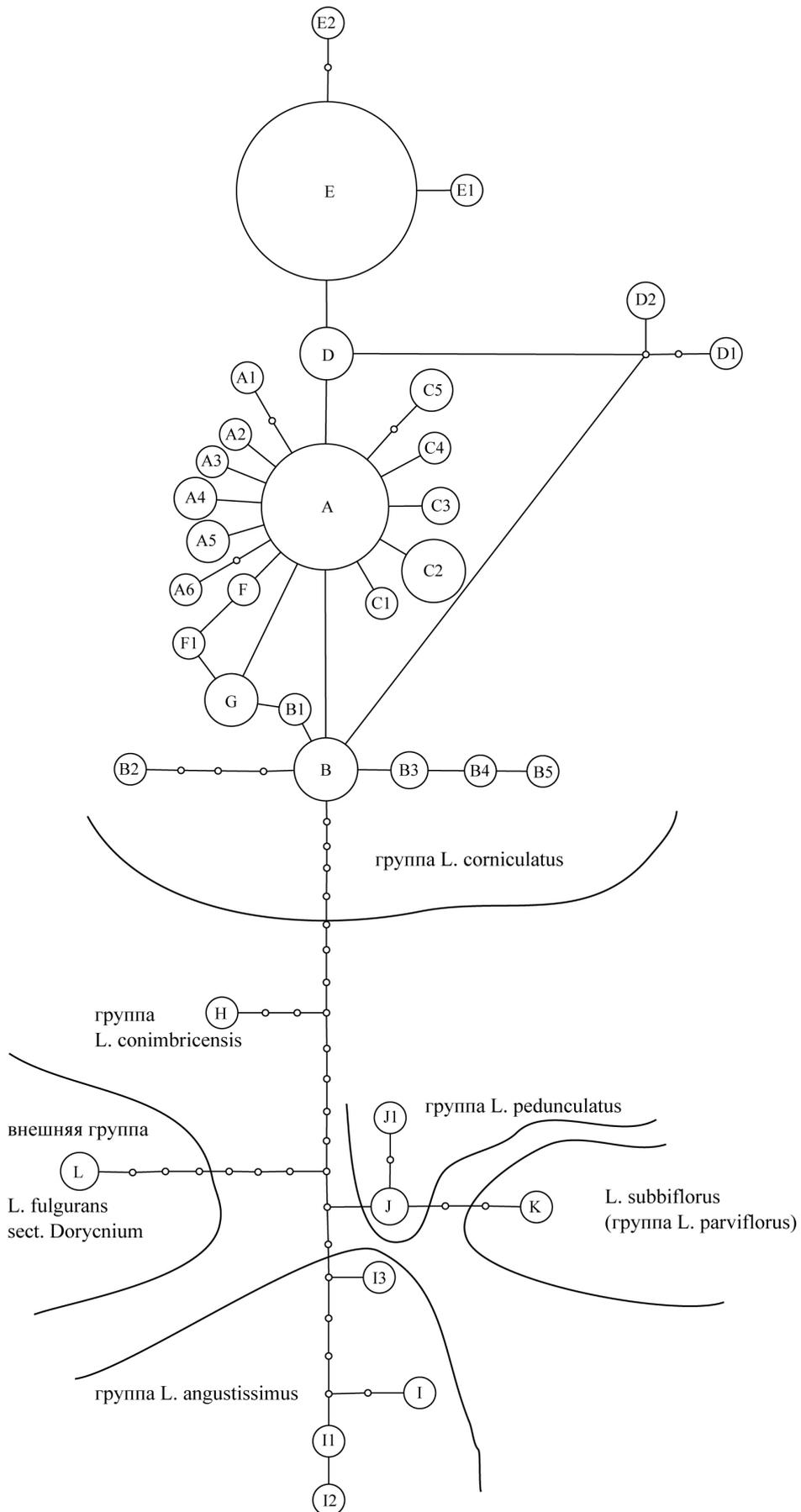


Рис. 3. Сеть гаплотипов, построенная на основе анализа 112 последовательностей trnL-trnF хпДНК в программе TCS v.1.21.

Центральное положение в сети занимает гаплотип А, отмеченный у многих европейских видов (диплоидов *L. tenuis* и *L. borbasii*, тетраплоидов *L. corniculatus* и *L. ucrainicus* и некоторых предположительно гибридных образцов). От него возникли многочисленные близкие гаплотипы, отличающиеся одной или двумя мутациями. Среди них гаплотипы, обозначенные буквой А, относятся к видам-тетраплоидам европейского распространения *L. corniculatus* и *L. ucrainicus* и одному европейскому виду-диплоиду *L. borbasii*, а обозначенные буквой С – к распространенному на ЮВ Украины и в Нижнем Поволжье диплоидному виду *L. stepposus*.

Гаплотип D характерен для тетраплоидного вида *L. ucrainicus* и диплоидного *Lotus frondosus*. Близкие к нему гаплотипы D1 и D2 также относятся к *L. frondosus*. Этот вид спорадически встречается на юго-востоке Украины, в Ниж. Поволжья и в Туркмении, но его ареал не идет далеко ни в Европу, ни в Азию. Возможно, *L. frondosus*, как и *L. ucrainicus*, представляет собой таксон гибридной природы, однако, с другой стороны, он может представлять и пример неполной сортировки линий. От гаплотипа D, по-видимому, образовался гаплотип E и его производные (E-1 и E-2), характерные для широко распространенного в Южной Сибири, республиках Средней Азии, Монголии и Китае диплоидного вида *L. krylovii*. Интересно то, что за исключением двух образцов из Казахстана и равнинного Алтая, все остальные 27 образцов этого вида, собранные широко по ареалу, имеют один и тот же гаплотип E.

Близким и, возможно, производным от А является гаплотип В, представленный у видов-тетраплоидов *L. corniculatus* и *L. ucrainicus*. Связанные с ним гаплотипы В-1 и В-2 также принадлежат *L. corniculatus*, но при этом гаплотипы В-3–В-5 отмечены у *Lotus stepposus*. Таким образом, мы видим генетическую неоднородность и политопность возникновения последнего из перечисленных видов.

Наконец, 5 изученных образцов японского диплоида *L. japonicus* характеризуются гаплотипом G, связанным с гаплотипами А, В-1 (*L. corniculatus*) и F-1 (известным для европейского диплоида *L. tenuis*), а не с E, E1, E2, свойственными центрально- и восточноазиатскому *Lotus krylovii*.

Обсуждение

Имеющиеся морфолого-географические и молекулярно-филогенетические данные свидетельствуют о том, что секция *Lotus*, по-видимому, имеет средиземноморские корни. Группа *Lotus corniculatus*, по крайней мере ее центрально- и восточноевропейские и азиатские представители, – одна из эволюционно молодых ветвей секции *Lotus*. Как показали результаты анализа микросателлитов и последовательностей *trnL-F* хпДНК, популяции европейских видов, таких как *L. tenuis* и *L. stepposus*, характеризуются достаточно высоким генетическим разнообразием. По мере распространения представителей комплекса *Lotus corniculatus* из Центральной Европы в северном и восточном направлении и смены одних диплоидных видов другими, генетическое разнообразие в популяциях представителей этого комплекса постепенно снижается. Восточных пределов естественного ареала группы в Евразии достигают лишь немногие генетические линии.

Быстро эволюционирующие микросателлитные маркеры показывают, что в Южной Сибири и Монголии популяции произрастающего там вида *L. krylovii* представляют собой генетически изолированные группы, достаточно однородные внутри себя. Однако морфологический анализ этого материала не позволяет, несмотря на изменчивость, выделить внутри *L. krylovii* отдельные более мелкие виды. Хлоропластный маркер *trnL-F*, по-видимому, более медленно эволюционирующий, показывает почти полную генетическую однородность изученных образцов *L. krylovii*, собранных с обширной географической территории, что может свидетельствовать о сравнительно недавнем ее заселении.

Lotus frondosus, распространенный на востоке Европы и в западной части Центральной Азии, в отличие от предыдущего вида, характеризуется разнообразием хлоропластных гаплотипов, что может свидетельствовать о его участии в гибридизационных процессах. Это подтверждается наличием у него общих гаплотипов с европейскими (*L. tenuis*, *L. stepposus* и др.) и азиатскими (*L. krylovii*) представителями группы. Другим объяснением может быть то, что популяции *L. frondosus* могут быть примером сохранения древнего полиморфизма и неполной сортировки линий.

В заключение следует отметить, что, как показывают наши данные, использование микросателлитных маркеров в большей степени пригодно для оценки разделения географических популяций внутри видов, чем для разделения видов данной группы между собой.

Анализ микросателлитов и последовательностей хлоропластной ДНК у европейских видов *Lotus* выполнен при поддержке грантов РФФИ № 14-04-01094-а и № 15-29-02486-офи-м. Изучение последовательностей ДНК у азиатских представителей рода *Lotus* поддержано грантом РНФ № 14-50-00029 «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем».

ЛИТЕРАТУРА

- Allan G.J., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Boerner E. & Zimmer E.A.** Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae) // *Molec. Phylog. Evol.*, 2004. – Vol. 32. – P. 123–138.
- Allan G.J., Zimmer E.A., Wagner W.L. & Sokoloff D.D.** 2003. Molecular phylogenetic analyses of tribe Loteae (Leguminosae): implications for classification and biogeography. // Klitgaard B.B. & Bruneau A. (eds.). *Advances in legume systematics* 10. – Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 2003. – P. 371–393.
- Clement M., Posada D. & Crandall K. A.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Molec. Ecol.*, 2000. – Vol. 9. – P. 1657–1659.
- Degtjareva G.V., Kramina T.E., Sokoloff D.D., Samigullin T.H., Valiejo-Roman C.M. & Antonov A.S.** Phylogeny of the genus *Lotus* (Leguminosae, Loteae): evidence from nrITS sequences and morphology // *Can. J. Bot.*, 2006. – Vol. 84. – P. 813–830.
- Degtjareva G.V., Kramina T.E., Sokoloff D.D., Samigullin T.H., Sandral G. & Valiejo-Roman C.M.** New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae) // *Wulfenia*, 2008. – Vol. 15. – P. 35–49.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S.** Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005. – Vol. 1. – P. 47–50.
- Hall T.A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids Symp.*, 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
- Kai S., Tanaka H., Hashiguchi M., Iwata H. & Akashi R.** Analysis of genetic diversity and morphological traits of Japanese *Lotus japonicus* for establishment of a core collection // *Breeding Science*, 2010. – Vol. 60. – P. 436–446.
- Peakall R. and Smouse P.E.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molec. Ecol. Notes*, 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.** Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*, 2000. – Vol. 155. – P. 945–959.
- Simmons M.P., Ochoterena H., Carr T.G.** Incorporation, Relative Homoplasy, and Effect of Gap Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses // *Syst. Biol.*, 2001. – Vol. 50, No. 3. – P. 454–462.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Molec. Biol.*, 1991. – Vol. 17. – P. 1105–1109.
- Valiejo-Roman C. M., Terentjeva E. I., Samigullin T. H. & Pimenov M. G.** Relationships among genera in Saniculoideae and selected Apioideae (Umbelliferae) inferred from nrITS sequences // *Taxon*, 2002. – Vol. 51, No.1. – P. 91–103.
- Young N.D. and Healy J.** GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis // *BMC Bioinformatics*, 2003. – Vol 4, No. 6. – P. 1–6. DOI:10.1186/1471-2105-4-6 Source: PubMed.

SUMMARY

Genetic variability of nuclear microsatellite markers and plastid *trnL-trnF* DNA marker was studied in samples from local populations of the *Lotus corniculatus* species complex. Eight microsatellite loci were included in the analysis. Special emphasis was placed on diploid species, i. e. European species *Lotus tenuis* and *L. stepposus*, Eurasian species *L. frondosus* and Asian species *L. krylovii*. Genetic diversity was analysed and discussed in connection with geographical distribution of populations and taxonomy.