

УДК 582.736:581.4/15

**Уточнение таксономического статуса криптического вида
Hedysarum setigerum по данным морфологического и карпологического
анализов и ISSR-маркирования**

**A re-assessment of taxonomic status of the cryptic species *Hedysarum setigerum*
using morphological and carpological analyses and ISSR markers**

Н. С. Звягина¹, О. В. Дорогина²

N. S. Zvyagina, O. V. Dorogina

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101, г. Новосибирск, 630090
E-mail: ¹nszvyagina@mail.ru, ²olga-dorogina@yandex.ru

Реферат. Мультидисциплинарный подход с использованием морфологических, карпологических и молекулярных данных был применен для уточнения таксономического статуса криптического вида *Hedysarum setigerum* (Fabaceae) и выявления его взаимоотношений с близкородственными видами: широко распространенным *H. gmelinii* и узколокальным эндемиком *H. chaiyrakanicum*. Выявленные фенотипические и молекулярные (ISSR) данные четко обособляют *H. chaiyrakanicum* ($p < 0,05$), но не позволяют разделить между собой виды *H. gmelinii* и *H. setigerum*. Методом карпологического анализа видоспецифичных маркеров обнаружено не было. Низкий коэффициент генетических дистанций М. Nei, рассчитанный на базе ISSR-данных ($D = 0,046$), свидетельствует о тесных эволюционных взаимоотношениях между *H. gmelinii* и *H. setigerum*; результаты анализа методом Neighbor-joining и молекулярной изменчивости (АМО-VA) объединяют эти виды в одну монофилетическую группу. Полученные в ходе исследования результаты не предоставили существенных доказательств для того, чтобы рассматривать *H. setigerum* в ранге самостоятельного вида, что подкрепляет, таким образом, предположение выделять его в качестве подвида *H. gmelinii*.

Summary. A multidisciplinary study, including morphological, carpological and molecular data, has been performed to investigate taxonomic status of cryptic *Hedysarum setigerum* (Fabaceae) and its relatedness with close congeners *H. gmelinii* and *H. chaiyrakanicum*. The diagnostic features of these legume species are analyzed and discussed, including their macro- and micromorphological features, seed coat ornamentation and inter-simple sequence repeat (ISSR) profiles. Morphological and molecular ISSR patterns significantly discriminate *H. chaiyrakanicum* from the other species ($p < 0.05$), whereas none of the markers obtained is reliable in delimitation *H. setigerum* from *H. gmelinii*. Ornamentation of seed coat and ISSR patterns did not differ significantly between the species. Nei' genetic distances between species pairs indicated that *H. gmelinii* and *H. setigerum* had the lowest genetic distance ($D = 0.046$). Similarly, the Neighbor-joining tree and molecular variance (AMOVA) analyses identified individuals of *H. gmelinii* and *H. setigerum* admixed in the same monophyletic group. Comparative analysis of data obtained in our study indicates that *H. setigerum* did not form a separate entity in neither of the analyses, and therefore, supports the subordination of the cryptic species *H. setigerum* within *H. gmelinii*.

Введение

Среди приблизительно двадцати представителей рода *Hedysarum* L. (Копеечник), распространенных на территории Сибири (Курбатский, 1994), самым широко распространенным видом является *H. gmelinii* Ledeb. (К. Гмелина), принадлежащий секции *Multicaulia* Boiss. Данный вид высоко ценится в качестве кормового и пастбищного растения благодаря выраженным питательным свойствам надземной части, широкой экологической пластичности и устойчивостью к вытаптыванию (Федченко, 1948). Обширный ареал вида охватывает территорию юго-восточной Европы, северную и центральную Азию и Китай, где вид успешно приспособлен к разнообразным местообитаниям: луга, степи, сосновые леса, нижний и средний пояс гор, речные долины, берега рек, пески, каменистые выходы, известняки, засоленные почвы (Курбатский, 1994; Yakovlev и др., 1996). Представители *H. gmelinii* демонстрируют высокую фенотипическую вариабельность, формируя побеги от почти розеточных до длинностебельных; у *H. gmelinii* варьирует число пар (4–11) и характер опушения листочков (от голых до густоопушенных), окраска венчика меняется от белой до розовой и лиловой; набор хромосом с базовым числом $x = 7$ и $x = 8$ варьирует в широких пределах: $2n = 14, 16, 28, 32, 48, 56$; Черкасова, 2009; Курбатский, Малахова, 2003; Курбатский, 1994; Ян и др., 1989).

Следует отметить, что высокая вариабельность фенотипических признаков затрудняет идентификацию таксонов и разграничение близкородственных видов комплекса *H. gmelinii*. Так, *H. setigerum* Turcz. (К. щетинистый), несмотря на принадлежность к другой секции, *Subacaulia* Boiss. (Федченко, 1948), близкий к *H. gmelinii* по совокупности фено-морфологических характеристик, также отличается полиморфизмом хромосомного числа: $2n = 14, 28, 32, 48$ (Курбатский, Малахова, 2003; Курбатский, 1994). Этот вид имеет ареал, перекрывающийся с *H. gmelinii*, и занимает сходные местообитания в степном, горно-степном и лесостепной поясах растительности гор Южной Сибири. В таксономических сводках *H. setigerum* рассматривается либо как отдельный вид (Федченко, 1948; Yakovlev и др., 1996), либо как подвид *H. gmelinii* (Федченко, 1902; Курбатский, 1994; Sa и др., 2010). Еще один представитель комплекса *H. gmelinii* – тувинский эндемик *H. chaiyrakanicum* Kurbatsky (К. хайыраканский), уязвимый вид (2U), известный лишь по двум местонахождениям из Центральной Тувы (Курбатский, 1994; Шауло, 1999), фенотипически наиболее близок к *H. setigerum* и отличается от последнего более светлым окрасом венчика, меньшим числом пар листочков и меньшим числом сегментов плода. Удивительно, что для такого узколокального эндемика также зарегистрировано явление полиморфизма хромосомного числа, обнаруженное для одной популяции, расположенной на г. Хайыракан: $2n = 14$ (Черкасова, 2009) и $2n = 16$ (Звягина и др., неопубл. данные).

Значительные результаты по уточнению таксономического статуса многих криптических таксонов и ревизии взаимоотношений близкородственных видов были достигнуты при использовании комплексного подхода, т.е. при применении в качестве диагностических критериев как фенотипической, так и генетической природы, что позволяет обнаружить и оценить масштабы эволюционных явлений и этапов видообразования, таких, как сетчатая эволюция, интрогрессия и естественный отбор (Duminil и Di Michelle, 2009). Использование фенотипических и молекулярных данных было успешно применено для выявления генетической вариабельности у хозяйственно ценных сортов и экотипов кормового вида *H. coronarium* (Flores et al., 1997) и установления пространственно-генетической структуры и взаимоотношений между его природными популяциями (Ruisi и др., 2011), а полиморфизм фенотипических и генетических (ITS, ISSR и AFLP) маркеров, выявленный для средиземноморских представителей рр. *Hedysarum* и *Sulla*, позволил предположить существование единого предка для этих родов. Несмотря на все возрастающее число молекулярных исследований, посвященных изучению генетической вариабельности и филогении представителей р. *Hedysarum* (Супрун и Шанцер, 2012; Baatout и др., 1985; Trifi-Farah, Marrakchi, 2001; Ahangarian и др., 2007; Chennaoui-Kourda и др., 2007; Amirahmadi и др., 2010; Marghali и др., 2014 и т. д.), исследований, направленных на установление таксономических взаимоотношений между представителями комплекса *H. gmelinii*, до сих пор проведено не было.

Целью нашего исследования было уточнить статус криптического вида *H. setigerum*, для чего был проведен компаративный анализ морфологических, карпологических и молекулярных данных у *H. setigerum* и близкородственных видов *H. gmelinii* и *H. chaiyrakanicum*.

Материалы и методы

Для выполнения исследования было изучено сто девять образцов *H. gmelinii*, *H. setigerum* и *H. chaiyrakanicum*, собранных из 30-ти популяций, расположенных на территории Южной Сибири (Тува, Хакасия, Красноярский край, Иркутская область).

Большинство изученных морфологических признаков были отобраны среди ключевых диагностических характеристик рода согласно Федченко (1948) и Курбатскому (1994). В общей сложности 21 признак вегетативной и генеративной сферы растений был изучен у *H. gmelinii*, *H. setigerum* и *H. chaiyrakanicum*, из них большинство – это макроморфологические характеристики растения: высота побега (см), длина стебля (см), длина листа (см), число пар листочков, длина листочков (мм), ширина листочков (мм), высота цветоноса (см), длина соцветия (см), длина трубки чашечки (мм), длина зубцов чашечки (мм), длина флага (см), длина лодочки (см), длина крыльев (см), соотношение длины трубки и зубцов чашечки, соотношение длины лодочки и флага, и соотношение длины крыльев и лодочки. Признак наличия остей прошлогодних побегов и цветоносов был нами предложен впервые для систематики копеечников и оценивался он по бальной шкале: 0 (отсутствуют), 1 (мало), 2 (обильно). Среди микроморфологических признаков растений были изучены: длина (мкм) и густота (кол-во волосков на мм²) опушения листочков на адаксиальной и абаксиальной сторонах листовой пластинки. Анализ был выполнен с помощью СЭМ Hitachi T-1000.

Общий вид и размер боба и семян были изучены с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V12, оснащенного объективом AxioCam MRC-5 и программным обеспечением AxioVision 4.8 Software. Характер микроскульптурных образований был исследован с помощью СЭМ Hitachi T-1000.

Экстракция геномной ДНК была осуществлена с помощью наборов Nucleospin Plant II kit (Macherey and Nagel, USA). Концентрация и чистота ДНК были исследованы спектрофотометрически при длине волн 260 нм и по соотношению интенсивности поглощения при длине волн 260 и 280 нм, соответственно (Bio-Photometer, Eppendorf, Germany). Амплификация, разделение ISSR-фрагментов и составление бинарных матриц выполнялось, как описано ранее (Звягина, Дорогина, 2013). Визуализация и регистрация амплифицированных фрагментов были выполнены с помощью документирующей системы Gel-Doc XR+, оснащенной программным обеспечением Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories, USA).

Для анализа морфометрических и карпологических данных были рассчитаны базовые статистические параметры: среднее значение, стандартное отклонение, пределы варьирования, коэффициент вариативности (coefficient of variability, CV) и р-значение (тест one-way ANOVA при попарном сравнении) с помощью программы PAST.

Для амплифицированных ISSR-фрагментов, являющихся доминантными маркерами, отмечалось их наличие (1) или отсутствие (0); полученная бинарная матрица была проанализирована в программе PAST. Генетические расстояния Nei рассчитывались попарно для изучаемых видов на базе программы TFGA 1.3. Генетическая вариативность (H_o) подсчитывалась согласно информационному индексу Shannon'a. Разрешающая сила (R_p) каждого праймера оценивалась по формуле: $R_p = \sum I_b$, где I_b – информативность праймера: $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$, p – доля всех образцов, содержащих данный ISSR-фрагмент. Анализ главных компонент (PCA) и построение дендрограммы методом Neighbor-joining было осуществлено с помощью программы PAST.

Выявление генетической структуры видов комплекса *H. gmelinii* было проведено методом анализа молекулярной изменчивости AMOVA на базе программы Arlequin 3.5 и Structure 2.3.4. Анализ AMOVA был выполнен в виде стандартного и иерархического тестов для двух (*H. gmelinii* + *H. setigerum* vs *H. chaiyrakanicum*) и трех (*H. gmelinii* vs *H. chaiyrakanicum* vs *H. setigerum*) таксономических групп. Мы протестировали полученные ISSR-данные при количестве групп $K = 1-17$, используя симуляцию Markov chain Monte Carlo, для чего были выполнены 100000 итераций и 500000 генераций. Выбор оптимального количества таксономических групп было выполнено методом расчета ΔK на базе on-line приложения Structure Harvester.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований было установлено, что виды *H. gmelinii*, *H. setigerum* и *H. chaiyrakanicum* отличаются высоким полиморфизмом как фенотипических, так и генетических признаков. Обнаружено, что длина стебля, один из ключевых диагностических морфологических маркеров, позволяет достоверно различить *H. gmelinii* от *H. setigerum* и *H. chaiyrakanicum* ($p < 0,05$). Однако широкий диапазон варьирования этого признака (0,5–24,8 см) у *H. gmelinii*, почти целиком включающий амплитудой его изменчивости у двух других видов (0,2–3,5 см у *H. setigerum* и 0,45–1,9 см у *H. chaiyrakanicum*), не позволяет рекомендовать этот признак для разграничения видов группы *H. gmelinii*. Аналогичным образом можно охарактеризовать и остальные морфологические признаки, статистически значимо различающиеся для пары *H. gmelinii* и *H. setigerum* (высота побега, длина листа, длина и ширина листочков). Что касается тувинского эндемика *H. chaiyrakanicum*, то данный вид достоверно отличается от двух других по ряду макро- и микроморфологических характеристик, типичных для представителей этого вида: более мелкие размеры венчика и чашечки, меньшее число пар листочков, наличие базальных остей, более длинные цветоносы, умеренное опушение листочков с обеих сторон. Данные признаки характеризуют *H. chaiyrakanicum* не только статистически достоверно ($p < 0,05$); они имеют значительно отличающиеся пределы варьирования, что делает данные признаки удобными маркерами при идентификации видовой принадлежности гербарных образцов или диагностике *H. chaiyrakanicum* в полевых условиях.

Карпологический анализ существенных различий между видами не обнаружил. Все изучаемые таксоны имели боб сходного строения: 2–6-членный, с заостренным коротким носиком на вершине. Сегменты отчетливо выражены, имеют небольшую окраину. Каждый сегмент имеет размер 2,6–4,7 × 2,7–4,1 мм и несет несколько поперечных выемчатых ребер, снабженных более или менее развитыми загнутыми на конце шипами 0,4–0,9 мм длиной, имеющими пещеристое строение поверхности, пурпурными при созревании плода. Опушение плода сложено одноклеточными уплощенными булавовидными волосками 150–270 мкм длиной и 55–60 мкм шириной, воронковидно загнутыми у основания и закругленными, реже заостренными на вершине. Данные СЭМ выявили незначительную изменчивость (CV = 18,4) размера семени у изучаемых видов копеечника ($p > 0,05$): размер семени составил в среднем 2,47 × 1,96 мм у *H. gmelinii*, 2,3 × 1,9 мм у

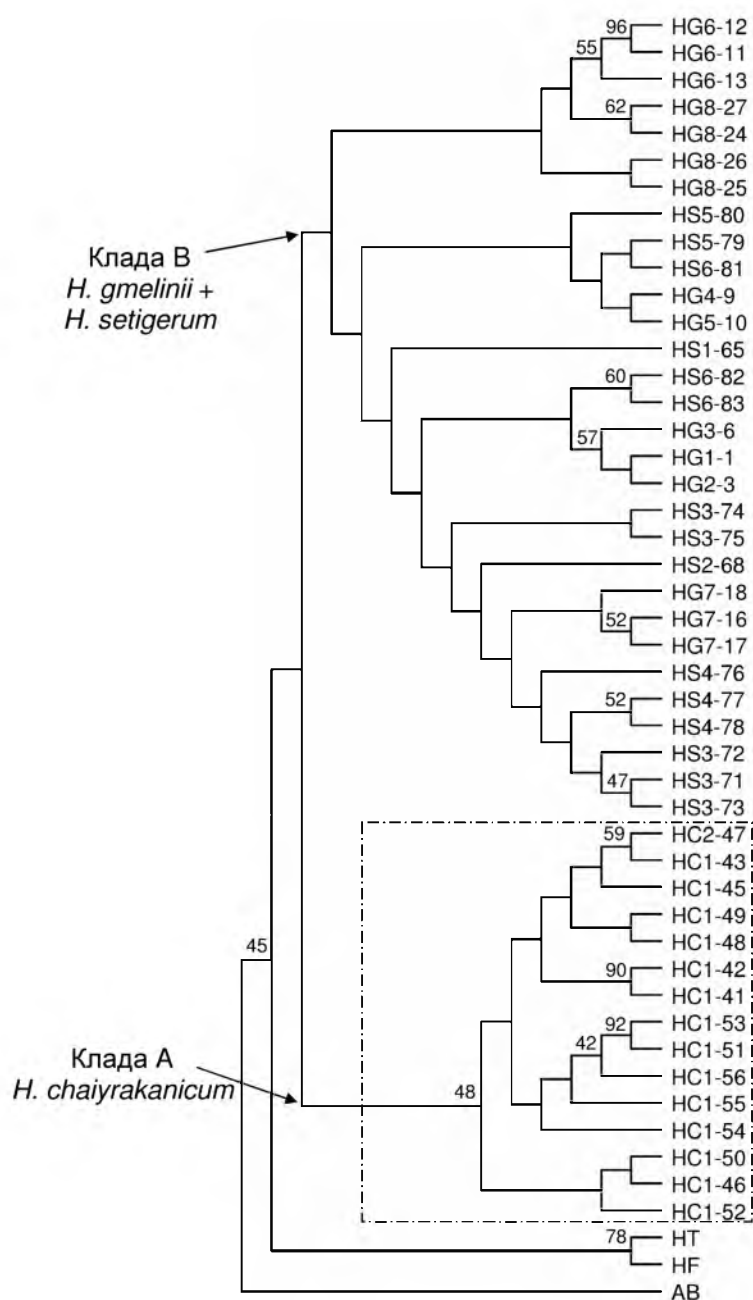


Рис. Дендрограмма, отражающая взаимоотношения *Hedysarum setigerum* (HS) с близкородственными видами *H. gmelinii* (HG) и *H. chaiyrakanicum* (HC), построенная на базе коэффициентов генетических дистанций L_i и Ne_i методом Neighbor-joining, вычисленных для ISSR-данных. В качестве внешних групп использованы *H. theinum* (HT), *H. fruticosum* (HF) и *Astragalus bifidus* (AB). Над узлами дендрограммы приведены значения бутстреп-поддержки, превышающие 40 %.

молекулярной дивергенции между *H. setigerum* и *H. gmelinii* хорошо согласуется с данными морфометрического и карпологического анализов.

Таким образом, совокупный анализ выявленных статистически значимых ($p < 0.05$) морфологических и генетических (ISSR) маркеров не обнаружил достаточно оснований для подтверждения статуса *H. setigerum* как самостоятельного вида. Результаты наших исследований подкрепляют предложение (Курбатский, 1994) выделять *H. setigerum* в качестве подвида: *H. gmelinii* subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Meyer) Kurbatsky. Высокая разрешающая сила метода ISSR позволяет рекомендовать данный анализ для

H. setigerum и $2.5 \times 2,05$ мм у *H. chaiyrakanicum*. Характер микроскульптурных образований на поверхности семенной кожуры выявил большую вариабельность видов. Так, на основании анализа микрофотографий семян, выполненных при различном увеличении ($\times 1000$, $\times 2000$, $\times 4000$) методом СЭМ, было выделено три типа поверхности семян. Первые два типа поверхности являются характерными для всех трех видов; третий тип обнаружен у некоторых образцов *H. setigerum*. Таким образом, карпологический анализ не выявил дифференциацию изучаемых видов, что характеризует данный метод как малоэффективный при разделении близкородственных видов группы *H. gmelinii*.

Метод амплификации межмикросателлитных повторов (ISSR) геномной ДНК позволил выявить семь наиболее информативных и вариабельных праймеров, обладающих хорошо воспроизводимыми и высокополиморфными (99,4 %) паттернами, способными охарактеризовать молекулярный профиль и уровень дивергенции изучаемых видов: $(CTC)_3GC$, $(CT)_8TG$, $(CA)_6GT$, $(CA)_6GG$, $(CA)_6AG$, $(CT)_8AC$, $(AC)_8C/TG$. Для каждого из изученных растительных образцов был получен уникальный ISSR профиль, однако характерных или видоспецифичных маркеров нами обнаружено не было.

Выявлено, что наименьшее генетическое расстояние D , равное 0.046, характеризует пару *H. setigerum* + *H. gmelinii*, в то время, как эндемик *H. chaiyrakanicum* более дифференцирован от них (рисунок, клада А): $D = 0,109$ (*H. chaiyrakanicum* vs *H. setigerum*) и $D = 0,115$ (*H. chaiyrakanicum* vs *H. gmelinii*). Результаты анализа ISSR-данных не позволяют разделить виды *H. setigerum* и *H. gmelinii* (рисунок, клада В), что согласуется с результатами, полученным в программе Structure при количестве групп $K = 2$ и при анализе молекулярной изменчивости AMOVA. Отсутствие

изучения генетической вариабельности видов, уровня дивергенции близкородственных видов и уточнения таксономических взаимоотношений между представителями р. *Hedysarum*.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников ЦСБС СО РАН: И. А. Артемова, за помощь при сборе растительного материала, А.А. Красникова, за помощь при проведении микрофотосъемки на базе Центра коллективного пользования ЦСБС СО РАН, а также И. Ю. Селютину и Н. А. Карнаухову, за предоставление гербарного материала. Авторы признательны Pilar Catalan (University of Zaragoza, Huesca, Spain) за помощь в проведении статистической обработки данных. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а (№ 14-04-31249).

ЛИТЕРАТУРА

- 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. 1183–1189.
- Курбатский В. И.** Род *Hedysarum* L. // Флора Сибири / Под ред. А. В. Положий и др. – Новосибирск: Наука, 1994. – Т. 9. – С. 153–166.
- Курбатский В. И., Малахова Л. А.** Числа хромосом для некоторых видов *Hedysarum* L. на юге Красноярского края (Минусинская степь) // Сист. зам. матер. Герб. ТГУ, 2003. – Т. 93. – С. 12–13.
- Супрун Н. А., Шанцер И. А.** Генетическая изменчивость видов родства *Hedysarum grandiflorum* Pall. (Fabaceae) по данным ISSR маркирования // Бюлл. ГБС, 2012. – Т. 4. – С. 41–48.
- Федченко Б. А.** Обзор видов рода *Hedysarum* // Тр. Петерб. бот. сада, 1902. – 349 с.
- Федченко Б. А.** *Hedysarum* L. Флора СССР. – М. – Л.: Изд-во Акад. Наук СССР, 1948. – Т. 13. – С. 284–297.
- Черкасова Е. С.** Числа хромосом редких видов *Hedysarum* (Fabaceae) // Бот. журн., 2009. – Т. 94, № 1. – С. 135–138.
- Шауло Д. Н.** *Hedysarum chajyrakanicum* Kurbatsky // Красная книга республики Тыва: растения / Под ред. И. М. Красноборов, Д. Н. Шауло, В. М. Ханминчун и др. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. – С. 16.
- Ahangarian S., Kazempour Osaloo S., Maassoumi A. A.** Molecular phylogeny of the tribe Hedysareae with special reference to *Onobrychis* (Fabaceae) as inferred from *nrDNA* ITS sequences // Iranian Journal of Botany, 2007. – Vol. 13. – P. 64–74.
- Amirahmadi S., Kazempour Osaloo S., Maassoumi A. A.** Loss of chloroplast *trnL*_{UAA} intron in two species of *Hedysarum* (Fabaceae): evolutionary implications // Iranian Journal of Biotechnology, 2010. – Vol. 8. – P. 150–155.
- Baatout H., Marrakchi M., Mathieu C., Vedel F** Variation of plastid and mitochondrial DNAs in the genus *Hedysarum* // Theor. Appl. Genet., 1985. – Vol. 70. – P. 577–584.
- Chennaoui-Kourda H., Marghali S., Marrakchi M., Trifi-Farah N.** Genetic diversity of *Sulla* genus (Hedysareae) and related species using Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) markers // Biochem. Syst. Ecol., 2007. – Vol. 35. – P. 682–688.
- Duminil J., Di Michelle M.** Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers // Plant Biosyst., 2009. – Vol. 143. – P.528–542.
- Flores F, Gutierrez J. C., Lopez J., Moreno M. T, Cubero J. I.** Multivariate analysis approach to evaluate a germplasm collection of *Hedysarum coronarium* L. // Genet. Resour. Crop. Evol., 1997. – Vol. 44. – P. 545–555.
- Marghali S., Zitouna N., Gharbi M., Chennaoui-Kourda H., Trifi-Farah N.** Morphological and molecular markers: Congruence or conflict in the phylogeny of *Sulla* species? // Aust. J. Crop Sci., 2014. – Vol. 8. – P. 148–158.
- Ruisi P., Siragusa M., Giorgio Di G., Graziano D., Amato G., Carimi F, Giambalvo D.** Pheno-morphological, agronomic and genetic diversity among natural populations of *Sulla* (*Hedysarum coronarium* L.) collected in Sicily, Italy // Genet. Resour. Crop Evol., 2011. – Vol. 58. – P. 245–257.
- Sa R., Su D., Debreczy Z.** Taxonomic notes on the *Hedysarum gmelinii* complex (Fabaceae) // Ann. Bot. Fennici, 2010. – Vol. 47. – P. 51–58.
- Trifi-Farah N., Marrakchi M.** *Hedysarum* phylogeny mediated by RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA // Genet. Resour. Crop Evol., 2001. – Vol. 48. – P. 339–345.
- Yakovlev G. P., Sytin A. K., Roskov Y R.** Legumes of Northern Eurasia: a check-list. – Kew: Royal Botanical Gardens, 1996. – P. 379–407.
- Yan G. X., Zhang S. Z., Yan J. F, Fu X. Q., Wang L. Y** Chromosome numbers and geographical distribution of 68 species of forage plants // Grassland of China [Zhongguo Caoyuan], 1989. – Vol. 4. – P. 53–60.