

Морфологические и филогенетические различия видов р. *Erythronium* (Liliaceae) в Южной Сибири

Morphological and phylogenetic analysis of *Erythronium* (Liliaceae) species in Southern Siberia

Кучма Е. А.¹, Рябова К. К.^{1,2}, Ямских И. Е.¹, Степанов Н. В.¹, Куцев М. Г.^{1,3}

Kuchma E. A.¹, Ryabova K. K.^{1,2}, Yamskikh I. E.¹, Stepanov N. V.¹, Kutsev M. G.^{1,3}

¹ Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия. E-mails: evangelina.kuchma@bk.ru, iyamskikh@mail.ru, stepanov-nik@mail.ru

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», г. Красноярск, Россия. E-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru

² Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Krasnoyarsk, Russia

³ Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: m_kucev@mail.ru

³ Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. В ходе исследования были проведены морфологический и филогенетический анализы трех видов кандыков, произрастающих в горах Южной Сибири: *Erythronium sibiricum* (Fisch. et Mey) Krylov, *E. sajanense* Stepanov et Stassova, *E. sulevii* (Rukšāns) Stepanov. По морфологическим параметрам из трех исследованных нами видов наиболее четкую видовую обособленность демонстрирует *E. sajanense*, который характеризуется небольшими цветоносами; шиловидными тычиночными нитями, резко сужающимися в основании; более компактным рыльцем пестика; окраской лепестков околоцветника. Ординация особей трех видов в плоскости главных компонент демонстрирует четкое отделение *E. sajanense* от двух других видов. Филогенетический анализ проведен на основе секвенирования хлоропластных генов *matK*, *rbcl* и ядерного маркера ITS (ITS1-5.8S рДНК-ITS2). Построенные нами филогенетические деревья показывают четкое разделение видов р. *Erythronium* на евразийскую и восточно-североамериканскую группы. Максимальное количество нуклеотидных замен отмечено для вида *E. sajanense*, тогда как *E. sibiricum* и *E. sulevii* демонстрируют большее генетическое сходство. Наиболее информативным маркером для идентификации видов р. *Erythronium* являются ITS-регионы, характеризующиеся высоким уровнем вариабельности между отдельными видами.

Ключевые слова. Морфологическое разнообразие, филогенетический анализ, *Erythronium sajanense*, *Erythronium sibiricum*, *Erythronium sulevii*, *matK*, *rbcl*.

Summary. This study presents morphological and phylogenetic analyses of 3 species of *Erythronium* growing in the mountains of Southern Siberia. Species are *Erythronium sibiricum* (Fisch. et Mey) Krylov, *E. sajanense* Stepanov et Stassova, *E. sulevii* (Rukšāns) Stepanov. According to the morphological parameters of the species, *E. sajanense* shows the clearest isolation, characterized by small peduncles; awl-shaped staminate filaments, sharply narrowing at the base; a more compact stigma of the pistil; the color of the perianth petals. According to the principal component analysis, *E. sajanense* separates from the other two species. Phylogenetic analysis was based on sequencing chloroplast genes *matK*, *rbcl* and the nuclear marker ITS (ITS1-5.8S rDNA-ITS2). The phylogenetic trees show a clear division of the species of *Erythronium* into the Eurasian and East-North American groups. The maximum number of nucleotide substitutions was noted for *E. sajanense*, whereas *E. sibiricum* and *E. sulevii* show greater genetic similarity. The most informative markers for the identification of *Erythronium* species are ITS regions characterized by a high level of variability between individual species.

Key words. *Erythronium sajanense*, *Erythronium sibiricum*, *Erythronium sulevii*, ITS, *matK*, morphological diversity, phylogenetic analysis, *rbcl*.

Erythronium Linn., или кандык – морфологически однородный и легко узнаваемый род, относящийся к семейству Liliaceae (Takahashi, 1987). Род включает 34 вида (The World Flora Online. URL: <http://www.worldfloraonline.org>). В Южной Сибири распространены четыре вида кандыка: *Erythronium sibiricum* (Fisch. et Mey) Krylov, *E. sajanense* Stepanov et Stassova, *E. sulevii* (Rukšāns) Stepanov, *E. krylovii*

Stepanov. *Erythronium sajanense* был возведен в статус вида Н. В. Степановым и В. В. Стасовой в 2011 г. (Степанов, Стасова, 2011). *E. sulevii* впервые был описан Я. Рукшансом в 2007 г. как подвид кандыка сибирского (*E. sibiricum* subsp. *sulevii* Rukšans) (Rukšans, 2007), и недавно он был возведен в статус вида (Степанов, Стасова, 2011). Но до сих пор не все исследователи признают новое таксономическое положение *E. sajanense* и *E. sulevii*, так, например, ни один из этих видов не был включен в последнюю монографию «The Genus *Erythronium*» (Clennett, 2014).

Цель данной работы – морфологический и филогенетический анализы видов *Erythronium sibiricum*, *E. sajanense* и *E. sulevii*.

Сбор материала проводился в мае 2022 г. в природном парке Ергаки (Красноярский край) – популяция ER1 (*E. sajanense*), в окр. г. Кемерово (Кемеровская область) – ER2 (*E. sibiricum*), и в окр. г. Белокурихи (Алтайский край) – ER3 (*E. sulevii*). В морфологическом анализе использовано 97 экземпляров кандыков. Произведены замеры вегетативных (высота растения, размеры листьев, луковицы) и генеративных органов (размеры и окраска лепестков, форма и размеры тычинок и пестика). Полученные данные обработаны в программе R-Studio. Для сравнения среднепопуляционных значений признаков использовался тест Тьюки (Tukey, 1949). Для выявления комплекса ключевых диагностических показателей был использован метод главных компонент (Principal component analysis, PCA), реализованный в базовом пакете «stats», с последующей визуализацией с помощью пакета «factoextra» в R-Studio (Kassambara, Mundt, 2020).

Выделение ДНК проводилось СТАВ-методом (Doyle J. J., Doyle J. L., 1987). Амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси (25 мкл ddH₂O, 21 мкл ПЦР-смесь (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 2 мкл ДНК, 1 мкл каждого праймера (10 мМ) по следующей программе: 95 °C (3 мин); 35 циклов: 95 °C (20 с), 59 °C (30 с), 72 °C (30 с); 75 °C (5 мин).

На основе секвенирования хлоропластных маркеров: *matK* (Maturase K), *rbcL* (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO) и ядерного маркера ITS (ITS1-5.8S рДНК-ITS2) был проведен филогенетический анализ с использованием программы MEGA11 (Tamura et al., 2021). Использовался метод максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) со значением параметра бутстрэпа 5000 (Tamura, Nei, 1993). Виды для сравнения были взяты из базы данных GenBank (GenBank. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Стоит отметить, что в литературе выделяют три географические группы р. *Erythronium*: евразийскую, восточно-североамериканскую и западно-североамериканскую. Виды, принадлежащие к каждой из данных групп, на филогенетических моделях стабильно выделяются в отдельные клады (Allen et al., 2003). Для проведения нашего исследования были выбраны виды, принадлежащие к евразийской и восточно-североамериканской географическим группам. В качестве аутгрупп использовались представители родов *Tulipa* L. и *Amana* Honda: *Tulipa sylvestris* L., *Tulipa patens* Agardh. ex Schult., *Amana kuocangshanica* D. Y. Tan X. R. Li D. Y. Hong Bot. J. Linn. Следует отметить, из трех видов наиболее исследованным является *E. sibiricum*. Для *Erythronium sajanense* регион ITS был секвенирован ранее (Bartha et al., 2015), а последовательности *rbcL* и *matK* для данного вида определены впервые. Данные по *E. sulevii* отсутствуют.

Морфологический анализ показал, что изучаемые виды достоверно отличаются друг от друга по ряду параметров. Так, *E. sajanense* характеризуется меньшей длиной цветоноса; шиловидными тычиночными нитями, имеющими узко-клиновидную форму, которые в основании резко сужаются; более компактным рыльцем столбика, соотношением белой и лиловой частей лепестков, а *E. sulevii* – более короткими и узкими лепестками, узкими тычиночными нитями и темными пыльниками. Отдельные признаки, выявленные нами, были приведены при описании *E. sajanense* (Степанов, Стасова, 2011).

Ординация особей трех видов в плоскости главных компонент (рис. 1) демонстрирует четкое отделение *E. sajanense* от двух других видов. Облака *E. sibiricum* и *E. sulevii* частично перекрываются. Это свидетельствует о сходстве по некоторым признакам, таким как длина и ширина листов, длина цветоноса и расположение белой части лепестков.

В результате секвенирования участок ITS составил 619 нуклеотидов. Количество замен между *E. sajanense* и *E. sibiricum* равно 28 (8 трансверсий и 20 транзиций), между *E. sajanense* и *E. sulevii* 26 (6 трансверсий и 20 транзиций), а между *E. sibiricum* и *E. sulevii* различия минимальны (1 транзиция и 2 трансверсии). При построении филогенетического дерева на основе последовательностей ITS все ветви в целом получили сильную бутстрэп поддержку (рис. 2). Образец *E. sajanense* (ER1) выделяется в отдельную кладу с ранее секвенированным *E. sajanense* с поддержкой 100 %. Образцы *E. sibiricum* (ER2)

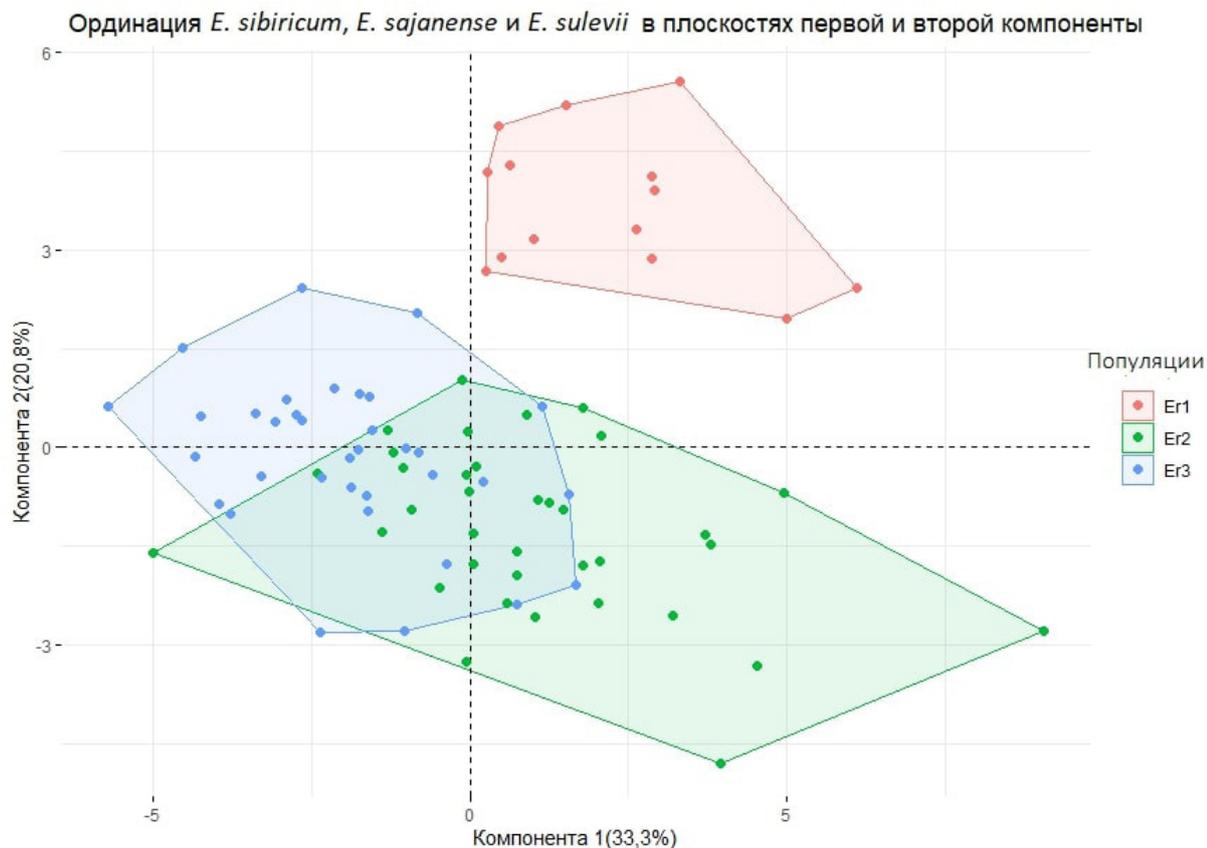


Рис. 1. Ординация *Erythronium sibiricum*, *E. sajanense* и *E. sulevii* в плоскостях первой и второй компоненты.

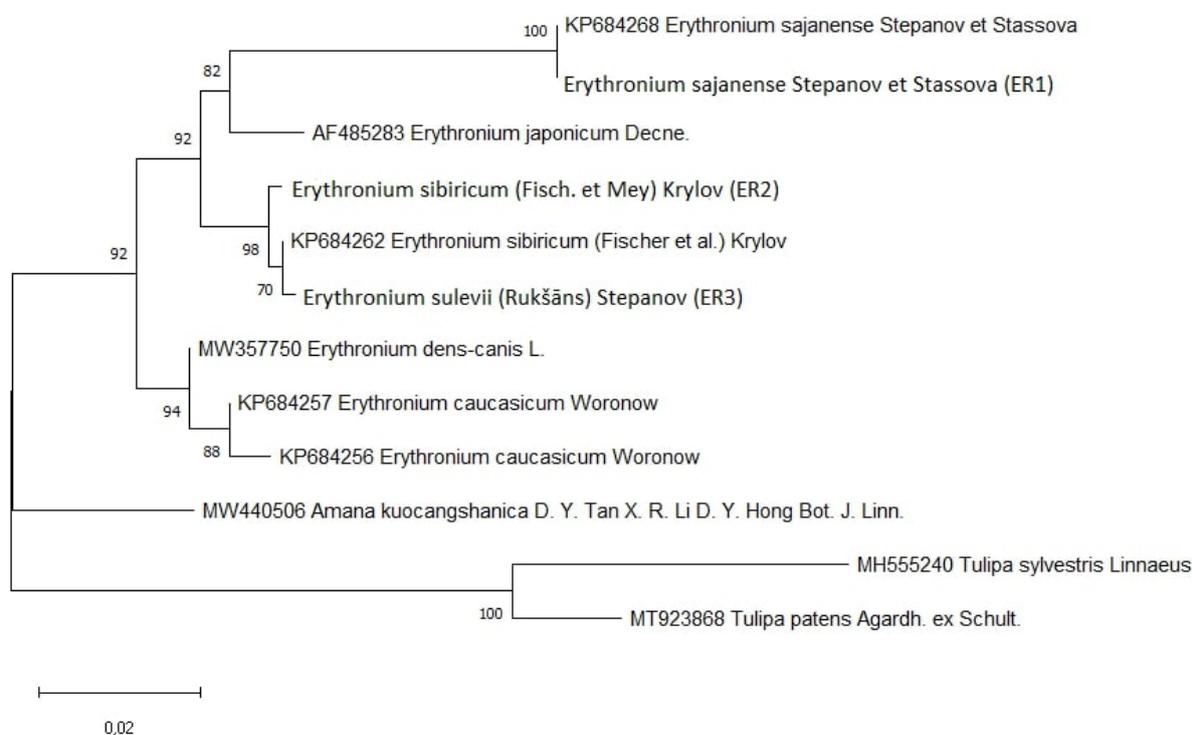


Рис. 2. Филогенетическое дерево видов р. *Erythronium*, построенное на основе последовательностей ITS методом максимального правдоподобия (ML). Цифрами обозначен бутстрэп-индекс.

и *E. sulevii* (ER3) входят в кладу с *E. sibiricum*, к ним также примыкает *E. japonicum*, характеризующийся черными пыльниками. В другую кладу входят евразийские виды – *E. caucasicum* и *E. dens-canis*.

Участок *rbcL* составил 561 нуклеотид. Было выявлено четыре замены (3 транзиции и 1 трансверсия) у *E. sajanense* по сравнению с двумя другими видами, а между *E. sibiricum* и *E. sulevii* замен обнаружено не было. Построенное на основе анализа гена *rbcL* филогенетическое дерево в среднем имеет умеренный уровень поддержки и демонстрирует различия между *E. sajanense* (ER1), объединенным в одну кладу с *E. dens-canis*, и *E. sibiricum* (ER2) и *E. sulevii* (ER3), которые образуют отдельную кладу с высоким уровнем поддержки (95 %). Восточно-североамериканские виды – *E. hendersonii*, *E. albidum*, *E. americanum* – формируют другую кладу.

Секвенированный участок *matK* составил 714 нуклеотидов. Между *E. sajanense* (ER1) и *E. sibiricum* (ER2) / *E. sulevii* (ER3) было обнаружено 3 замены (1 трансверсия и 2 транзиции). Отличий между двумя последними видами обнаружено не было. При рассмотрении филогенетического дерева отмечается объединение *E. sajanense* в одну кладу с *E. japonicum*, *E. dens-canis* и *E. caucasicum*. Образцы *E. sibiricum* и *E. sulevii* образуют отдельную кладу с высоким уровнем поддержки. Вторая группа (*E. hendersonii*, *E. albidum*, *E. americanum*) включает восточно-североамериканские виды.

Таким образом, проведенный морфологический анализ подтвердил, что признаками, по которым можно судить о видовой принадлежности кандыков, являются: форма тычиночных нитей, длина, ширина, форма и окраска лепестков, длина столбика и рыльца пестика.

Из трех исследованных нами видов наиболее четкую видовую обособленность демонстрирует *E. sajanense*, который характеризуется небольшими цветочными; шиловидными тычиночными нитями, резко сужающимися в основании; более компактным рыльцем столбика; четко ограниченной лилово-розовой частью лепестков.

Представленные нами филогенетические деревья так же, как и в других исследованиях (Allen et al., 2003), демонстрируют разделение на евразийские и восточно-североамериканские группы. *E. sajanense* обнаруживает значительные генетические отличия от *E. sibiricum* и *E. sulevii* и часто формирует отдельную кладу с высоким и средним уровнем поддержки.

В ходе исследований выявлено, что наиболее информативным маркером для идентификации видов р. *Erythronium* являются ITS-регионы, которые показывают более высокий уровень вариабельности между отдельными видами и высокий уровень бутстрэп-поддержки узлов построенных филогенетических деревьев.

ЛИТЕРАТУРА

Степанов Н. В., Стасова В. В. О новом таксоне рода кандык (*Erythronium* – Liliaceae) из Западного Саяна // Вестник КрасГАУ, 2011. – № 8. – С. 58–63.

Allen G. A., Soltis D. E., Soltis P. S. Phylogeny and biogeography of *Erythronium* (Liliaceae) inferred from chloroplast *matK* and nuclear rDNA ITS sequences // Systematic Botany, 2003. – Vol. 28. – P. 512–523.

Bartha L., Stepanov N. V., Ruksans J., Banciu H., Keresztes L. Non-monophyly of Siberian *Erythronium* (Liliaceae) leads to the recognition of the formerly neglected *Erythronium sajanense* // Journal of plant research, 2015. – Is. 128. – P. 721–729.

Clennett C. The Genus *Erythronium*. – Royal Botanic Gardens: Kew Publishing, 2014. – 250 p.

Doyle J. J., Doyle J. L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue // Phytochemical Bulletin, 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.

Kassambara F., Mundt F. Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7., 2020.

Rukšāns J. Buried Treasures: Finding and Growing the World's Choicest Bulbs. – Timber Press, 2007. – 524 p.

Takahashi M. Pollen morphology in the genus *Erythronium* (Liliaceae) and its systematic implications // American Journal of Botany, 1987. – № 74. – P. 1254–1262.

Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution, 1993. – Vol. 10, iss. 3. – P. 512–526.

Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Molecular Biology and Evolution, 2021. – Vol. 38, iss. 7. – P. 3022–3027.

Tukey J. W. Comparing individual means in the analysis of variance // Biometrics, 1949. – Vol. 5, iss. 2. – P. 99–114.

WFO: World Flora Online. URL: <http://www.worldfloraonline.org>. (Accessed 14 May 2023).