

## Полиморфизм популяций *Corydalis subjenisseensis* s. l. (Papaveraceae) на юге Приенисейской Сибири

### Polymorphism in populations of *Corydalis subjenisseensis* s. l. (Papaveraceae) in the south of the Yenisei Siberia

Рябова К. К., Ямских И. Е., Степанов Н. В.

Ryabova K. K., Yamskikh I. E., Stepanov N. V.

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия.  
E-mails: ryabova.kseniya.k@mail.ru, iyamskikh@mail.ru, stepanov-nik@mail.ru  
Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

**Реферат.** Хохлатка приенисейская (*Corydalis subjenisseensis* Antipova) – клубневой эфемероид, характеризующийся высоким морфологическим разнообразием. В ходе исследования была проведена оценка генетического полиморфизма 7 популяций *Corydalis subjenisseensis* s. l., произрастающих в растительных сообществах юга Приенисейской Сибири с использованием ISSR маркеров. В результате амплификации геномной ДНК с 8 ISSR-праймерами получено 100 ампликонов ДНК, уровень полиморфизма которых составил 78 %. Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьировало от 9 (ISSR-17) до 21 (HB14). Максимальный уровень генетической изменчивости отмечен для западносибирских популяций из черневых осиновых и пихтовых лесов. Коэффициент подразделенности изученных популяций ( $G_{st}$ ) составляет 0,2415, что свидетельствует о высоком уровне их дифференциации. На дендрограмме сходства, выполненной в программе TFPGA, отмечается разделение на 2 группы: к первой относятся красноярская и хакасская популяции *C. subjenisseensis*, во вторую входят танзыбейские популяции, характеризующиеся высоким уровнем полиморфизма. Аналогичная структура наблюдается при построении кластеров с использованием байесовского подхода. 69 генотипов разделяются максимально на 7 генетических кластеров. Среди танзыбейских популяций встречаются особи предположительно гибридного происхождения, однако четкого разделения на виды не обнаруживается.

**Ключевые слова.** Генетический популяционный анализ, кластерный анализ, хохлатка приенисейская, ISSR-PCR маркеры.

**Summary.** *Corydalis subjenisseensis* (Antipova) is a tuberous ephemeroide characterized by a high morphological diversity. During the research work genetic polymorphism of 7 populations *Corydalis subjenisseensis* s. l., growing in the south of the Yenisei Siberia were analyzed using ISSR markers. The amplification of genomic DNA with 8 ISSR primers yielded 100 DNA amplicons of which 78 were polymorphic. The number of amplified DNA fragments, depending on the primer, varied from 9 (ISSR-17) to 21 (HB14). The maximum level of genetic variation was observed for Western Sayan populations growing in aspen and fir forests. The genetic differentiation among populations ( $G_{st}$ ) was 0.2415, indicating a high level of differentiation. The similarity dendrogram performed in the TFPGA program shows a division into 2 groups: the first group includes the Krasnoyarsk and Khakass populations of *C. subjenisseensis*, the second group includes the Tanzybei populations, which are characterized by a high level of polymorphism. A similar structure is observed when building clusters using the Bayesian approach. 69 genotypes are divided into a maximum of 7 genetic clusters. Among the populations of the Tanzybei, individuals of presumably hybridogenic origin are found, grouped around two centers of “attraction”.

**Key words.** Cluster analysis, *Corydalis subjenisseensis*, ISSR-PCR markers, genetic population analysis.

Хохлатка приенисейская – ранневесенний клубневой геофит, относящийся к семейству Papaveraceae. Внесена в Красную книгу Красноярского края (Антипова, 2007). Произрастает по долинам рек, в хвойных и хвойно-лиственных лесах, сырых кустарниках, на лесных опушках и полянах, лужайках, у ручьев и ключей, по окраинам болот. Ареал охватывает юг Красноярского края. Встречается

в пределах Красноярской, Канской, Минусинской лесостепей, в сообществах Западного и Восточного Саян (Антипова, 2012). Хохлатка приенисейская характеризуется высоким морфологическим разнообразием. Так, Н. В. Степанов выделяет три устойчивые в культуре формы, имеющие таксономически значимые признаки, и описывает их как новые для науки виды. К ним относятся: хохлатка кукушкины слёзки (*Corydalis lacrimuli-cuculi* Stepanov) – мощное растение с крупными, округло-треугольными долями листьев, крупными нижними прицветниками, часто превышающими цветки, количество которых достигает 30; хохлатка Тамары (*Corydalis tamarae* Stepanov) – так же обильно цветущее растение, но имеющие более мелкие листовые пластинки, отличающиеся от других видов широкими ланцетными, веретеновидными коробочками с длинным носиком; хохлатка Бегляновой (*Corydalis begljanovae* Stepanov) от близких видов *C. subjenisseensis*, *C. lacrimuli-cuculi* и *C. tamarae* отличается многочисленными развитыми, направленными в стороны стеблевыми листьями (Степанов, 2018).

Цель исследований – оценка генетического разнообразия популяций *Corydalis subjenisseensis* sensu lato, произрастающих в растительных сообществах юга Приенисейской Сибири.

Сбор материала проводился с мая по июнь в 2016–2019 гг. Объектом исследований явились 7 популяций хохлатки, произрастающих в Восточном (Березовский р-н) и Западном Саяне (Ермаковский р-н, Республика Хакасия) (табл.).

Таблица

Характеристика местообитаний *C. subjenisseensis* s. l.

Популяция	Описание	Предполагаемый вид
Восточный Саян (Березовский р-н)		
Cs1	Осиново-березовый лес папоротниково-высокотравно-разнотравный (окр. г. Красноярск, пойма руч. Лалетина)	<i>Corydalis subjenisseensis</i> Antipova – хохлатка приенисейская
Западный Саян (Ермаковский р-н)		
Cs2	Черневой осинник, папоротниково-разнотравный (окр. пос. Танзыбей, хр. Веховой)	<i>Corydalis lacrimuli-cuculi</i> Stepanov – хохлатка кукушкины слёзки
Cs3	Черневой осинник, высокотравно-папоротниковый (окр. пос. Танзыбей, хр. Веховой)	<i>Corydalis tamarae</i> Stepanov – хохлатка Тамары
Cs4	Луг разнотравно-злаковый (окр. Ермаковского стационара Института леса СО РАН)	<i>Corydalis begljanovae</i> Stepanov – хохлатка Бегляновой (нетипичная <i>Corydalis subjenisseensis</i> Antipova)
Cs5	Пойменный черневой пихтарник с ивой росистой, разнотравно-злаковый (долина р. Танзыбей)	<i>Corydalis begljanovae</i> Stepanov – хохлатка Бегляновой (нетипичная <i>Corydalis subjenisseensis</i> Antipova)
Cs6	Смешанный пойменный черневой лес широко-котравно-мятликосый (окр. пос. Танзыбей, долина р. М. Кебезь)	<i>Corydalis begljanovae</i> Stepanov – хохлатка Бегляновой
Западный Саян (Республика Хакасия)		
Cs7	Сосняк орляково-разнотравный (окр. пос. Майна, пойма р. Уй)	<i>Corydalis subjenisseensis</i> Antipova – хохлатка приенисейская

Генетическую вариабельность популяций изучали на основе данных ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) анализа. Выделение тотальной ДНК производили из 9–10 образцов в каждой популяции с помощью коммерческого набора DiamondDNA (г. Барнаул). Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси (6 мкл ddH<sub>2</sub>O, 10 мкл смеси БиоМастер HS-Taq ПРЦ-Color 2x, 2 мкл ДНК, 2 мкл 10мМ праймера) по следующей программе: 95 °С – 5 мин; 13 циклов: 95 °С – 20 с; 55 °С – 45 с, понижение температуры на 0,7 °С в каждом последующем цикле; 72 °С – 90 с; 25 циклов: 95 °С – 20 с, 44 °С – 30 с, 72 °С – 90 с; 72 °С – 7 мин – завершающая стадия; охлаждение при 4°С. Разделение продуктов амплификации производили в 1,6%-м агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере в ТВА-буфере при 80V с применением бромистого этидия. Визуализацию ДНК проводили в проходящем УФ-излучении в системе гель-документации GelDoc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали ДНК-маркеры (ООО «Биолабмикс», Новосибирск). ISSR-PCR анализ

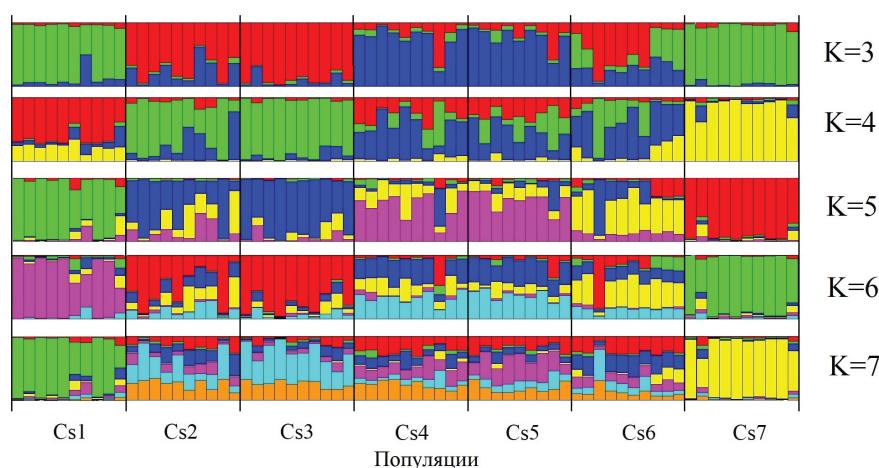


Рис. 1. Апостериорные вероятности отнесения образцов *Corydalis subjenisseensis* s. l. к генетическим кластерам на основе ISSR-PCR анализа. Каждая особь представлена единственной линией, разбитой на K цветных сегментов, длина которых пропорциональна каждому из K предполагаемых кластеров.

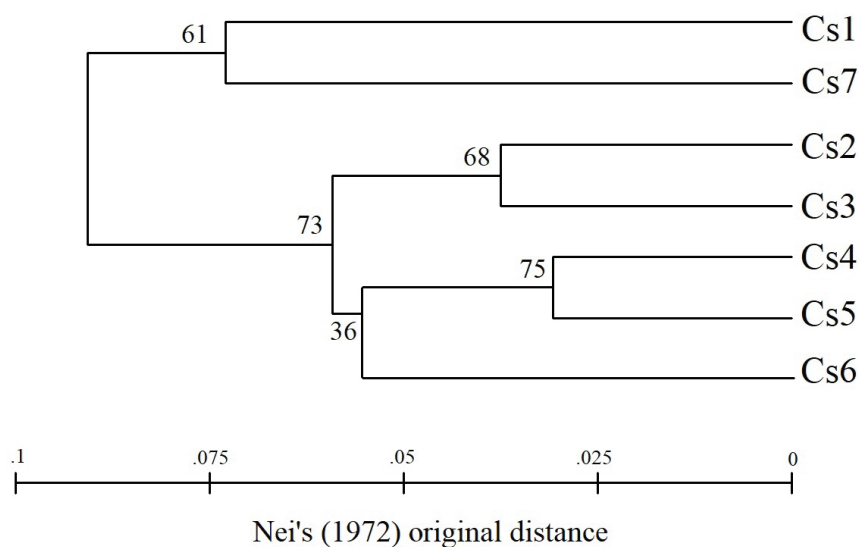


Рис. 2. Дендрограмма сходства популяций *Corydalis subjenisseensis* s. l. на основе ISSR-PCR анализа.

нескольких повторностей результаты были равнозначными, что говорит об их стабильности. Максимальное количество кластеров оценивалось с помощью статистики  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005). Количество возможных кластеров (K) тестировалось от 1 до 13 в пятнадцати повторностях. Для визуализации результатов была использована веб-программа STRUCTURE Harvester (Earl et al., 2012).

В ходе ISSR-PCR анализа выявлено 100 фрагментов ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 78. Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьирует от 9 (ISSR-17) до 21 (HB14). Максимальный уровень полиморфизма отмечается для популяций Cs2 (хр. Веховой, черневой осинник) и Cs6 (долина р. М. Кебезж, пойменный черневой лес) и составляет 52 и 51 % соответственно. Так же для этих популяций характерны высокие значения индекса Шеннона ( $I_o = 0,2649$ , и  $I_o = 0,2641$  соответственно), а коэффициент разнообразия Нея равен 0,1748.

проводился с праймерами, показавшими наибольший полиморфизм фрагментов ДНК: 17898B (CA)<sub>6</sub>AC), 17899B (CA)<sub>6</sub>GG), HB10 (GA)<sub>6</sub>CC), HB12 (CAC)<sub>3</sub>GC), HB13 (GAG)<sub>3</sub>GC), HB14 (CTC)<sub>3</sub>GC), ISSR-17 (GACA)<sub>4</sub>, ISSR-23 (AC)<sub>8</sub>TA) (Zietkiewicz et al., 1994). Анализ гелей проводили с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software, на основании которого была составлена матрица для генетического анализа.

Полученные результаты анализировали с помощью программ TFGPA version 1.3 и Popgene version 1.32. Для оценки уровня генетического разнообразия были рассчитаны: уровень полиморфизма, генное разнообразие Нея ( $H_e$ ), индекс Шеннона ( $I_o$ ), генетические расстояния Нея (D). Дендрограмма сходства была построена невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA).

Для оценки генетической структуры популяций был использован байесовский подход (MCMC: Марковская цепь Монте-Карло), реализованный в программном обеспечении STRUCTURE, версии 2.3.4. (Pritchard et al., 2000). Использовалось длительное выгорание (Burn-In) 20 000 и MCMC 50 000 циклов. При проведении не-

Коэффициент подразделенности популяций ( $G_{st}$ ) составляет 0,2415. Следовательно, на долю межпопуляционного разнообразия приходится 24,15%, а изученные популяции демонстрируют высокую степень дифференциации по классификации Райта (1972). Наибольшие значения генетических дистанций Нея (Nei, 1972) наблюдаются между популяциями Cs3 и Cs7 ( $D = 0,1145$ ), а также Cs1 и Cs3 ( $D = 0,1099$ ). Причем, если популяции Cs1 и Cs7, произрастающие в окр. г. Красноярска и в Хакасии, относятся к виду *C. subjenisseensis*, то танзыбейская популяция Cs3 соответствует виду *C. tamarae*. Также генетические отличия отмечены между Cs2 (*C. lacrimuli-cuculi*) и Cs7 ( $D = 0,1087$ ). Наибольшее генетическое сходство наблюдается между танзыбейскими популяциями Cs4 и Cs5, Cs2 и Cs3.

На дендрограмме сходства, выполненной в программе TFPGA, четко выделяются 2 кластера (рис. 1). В первый кластер входят красноярская и хакасская популяции *C. subjenisseensis* (Cs1 и Cs7), второй объединяет остальные танзыбейские популяции. Отдельный субкластер формируют популяции *C. lacrimuli-cuculi* (Cs2) и *C. tamarae* (Cs3), произрастающие в непосредственной близости друг от друга. Четкого разграничения видов не обнаруживается.

Анализ структуры распределения генотипов особей в программе STRUCTURE показывает, что исследуемые образцы *C. subjenisseensis* s. l. максимально можно разделить на семь генетических кластеров  $K = 7$  ( $\Delta K = 21,61$ ). На диаграмме вероятностей отнесения каждого образца к трем кластерам прослеживается разделение на группы: красноярская Cs1 и хакасская Cs7 популяции (*C. subjenisseensis*); произрастающие на хр. Веховом Cs2 (*C. lacrimuli-cuculi*) и Cs3 (*C. tamarae*); генетически схожие танзыбейские Cs4 и Cs5, которые первоначально определялись как нетипичная *C. subjenisseensis*, проявили сходство с описанной из этих мест Cs6 – хохлаткой Бегляновой (*C. begljanovae*) и, очевидно, должны быть отнесены именно к этому виду (рис. 2).

Проведенный генетический анализ показал, что популяции *C. subjenisseensis* s. l. представляют собой генетически неоднородную группу, внутри которой встречаются особи предположительно гибридного происхождения. Анализ генетической подразделенности показал высокий уровень дифференциации популяций ( $G_{st} = 0,24$ ). На дендрограмме сходства отмечается разделение на 2 группы: к первой относятся красноярская и хакасская популяции *C. subjenisseensis*, во вторую входят танзыбейские популяции, характеризующиеся высоким уровнем полиморфизма. Во второй группе отсутствует четкое разделение на отдельные виды. Возможно, для более детального исследования необходим поиск более надежных генетических маркеров.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Антипова Е. М. Новое название для вида *Corydalis popovii* Antipova (Fumariaceae) // Бот. журн., 2007. – Т. 92, №10. – С. 1575–1580.
- Антипова Е. М. *Corydalis subjenisseensis* (Antipova) – Хохлатка приенисейская // Красная книга Красноярского края. В 2-х т. Т. 2: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений и грибов. 2-е изд., перераб. и доп.; Сибирский фед. ун-т. – Красноярск, 2012. – 576 с.
- Степанов Н. В. Новые виды сиреневоцветковых хохлаток (*Corydalis* DC., Fumariaceae) из Приенисейских Саян // Сист. зам. Герб. Томск. ун-та, 2018. – №. 117. – С. 16–34.
- Earl D. A., von Holdt B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genet Resour, 2012. – № 4. – P. 359–361.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study // Molecular Ecology, 2005. – № 14. – P. 2611–2620.
- Nei M. Genetic Distance between Populations // American Naturalist, 1972. – № 106. – P. 283–292.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics, 2000. – № 155. – P. 945–959.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. – № 20(2). – P. 176–183.