

УДК 575.174.015.3; 581.4;  
582.736

М. О. Бурляева<sup>1</sup>,  
Д. А. Кривенко<sup>2</sup>,  
Э. М. Мачс<sup>3</sup>,  
А. Ш. Сабитов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный  
исследовательский центр  
Всероссийский институт  
генетических ресурсов  
растений имени  
Н. И. Вавилова,  
190000 Санкт-Петербург,  
ул. Б. Морская д. 42, 44,  
Россия,

e-mail: m.burlyaeva@vir.nw.ru

<sup>2</sup> Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений  
Сибирского отделения  
Российской академии наук,  
664033, Россия, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, д. 132

<sup>3</sup> Ботанический институт им.  
В.Л. Комарова Российской  
академии наук,  
197376, Россия,  
г. Санкт-Петербург,  
ул. Проф. Попова, д. 2

#### Ключевые слова:

*Vicia baicalensis*, *Vicia ohwiana*, *Vicia ramuliflora*, *Vicia unijuga*, *Vicia venosa*, морфологический анализ, кариологический анализ, SSR, ISSR, ITS1-5.8S rRNA-ITS2

#### Поступление:

19.10.2016

#### Принято:

06.12.2016

## ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ТРИБЫ VICIEAE BRONN (FABACEAE LINDL.) ПО ДАННЫМ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ

Актуальность. *Vicia unijuga* A. Br. s. 1 (*V. unijuga* A. Br., *V. ohwiana* Hosok.) трибы *Vicieae* Bronn (Fabaceae Lindl.) характеризуются значительным варьированием морфологических признаков, что затрудняет их идентификацию, систематизацию, сказывается на различии в понимании объемов данных таксонов и усложняет работу с генетическими коллекциями. В связи с этим целью наших исследований являлась оценка генетического разнообразия и дифференциации этого сложного комплекса видов. Материалы и методы. Материалом для исследований послужили образцы, собранные во время экспедиций на российском Дальнем Востоке, в Сибири и Китае. Изучено 100 растений видов *Vicia unijuga* A. Br. s. 1, *V. baicalensis* (Turcz.) B. Fedtsch., *V. ramuliflora* (Maxim.) Ohwi, *V. venosa* (Willd. ex Link) Maxim. секции *Oroboidea* Stankev., ряда *Unijugae* Nikiforova из разных частей ареала. Проведены морфологический, кариологический и молекулярно-генетический анализы. 23 морфологических признака проанализированы с помощью факторного и дискриминантного анализа. Генетическое разнообразие оценивали с использованием микросателлитных маркеров (ISSR, SSR). Для 11 образцов *V. unijuga*, *V. ohwiana*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. venosa* с разными уровнями плоидности были изучены последовательности ITS1-5.8S rRNA-ITS2 ядерного генома. Результаты. Морфологическими признаками, более или менее достоверно дифференцирующими образцы на таксономические группы, являются длина цветоноса, длина листочка, форма прилистника, длина боба, число междоузлий на главном побеге. Цитотипы  $2n = 12, 24$  у *V. unijuga* и *V. ohwiana* встречаются практически на всей территории их ареалов.  $2n = 12$  не является видоспецифичным признаком для *V. ohwiana*. Данные, полученные в результате молекулярно-генетического исследования, не всегда согласуются с результатами морфологического изучения. Растения при внешнем сходстве, могут иметь существенные генетические отличия по микросателлитным локусам. В тоже время, различия между растениями по морфологии не всегда свидетельствуют о наличии аллельного разнообразия. По данным ITS-, SSR- и ISSR-маркирования установлена значительная таксономическая близость *V. unijuga* и *V. ohwiana* с видами *V. baicalensis*, *V. venosa*, *V. ramuliflora*. Заключение. Комплекс видов *V. unijuga* s. 1, составляют генетически родственную группу. Популяции, локализованные на островах Попова и Русский в заливе Петра великого Японского моря и произрастающие вдоль побережья Японского моря, необходимо выделять в самостоятельные таксоны более высокого ранга.

M. O. Burlyaeva<sup>1</sup>,  
D. A. Krivenko<sup>2</sup>,  
E. M. Machs<sup>3</sup>,  
A. S. Sabitov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44, Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg, 190000, Russia, e-mail: m.burlyaeva@vir.nw.ru

<sup>2</sup>Siberian Institute of Plant Physiology & Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 132 Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russia

<sup>3</sup>L. V. Komarov Botanical Institute of Russian Academy of Sciences, 2, Professor Popov St., St. Petersburg, 190000, Russia

**Key words:**

*Vicia baicalensis*, *Vicia ohwiana*, *Vicia ramuliflora*, *Vicia unijuga*, *Vicia venosa*, morphological analysis, karyological analysis, SSR, ISSR, ITS

**Received:**

19.10.2016

**Accepted:**

06.12.2016

**POLYMORPHISM OF SOME SPECIES FROM THE TRIBE VICIEAE BRONN (FABACEAE LINDL.) ACCORDING TO THE DATA OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ANALYSIS**

**Background.** The species *Vicia unijuga* A. Br. s. 1 (*V. unijuga* A. Br., *V. ohwiana* Hosok.) of the tribe *Vicieae* Bronn (Fabaceae Lindl.) are characterized by a significant variation in morphological characters, which hampers their identification and classification, impacts the differences in the understanding of the volume of these taxa, and complicates the work with genetic collections. In this regard, the aim of our study was to assess the genetic diversity and differentiation of this complex species. **Materials and methods.** The material for the research were the samples collected during expeditions to the Russian Far East, Siberia and China. One hundred accessions of the species *Vicia unijuga* A. Br. s. 1, *V. baicalensis* (Turcz.) B. Fedtsch., *V. ramuliflora* (Maxim.) Ohwi, *V. venosa* (Willd. ex Link) Maxim. section *Oroboidea* Stankev. series *Unijugae* Nikiforova from different parts of their area of distribution have been studied. **Morphological, karyological and molecular genetic analyses** of these accessions have been performed. Twenty-three morphological characters were analyzed using factor and discriminant analyses. The chromosome numbers have been counted. Genetic diversity was assessed using microsatellite markers (ISSR, SSR). For 11 accessions of *V. unijuga*, *V. ohwiana*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. venosa* with different ploidy levels, the sequences ITS1-5.8S rRNA-ITS2 of the nuclear genome have been studied. **Results.** Morphological characters more or less reliably differentiating the accessions into taxonomic groups are peduncle length, leaf length, stipule shape, the length of the bean, and the number of internodes on the main stem. The cytotypes  $2n = 12$ ,  $2n = 24$  of *V. unijuga* and *V. ohwiana* occur almost over the entire territory of their areas.  $2n = 12$  is not species-specific characteristics for *V. ohwiana*. The data obtained as a result of molecular genetic studies are not always consistent with the results of the morphological study. Plants, despite their visual resemblance, may have significant genetic differences in microsatellite loci. At the same time, differences in morphological characters between plants do not always attest to the presence of allele diversity. The ITS, SSR and ISSR marker analyses revealed a significant taxonomic proximity *V. unijuga* and *V. ohwiana* with species *V. baicalensis*, *V. ramuliflora* and *V. venosa*. **Conclusion.** The complex species *V. unijuga* s. 1 is a genetically heterogeneous group. Populations localized on Popov and Russky Islands in the Peter the Great Gulf and growing along the coast of the Sea of Japan should be classified into independent taxa of a higher rank.

### Введение

*Vicia unijuga* A. Br. – полиморфный, сибирско-дальневосточный вид, один из наиболее древних представителей секции *Oroboidea* Stankev. (Nikiforova, 1988). Нередко разводится в садах как красиво цветущий многолетник, имеет кормовое значение и содержание белка в траве от 14,59 до 17,52%. Наибольшее разнообразие рас и форм произрастает во влажных широколиственных лесах Кореи, Японии, Китая. Полиморфизм *V. unijuga* находит отражение в существовании внутри вида кариологических рас,  $2n = 12, 14, 24, 36$ . Западная граница ареала вида проходит в верховьях р. Оби, северная по  $57^{\circ}$ с. ш. Встречается он также в северной Монголии и на российском Дальнем Востоке. В центральной части ареала вида (Алтай-Примурье) – очаге происхождения – обитают все цитотипы. В Южной Сибири, Северной Монголии и Приморье обнаружены только диплоидные хромосомные расы (Repjev, Stankevich, 1999). По мнению О. Д. Никифоровой (Nikiforova, 1988), Н. Н. Грузенкова с соавторами (Gurzenkov et al., 1995) и некоторых других, на территории Сибири вид довольно стабилен и мономорфен, имеет кариотип  $2n = 12$ . Полиплоидные хромосомные расы встречаются только в Японии и Приморье. На Дальнем Востоке *V. unijuga*, по-видимому, представлен несколькими «мелкими» видами, требующими детального и всестороннего изучения с  $2n = 12, 14, 24, 36$ . Наиболее древней считается диплоидная хромосомная раса ( $2n = 12$ ), которая ранее, по-видимому, произрастала в третичных лесах Азии. Похолодание привело к отступлению этих лесов на юг. Благоприятные климатические условия Северо-Восточной Азии способствовали образованию новых форм, разновидностей и узкоэндемичных видов, близких к *V. unijuga*. Так, например, относительно недавно из северной части п-ва Корея описан вид *V. ohwiana* Hosok. Однако часто *V. unijuga* по-прежнему синонимизируется с амуро-корейским видом *V. ohwiana* ( $2n = 12$ ) (Repjev, Stankevich, 1999).

До настоящего времени среди исследователей рода *Vicia* L. существуют разные точки зрения на объем вида *V. unijuga*. Одни принимают его в широком объеме Б. А. Федченко (Fedtschenko, 1948), Kupicha (Kupicha, 1976), А. К. Станкевич (Repjev, Stankevich, 1999) и др. При этом, монограф рода Вика F.C.

Kupicha (Kupicha, 1976) в своей классификации синонимизирует его с *Vicia lathyroides* L., а А. К. Станкевич в книге «Культурная флора. Вика» (Repjev, Stankevich, 1999) относит к роду *Orobis* L., как *O. lathyroides* L. Другие рассматривают его как *V. aggr. unijuga* (Nikiforova, 1988; Probatova et al., 2005; Wojian, Turland, 2010).

Наиболее варьирующими признаками в этом таксоне являются форма и размер листочков, прилистников и цветоносов. По их параметрам и проводится внутри- и межвидовая дифференциация этой группы растений. *V. unijuga* характеризуется: соцветием, значительно более длинным, чем лист; листочками ланцетной или яйцевидной формы; полустреловидными, зубчатыми прилистниками. *V. ohwiana* отличается почти сидячими в пазухах листьев соцветиями, широкояйцевидными или ромбовидными листочками и яйцевидными прилистниками без зубцов. Эти виды произрастают в одних и тех же условиях, но *V. ohwiana* имеет более узкий ареал, включающий южное Приморье, Северо-Восточный Китай, Японию и Корею. Рядом ботаников в пределах этой группы выделяется *V. unijuga* var. *apoda* Maxim. (переходная форма между *V. unijuga* и *V. ohwiana*, имеет соцветие одинаковой длины с листом, широкояйцевидные листочки и яйцевидные, зубчатые прилистники). Следует отметить, что на Дальнем Востоке встречаются множество форм, характеризующихся разнообразными сочетаниями морфологических признаков. Во «Flora of China» (Wojian, Turland, 2010) для *V. unijuga* приводятся 7 разновидностей: *V. unijuga* var. *breviramea* Nakai, *V. unijuga* var. *angustifolia* Nakai, *V. unijuga* var. *ciliata* H. Lév., *V. unijuga* var. *integristipula* H. Lév., *V. unijuga* var. *kausanensis* H. Lév., *V. unijuga* var. *lobata* Seok et B.H. Choi, *V. unijuga* subsp. *minor* (Nakai) Y.N. Lee, *V. unijuga* var. *ouensanensis* H. Lév.

Комплексного изучения морфологического и генетического разнообразия видов ряда *Unijugae* Nikiforova., произрастающих на территории России, не проводилось. В современных филогенетических исследованиях видов трибы *Viciae*, проведенных с помощью изучения высоковариабельных участков ядерных и хлоропластных геномов, вопрос по внутри- и межвидовой дифференциации видов ряда *Unijugae* не изучался. В большинстве работ анализировался только один представитель – *V. unijuga*. По данным,

полученным в результате RAPD- и ISSR-анализа представителей *V. unijuga* – *V. ohwiana* (из мировой коллекции генетического банка ВИР, собранных нами в ходе экспедиций на Дальнем Востоке), и данным Y. Nan, H.Y. Wang (2010), изучавшим популяции в Китае, эти виды отличаются значительным полиморфизмом.

Одной из приоритетных задач генетических банков, в том числе и ВИР, является не только сбор образцов, но и сохранение всего богатства генетической изменчивости форм культурных растений и их дикорастущих родичей. Формирование коллекций невозможно без знаний уровня генетической дифференциации вида, структуры его популяций и таксономического статуса растений (образцов). В связи с этим целью нашего исследования является анализ уровня генетического разнообразия дикорастущих популяций видов/подвидов/разновидностей ряда *Unijugae* на основе сравнительного морфологического, кариологического и молекулярно-генетического анализов.

### Материалы и методы

Материал для работы собран в экспедициях 2010–2015 гг. на российском Дальнем Востоке (Приморский и Хабаровский кр.), в Сибири (Республика Бурятия, Алтайский и Забайкальский кр., Иркутская, Кемеровская, Новосибирская и Свердловская обл.) и Китае (рис. 1). Кроме того, изучались растения, произрастающие на территории Сихотэ-Алинского государственного природного биосферного заповедника имени К. Г. Абрамова (Приморский кр.). Объектами исследования являлись образцы из природных популяций видов комплекса *V. unijuga* – *V. ohwiana* и близкородственные виды из секции *Oroboidea*, ряда *Unijugae* – *V. venosa* (Willd.ex Link) Maxim. и *V. baicalensis* (Turcz.) B. Fedtsch., часто объединяемые в один вид под названием *V. ramuliflora* (Maxim.) Ohwi.



Рис. 1. Карта мест сбора образцов *Vicia unijuga* s.l.

Fig. 1. Map showing collecting sites of the accessions of *Vicia unijuga* s.l.

Анализировали 5–7 растений из каждого местонахождения. Фиксация материала и описание образцов были проведены в следующих пунктах: 1 – Иркутская обл., Баяндовский р-н; 2, 13, 25 – Приморский кр., Тернейский р-н, кордон Благодатный и р. Сухой ключ; 3, 4, 5 – Приморский кр., окрестности

г. Владивостока, р. Богатая; 6 – Приморский кр., бухта Пионерская; 7, 8 – Приморский кр., Хасанский р-н, п. Витязь; 9 – Приморский кр., Хасанский р-н, мыс Шульца; 10, 11 – Приморский кр., Хасанский р-н, бухта Теляковского; 12 – Приморский кр., Хасанский р-н, бухта Астафьева; 14, 15, 26 – Приморский

кр., о. Русский; 16, 17, 18 – Приморский кр., о. Попова; 19 – Приморский кр., Хасанский р-н, р. Туманная; 20, 21 – Иркутская обл., Жигаловский р-н; 22 – Китай, провинция Хэйлунцзян, г. Ичунь; 23 – Хабаровский кр., пригород г. Хабаровска, р. Амур; 24 – Приморский кр., Шкотовский р-н; 27 – Свердловская обл.; 28 – Кемеровская обл.; 29 – Новосибирская обл.; 30 – Читинская обл., 31 – Алтайский кр. Для молекулярных исследований дополнительно привлекались *V. unijuga*: 32 – Алтайский кр.; 158 – Приморский кр., бухта Пионерская; 414, 452 – Новосибирская обл., а также образцы из других родов трибы *Vicieae*: *Pisum sativum* L. (Россия), *Lathyrus pratensis* L. (Россия), *L. sativus* L. (Таджикистан). Кроме того, для выявления более достоверных диагностических признаков, определяющих таксономические границы и дифференциацию популяций видов группы *V. unijuga*, проведен сравнительный морфологический анализ образцов, хранящихся в гербариях: LE (БИН им. В. Л. Комарова РАН), WIR (ВИР им. Н. И. Вавилова, г. Санкт-Петербург), IRK (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск). В этих же целях проанализированы данные по обследованию природных популяций, полученные во время экспедиций. Изучались следующие 23 морфометрических признака: высота растения; длина 5-го междоузлия; диаметр стебля; число ветвей на растение; число междоузлий на главном стебле; длина, ширина листочка и прилистника; длина цветоноса, черешка, шипика, цветоножки и чашечки; форма прилистника, листочка, цветоноса и боба; число цветков на соцветии; длина и ширина боба; наличие аномалий в строение листочка (тератологии). Статистическая обработка данных осуществлена посредством факторного и дискриминантного анализа в программе Statistica 7. Для правильного понимания типа генома и уровня пloidности исследуемых объектов проведен подсчет чисел хромосом (Krivenko, Burlyueva, 2016). Молекулярно-генетический анализ проведен на геномной ДНК, выделенной из проростков. Семена проращивали на фильтровальной бумаге в термостате при

температуре 24°C. Выделение ДНК проводили с помощью К-ацетатного метода, предложенного S. K. Edward, J. C. Thompson (1991).

**ISSR-анализ.** Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в соответствии с протоколом для ISSR-анализов бобовых культур. Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 25 мкл содержала 50 нг геномной ДНК, 2,5 мкл 10×буфера, 1 мкл 2,5 мМ раствора дезоксинуклеотидов, 0,2 мкл Tag-полимеразы (5 ед/мкл), 1,2 мкл праймера (10 пМ/мкл). ПЦР проводили в амплификаторе MyCycler (BioRad) в следующих условиях: цикл 1 – 5 мин. при 94°C; циклы 2–38 – 30 сек. при 94°C, 45 сек. при разной температуре (таблица), 50 сек. при 72°C; цикл 39 – 10 мин. при 72°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,8% агарозном геле в 1×TAE буфере с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью Transilluminator UVP Bio Doc-It™ Imaging System модель M-20. Размеры амплифицированных фрагментов определяли при помощи маркера молекулярного веса 1 kb GeneRuler DNA Ladder Mix, SM0333.

**SSR-анализ.** ПЦР проводили в соответствии с протоколом для SSR-анализов видов рода *Lathyrus* L., с SSR-праймерами, разработанными нами в предыдущих исследованиях T. Yang et al. (2014), Wang Fang et al. (2015). Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 1,5 мкл 50 нг геномной ДНК, 2,0 мкл 10×буфера, 0,2 мкл 2,5 мМ раствора дезоксинуклеотидов, 0,5 мкл Tag-полимеразы (5 ед/мкл), 1,0 мкл праймера (10 пМ/мкл). ПЦР проводили в амплификаторе MyCycler (BioRad) в следующих условиях: цикл 1 – 5 мин. при 95°C; циклы 2–35 – 30 сек. при 95°C, 30 сек. при разной температуре для SSR-праймеров, 45 сек. при 72°C; цикл 36 – 10 мин. при 72°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 8% акриламидном геле в 1×TAE буфере с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью Transilluminator UVP Bio Doc-It™ Imaging System модель M-20. Размеры амплифицированных фрагментов определяли при помощи маркера молекулярного веса MassRuler™ Low Range DNA Ladder, SM0383.

**Температура отжига и последовательности ISSR-праймеров**  
**Optimized annealing temperature and sequence of ISSR primers**

№	ISSR-праймер	Последовательность праймера	Температура отжига, °C
1	M1	(AC) <sub>8</sub> CG	60
2	M2	(AC) <sub>8</sub> (C/T)G	60
3	M8	(GTG) <sub>5</sub>	60
4	M9	(GACAC) <sub>4</sub>	65
5	M10	(CA) <sub>6</sub> (A/G)G	48
6	M11	(CA) <sub>6</sub> (A/G)	43
7	M12	(CA) <sub>6</sub> (A/G)(C/T)	49
8	M13	(AGC) <sub>4</sub> (C/T)	48

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. Характер и степень изменчивости спектров ISSR- и SSR-фрагментов анализировали в отношении праймера и образца. На основании суммарной матрицы ISSR- и SSR-спектров для типовых образцов из популяций была построена дендрограмма, демонстрирующая филогенетические отношения между изучаемыми популяциями. Для построения дендрограммы применялся метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы TREECON. Для 11 образцов *V. baicalensis*, *V. ohwiana*, *V. ramuliflora*, *V. unijuga* и *V. venosa* с разными уровнями пloidности были изучены последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1-5.8S rRNA-ITS2 ядерного генома. ПЦР-анализ области ITS1-5.8S-ITS2 области проводили в соответствии с методикой (Mullis et al., 1986). Для амплификации использовали праймеры ITS1P (Ridgway et al., 2003) и ITS4 (White et al., 1990). Секвенирование амплифицированных последовательностей было проведено по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977) на секвенаторе AB 3130 Центра коллективного пользования БИН им. В. Л. Комарова РАН «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» (г. Санкт-Петербург). Выравнивание последовательностей и анализ матрицы данных выполняли с помощью пакета программ MEGA 5.0. (Tamura et al., 2011) и корректировали вручную. Дерево консенсуса

тестировалось бутстрэп-методом (Felsenstein, 1985).

### Результаты и обсуждение

При изучении морфологических признаков в комплексе видов *V. unijuga* – *V. ohwiana* был установлен значительный внутривидовой полиморфизм. Факторный (компонентный) анализ, проведенный для всех образцов в популяциях, выявил три основных фактора, определяющих 49% общей дисперсии признаков.

В Факторе 1 (F1 – 19,9% дисперсии) наблюдалась положительная сильная взаимосвязь между длиной цветоноса, черешка, чашечки и шипика листа; числом ветвей на растении, формой листочков, числом цветков на соцветие и шириной боба и отрицательная с шириной листочка. Ведущим являлся признак длина цветоноса, т. е. чем длиннее цветоносы, тем больше на них цветков, ветвей на растении, длиннее чашечка и шипик листа, шире боб и уже листочки. И, наоборот, для растений с широкими листьями характерны короткие цветоносы, отсутствие ветвистости и невысокие показатели по остальным, вышеперечисленным признакам.

В Факторе 2 (F2 – 16,1% дисперсии) объединились признаки: длина листа, форма и длина прилистника, длина боба, пloidность растения и диаметр стебля. Все признаки связаны положительно. Этот фактор можно интерпретировать, как фактор размеров органов растения, т. е. для растений с большим числом хромосом характерны более длинные листья, бобы, прилистники и больший диаметр стебля.

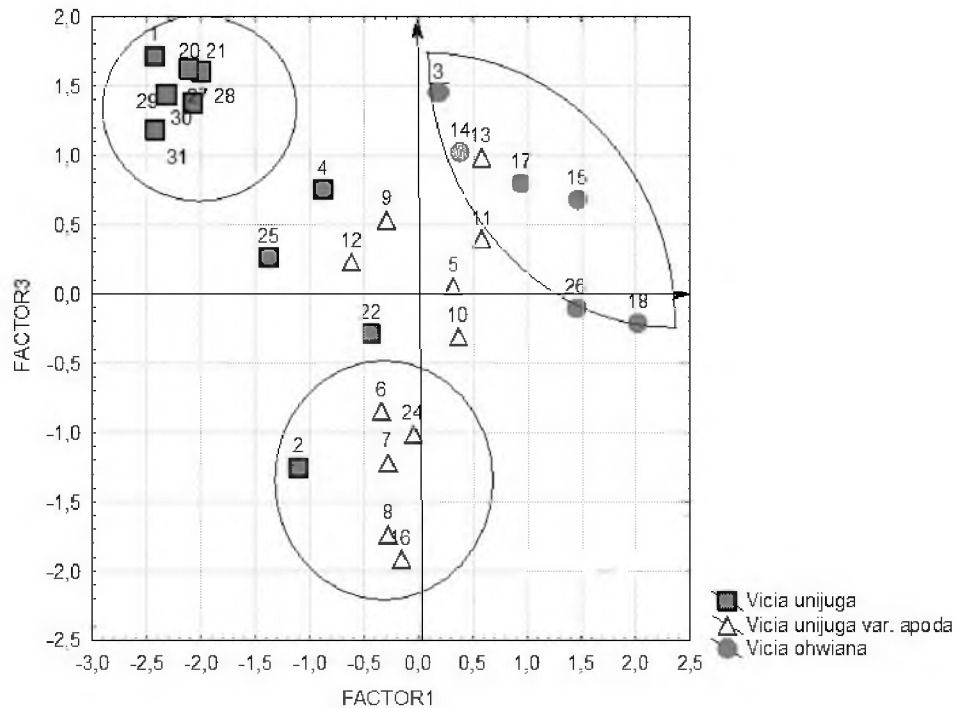
Фактор 3 (F3 – 14,0% дисперсии) – описывал сильную взаимосвязь между числом междоузлий на главном побеге и аномалиями

в развитие листочка (наличие 3-х листочков, 2-3-4-х глубоких лопастей листочка). Также в этом факторе наблюдалась более слабая корреляция с плоидностью растений. Следует отметить, что признак число хромосом оказался трансгрессивным и был взаимосвязан с несколькими корреляционными плеядами (с F2 и F3).

Признаки – высота растения, длина 5-го междоузлия, длина черешка и цветоножки, форма цветоноса и боба – не образовывали

существенных корреляционных связей и не играли значимой роли в согласованной изменчивости остальных признаков.

Таким образом, признаками, позволяющими более или менее достоверно классифицировать образцы по таксонам *V. unijuga*, *V. unijuga* var. *apoda*, *V. ohwiana* являются – длина цветоноса, длина листочка, форма прилистника, длина боба, число междоузлий на главном побеге.



**Рис. 2. Распределение образцов *Vicia unijuga* – *V. ohwiana* разного географического происхождения по морфологическим признакам в пространстве первого (FACTOR 1) и третьего (FACTOR 3) факторов**

**Fig. 2. Factor scores (FACTOR 1 & FACTOR 3) for morphological characters in the accessions of *Vicia unijuga* – *V. ohwiana***

Учитывая, что два первых фактора характеризуют большую часть изменчивости признаков, мы рассматривали распределения образцов только в их пространстве. При анализе расположения образцов по таксонам выявлено, что образцы, отнесенные нами к *V. unijuga* var. *apoda*, занимают промежуточное положение между *V. unijuga* и *V. ohwiana* (рис. 2). Между растениями, принадлежащими к разным таксонам, нет четких границ. Ряд образцов занимает промежуточное положение. Аналогичные результаты были получены и при дискриминантном анализе морфологических признаков дикорастущих растений комплекса *V. unijuga* – *V. ohwiana*.

Анализ образцов по таксонам в классификационной матрице и рассмотрение квадратов расстояния Махаланобиса для *V. unijuga* var. *apoda* и растений, неподдающихся определению, показали неоднозначный результат классификации. Данные образцы находились примерно на одинаковом расстоянии от образцов, принадлежащих к *V. unijuga* и *V. ohwiana*. Изучение взаимосвязей между морфологическими признаками и происхождением показал, что образцы популяции Иркутской обл. (№ 1), г. Владивостока (№ 3), Хасанского р-на (№ 8), о. Русский (№ 16) и о. Попова (№ 18) наиболее четко отличаются от растений, произрастающих в других частях

ареала. Они занимают крайние положения на рисунке 2. Образцы популяций из Иркутской, Новосибирской, Читинской, Кемеровской обл. и Алтайского кр. (№ 1, 20, 21, 27-31) находятся в области типичных представителей *V. unijuga*. На графике они располагаются в зоне растений с длинными соцветиями, большим числом ветвей и относительно узкими листьями. Справа в середине и вверху сосредоточились типичные образцы *V. ohwiana*, растения из популяций с о. Попова и о. Русский (№ 14, 15, 17, 18, 26) и из пригорода Владивостока (№ 3), а также отнесенный нами к *V. unijuga* var. *apoda* № 13 с побережья Татарского пролива (Тернейский р-н, Приморский кр.). На рисунке – это зона растений с почти сидячими в пазухах листьев соцветиями, широкояйцевидными или ромбовидными листочками, с малым числом ветвей. В нижней части графика сгруппировались образцы из популяций Приморского кр., определенные нами как *V. unijuga* var. *apoda* (№ 6 – бухта Пионерская, окрестности г. Владивосток, № 7, 8 – п. Витязь, Хасанский р-н, № 16 – о. Попова, № 24 – Шкотовский р-н) и *V. unijuga* (№ 2 – Тернейский р-н, кордон Багодатный). Все растения (кроме № 24) были собраны на сопках рядом с побережьем. Растения характеризовались:  $2n = 24$ , средними значениями длины цветоноса, параметров листочков и числа ветвей, и отличались от других групп увеличенным числом узлов на главном стебле и более частой встречаемостью листочков с тератологическими изменениями. Популяции из Приморского кр. с № 4, 25 (Тернейский р-н), 5 (окрестности г. Владивостока), 9 (мыс Шульца), 10, 11 (бухта Теляковского), 12 (бухта Астафьева) и Китая 22 (окрестности г. Ичунь) размещаются в середине графика и по морфологическим признакам имеют промежуточные характеристики. Таким образом, по морфологическим признакам и происхождению образцов можно условно выделить 4 группы. Три из них имеют более или менее четкие очертания, четвертая не имеет явных границ и образует области трангрессии с другими группами.

Наибольшее разнообразие форм растений в популяциях наблюдалось в окрестностях Владивостока, Тернейском и Хасанском районах Приморского кр. Нередко растения сочетали в себе признаки как *V. unijuga*, так и *V. ohwiana* и не поддавались определению. На одном растении можно было встретить все типы соцветия (с укороченными и длинными цветоносами), разной формой прилистников и листочков. Геном рода *Vicia* очень сложен, его дивергенция и темпы эволюции структур ДНК очень высоки, и, по мнению

ряда ученых, не связаны с развитием морфологических признаков (Repjev, Stankevich, 1999). Анализ подсчета чисел хромосом показал, что особи с  $2n = 12$  и с  $2n = 24$  в равной степени встречаются у *V. ohwiana* – *V. unijuga* на протяжении всего ареала видов. Наши данные не подтвердили мнение Н. Н. Гурзенкова с соавторами (Gurzenkov et al., 1995), которые считали, что для *V. ohwiana* число хромосом равное  $2n = 12$  является видоспецифичным признаком. Нами выявлены представители этого вида с  $2n = 24$  с о. Попова и из окрестностей Владивостока (Krivenko, Burlyeva, 2016). Таким образом, можно утверждать, что цитотипы  $2n = 12$  и  $2n = 24$  характерны для *V. unijuga*, включая *V. ohwiana*, на протяжении всего ареала. Кроме морфологического и кариологического изучения для *V. unijuga* было осуществлено молекулярное маркирование ядерного генома и проведен сравнительный молекулярно-генетический анализ микросателлитных последовательностей (SSR и ISSR). По итогам ISSR-анализа число суммарных зон, полученных при амплификации всех образцов *V. unijuga* (принимаемом нами в широком объеме (включая *V. ohwiana*) с каждым из праймеров, варьировало от 10 до 77. Всего было обнаружено 285 полиморфных амплифицированных фрагментов. Исследуемые образцы сильно различались также по числу уникальных ампликонов. В наибольшей степени выделялись образцы с о. Русский, Китая, о. Попова и окрестностей Владивостока. В итоге для каждого из анализируемых образцов были идентифицированы индивидуальные ISSR-спектры амплифицированных фрагментов ДНК. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах от 100 до 3000 пн. По результатам SSR-анализа для каждого из анализируемых образцов были также идентифицированы индивидуальные SSR-спектры амплифицированных фрагментов ДНК. Образцы отличались значительным уровнем внутривидового и внутривидового полиморфизма. Основная зона разделения фрагментов у образцов находилась в пределах от 50 до 260 пн. Число аллелей варьировало от 1 до 8. Наибольшее число аллелей наблюдалось у образцов из Приморского края и Китая, у образцов из популяций Иркутской, Новосибирской, Кемеровской, Алтайской, Читинской обл. по ряду праймеров – только одна аллель. В ходе маркирования микросателлитных локусов было выявлено очень большое генетическое разнообразие природных популяций *V. unijuga* и определена высокая степень сходства этих видов с другими видами из



секции *Oroboidea*, ряда *Unijugae* – *V. ramuliflora*, *V. venosa*, *V. baicalensis*. На дендрограмме (UPGMA) образцы из разных мест происхождения распределились практически полнотомичными ветвями, в некоторых случаях объединяясь в субклады с другими близкородственными видами (рис. 3). Относительно близкими оказались образцы *V. unijuga* из Иркутской, Новосибирской, Ке-

меровской, Алтайской, Читинской обл. Большинство образцов, определяемые как *V. unijuga* var. *apoda*, сформировали свою группу и объединились в субклад вместе с образцами *V. unijuga* из Приморского края. Часть образцов *V. unijuga* из Приморского кр., Иркутской обл. и Китая и *V. ohwiana* с о. Русский образовали самостоятельные ветви.

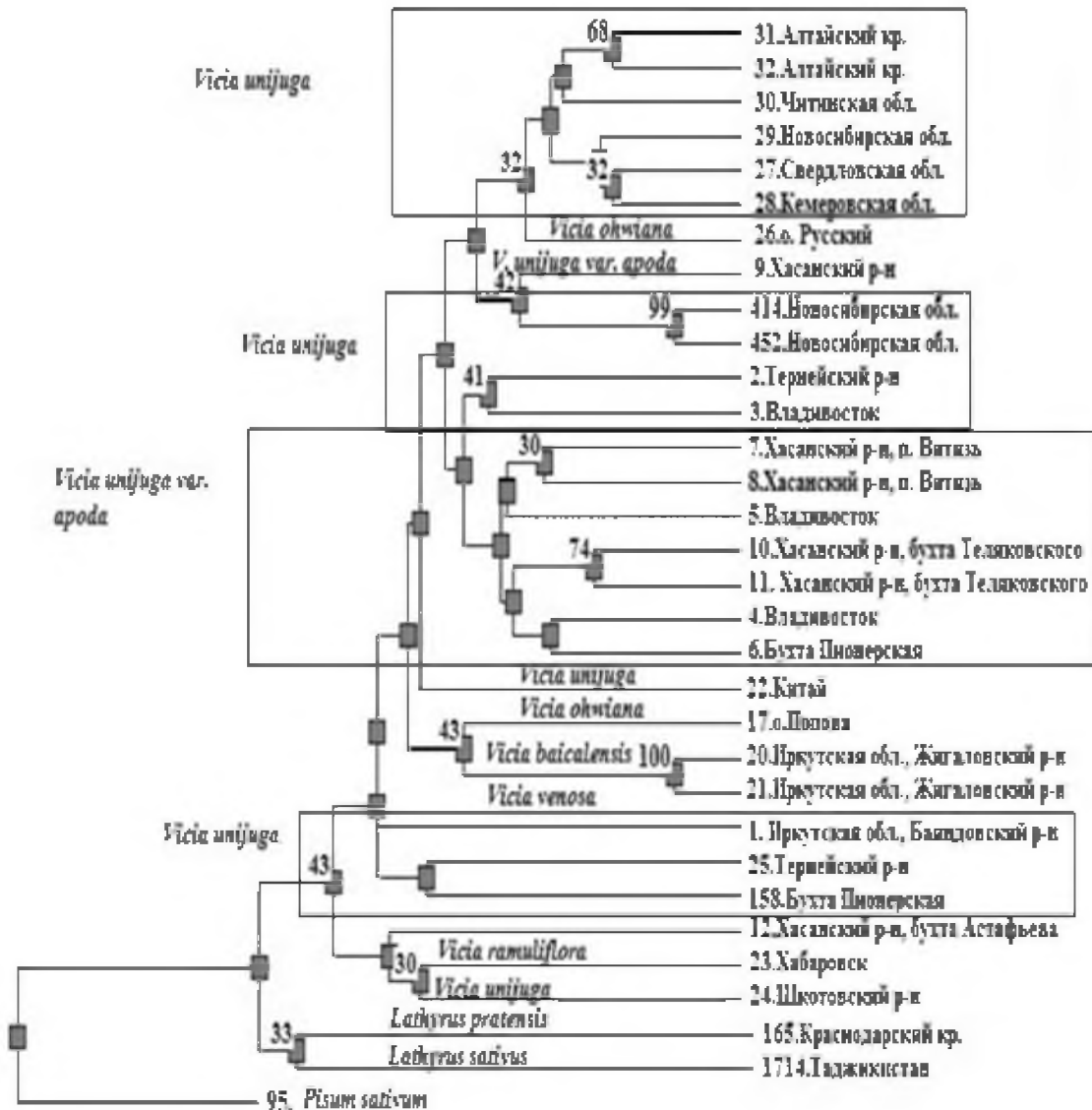


Рис. 3. Дендрограмма UPGMA, построенная на основе сравнительного анализа полиморфных амплифицированных SSR- и ISSR-фрагментов образцов *Vicia unijuga*, *V. ohwiana* разного географического происхождения, *Lathyrus pratensis*, *L. sativus*, *Pisum sativum*, *Vicia baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. venosa*

Fig. 3. UPGMA dendrogram based on the comparative analysis of polymorphic amplified SSR and ISSR fragments of the accessions of *Vicia unijuga*, *V. ohwiana* of various geographic origin, *Lathyrus pratensis*, *L. sativus*, *Pisum sativum*, *Vicia baicalensis*, *V. ramuliflora* and *V. venosa*.

Подобная картина наблюдалась и на построенном нами для реконструкции эволюционных отношений оптимальном дереве согласия (критерий оптимальности максимальная парсимония). В качестве внешней группы использовали *Pisum sativum* и *Lathyrus sativus*. Доля гомоплазии от общего числа изменений признаков была равна  $C_1 = 28$ , число синапоморфий –  $R_1 = 46$ .

На кладограмме отмечалось невысокое число апоморфных признаков. Клады, были сформированы аналогично, кластерам, выявленным нами ранее по матрице расстояний методом наименьших квадратов (UPGMA). Образцы из Китая, о. Попова, о. Русский и некоторые другие, выделялись большим числом апоморфий.

Среди молекулярных методов для филогенетики и диагностики видов довольно часто используется анализ последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2. Из них, ITS2 может быть наиболее информативной для дискриминации на уровне видов и подвидов (Song et al., 2012).

Для 11 образцов нами были изучены последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1-ген 5,8S рРНК-ITS2 ядерного генома. Проведенный анализ ITS-области показал большое сходство последовательностей у видов секции *Oroboidea*. Аналогичная картина была выявлена нами и ранее при сравнении *V. unijuga* с родственным, но значительно отличающимся по морфологическим признакам *V. pseudo-orobus* Fisch. et C.A. Mey. (Ryzhova et al., 2007). Число нуклеотидных замен у изученных образцов *V. unijuga*, *V. ohwiana* и хорошо отличающегося от них по морфологии *V. ramuliflora*, составляет около 1% от длины секвенированного фрагмента (740 пар нуклеотидов). Анализ дерева генетических расстояний (метод ближайшего соседа (NJ) и максимального правдоподобия (ML) с построением консенсусного дерева на основе бутстреп теста) показал, что образцы *V. unijuga* формируют отдельную кладу с достаточно высокой поддержкой, а образцы *V. ohwiana* – нет (рис. 4).

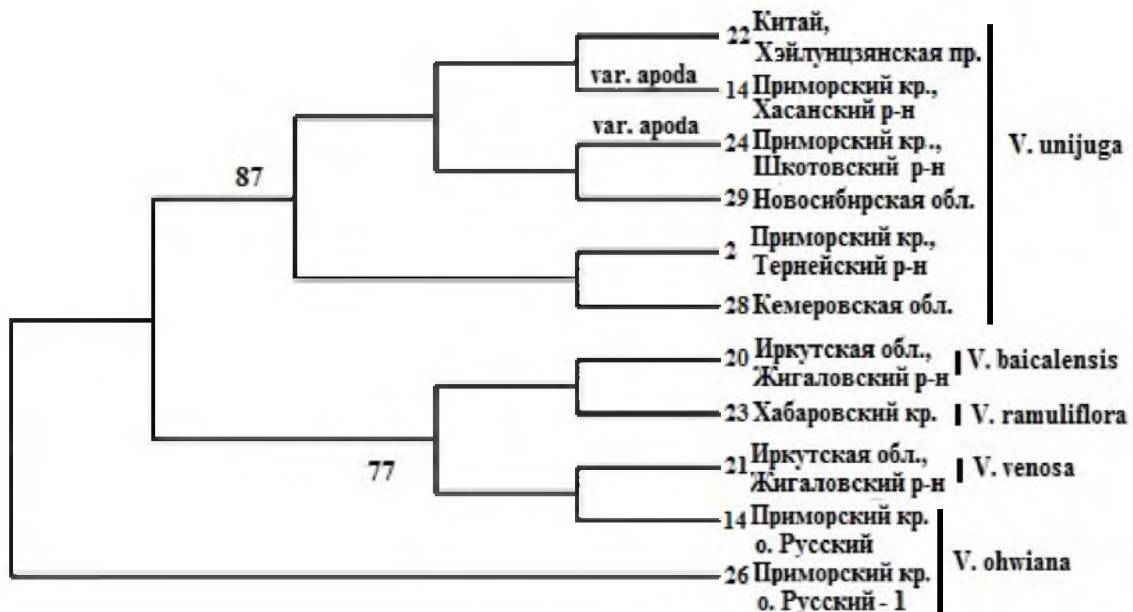


Рис. 4. Консенсусное дерево, построенное на основе бутстреп теста по ITS *Vicia unijuga*, *V. ohwiana*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. venosa*

Fig. 4. The consensus tree constructed on the basis of a test for the ITS region for bootstrap for *Vicia unijuga*, *V. ohwiana*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. venosa*

Анализ замен нуклеотидов показывает, что изученные образцы можно разделить на

три группы по характерным заменам. Первая группа состоит из одного образца *V. ohwiana*

№ 15 (о. Русский), имеющего три отличительные особенности: замена G на A в позиции 100, вставка T в позиции 103 и замена G на A в кодирующем участке гена в позиции 416. Вторая группа включает *V. venosa*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. ohwiana* (№ 14 – о. Русский). Эту группу отличает от третьей группы замена A/C в позиции 124 и

неполиморфный нуклеотид A в позиции 488. Третья группа (рис. 5) включает *V. unijuga* (№ 22 – Китай, 25 – Тернейский р-н, 28 – Кемеровская обл., 29 – Новосибирская обл.), *V. unijuga* var. *apoda* (№ 24 – Приморский кр., Шкотовский р-н; 7 – Приморский кр., Хасанский р-н).



Рис. 5. Нуклеотидный полиморфизм последовательностей ITS1-5.8S rRNA-ITS2 у исследованных образцов *Vicia unijuga*, *V. ohwiana*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora*, *V. venosa*

Fig. 5. Nucleotide polymorphism of the sequences ITS1-5.8S rRNA-ITS 2 in the studied accessions of *Vicia unijuga*, *V. ohwiana*, *V. baicalensis*, *V. ramuliflora* and *V. venosa*

В наших молекулярно-генетических исследованиях тоже наблюдалась близость *V. baicalensis*, *V. venosa*, *V. ramuliflora* с *V. ohwiana*. Этот факт свидетельствует о сложности однозначного решения в вопросах объемов *V. unijuga* и *V. ohwiana*. Исходя из вышесказанного понятно, что для выяснения таксономического статуса (вид/подвид) этой группы растений необходимо привлечение дополнительного материала из аналогичных частей ареала.

Интересно, что большая близость *V. unijuga* и *V. baicalensis* отмечалась при RAPD- и ISSR-анализе генетического разнообразия 11-ти популяций из северо-восточного Китая (Han, Wang; 2010). Авторы отмечают высокую генетическую изменчивость в популяциях этих двух видов и указывают, исходя из

дендрограммы UPGMA (где внешней группой является *V. cracca* L.), что по сравнению с другими видами рода *Vicia* они наиболее сходны. По их мнению, малая молекулярная дисперсия между этими видами, указывает на то, что они имели общего предка. Результаты нашего исследования не противоречат этому выводу.

### Заключение

Комплексное морфологическое, кариологическое и молекулярно-генетическое изучение выявило высокое разнообразие видов ряда *Unijugae* в природных популяциях по всем изученным признакам. Наибольшая вариабельность генотипов отмечалась в Приморском крае. На этой территории чаще встречались образцы, несущие редкие аллели

и были обнаружены растения, характеризующиеся необычными морфологическими признаками (двумя парами листочков, рассеченными на лопасти листьями, крупными неоппадающими прицветниками и т.д.). Высокий уровень генетического разнообразия на территории Приморья подтверждает предположение о том, что эта область была рефугиумом во время похолодания или других изменений климата.

Основными морфологическими признаками, дифференцирующими исследованные образцы на таксономические группы, являются длина цветоноса, длина листочка, форма прилистника, длина боба, число междоузлий на главном побеге. Эти группы могут трактоваться в качестве самостоятельных, но морфологически крайне сходных таксонов.

Анализ подсчета чисел хромосом показал, что цитотипы  $2n = 12$  и  $2n = 24$  встречаются, как у *V. unijuga*, так и у *V. ohwiana* на всем их ареале.  $2n = 12$  не является видоспецифичным признаком для *V. ohwiana*.

Для ряда образцов *V. unijuga*, и *V. ohwiana* по данным ITS-, SSR- и ISSR-маркирования была установлена таксономическая близость с видами *V. baicalensis*, *V. venosa*, *V. ramuliflora*.

Данные, полученные в результате молекулярно-генетического исследования, не всегда согласуются с результатами морфологического изучения. Растения при внешнем сходстве, могут иметь существенные генетические отличия по микросателлитным локусам. В то же время, некоторые различия между растениями по морфологическим признаками не всегда свидетельствуют о наличии аллельного разнообразия.

Большинство представителей, включенных в этот сложный с точки зрения систематики комплекс видов *V. unijuga* s. l., составляют генетически разнородную группу, вероятно, требующую выделения нескольких видовых таксонов. Особенно для групп растений:

1 – локализованных на островах Попова и Русский в Заливе Петра Великого Японского моря;

2 – произрастающих вдоль побережья Японского моря.

Объем вида *V. unijuga* и его внутривидовых таксонов по данным нашего изучения остается неоднозначным и требует дополнительных исследований с привлечением образцов из других частей ареала и анализа полиморфизма коротких участков ядерного и хлоропластного геномов на основе изучения внутригеномного полиморфизма методами пиросеквенирования для более глубокого понимания гибридационных процессов.

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-05372-а, экспедиции финансировались грантами РФФИ 13-04-10089-к, 11-04-10068-к 10-04-10073-к и Хэйлуцзянским центром по научно-техническому сотрудничеству в области сельского хозяйства между Россией и Китаем.

Авторы благодарны сотрудникам Сихотэ-Алинского государственного природного биосферного заповедника имени К. Г. Абрамова; П. А. Чебукину и Е. А. Пименовой за помощь в проведение экспедиций, научные консультации и предоставленные образцы; В. В. Коцерубе – за поддержку и помощь в полевых работах, в сборе материала для исследования.

#### References/Литература

- Bojian B., Turland N. J. *Vicia* L. // In: Flora of China. St. Louis-Beijing, 2010, vol. 10, pp. 560–572.
- Gurzenkov N.N., Pavlova N.S., Smirnova M.V. Karyotypes seven species of the genus *Vicia* L. with the Russian Far East (Karyotypy semi vidov roda *Vicia* L. s Rossijskogo Dalnego Vostoka) // Biological studies Gornotaezhnoj station. Book of proceedings. Ussuriysk, 1995, vol. 2, p. 139–149. [in Russian] (Гурзенков Н.Н., Павлова Н. С., Смирнова М. В. Кариотипы семи видов рода *Vicia* L. с Российского Дальнего Востока. // Биологические исследования на Горнотажной станции.
- Сборник научных трудов. Уссурийск, 1995. Вып. 2. С. 139–149).
- Edward S. K., Thompson J. C. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, p. 1349.
- Fedtschenko B. *Vicia* L. // In: Flora URSS. T. XII, Moscow – Leningrad, 1948, pp. 406–475 [in Russian] (Федченко Б. А. Вика // В кн.: Флора СССР. Т. XII. М.-Л., 1948. С. 406–475).
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*, 1985, vol. 39, pp. 783–791.

- Han Y., Wang H. Y. Genetic diversity and phylogenetic relationships of two closely related northeast China *Vicia* species revealed with RAPD and ISSR markers. // *Biochem Genet.* 2010, vol. 48, no. 5–6, pp. 385–401. doi: 10.1007/s10528-009-9320-9
- Krivenko D. A., Burlyayeva M. O. IAPT/LOPB chromosome data 22 / ed. K. Marhold // *Taxon*, 2016, vol. 65, no. 5, pp. 3, E8–9. doi: <http://dx.doi.org/10.12705/655.44>
- Kupicha F. C. The infrageneric structure of *Vicia*. / *Notes Roy Bot Gard, Edinburgh*, 1976, vol. 34, pp. 287–326.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, vol. 51, pp. 263–273.
- Nikiforova O. D. Wild vetch from Siberia. (Dikorastushchie viki sibirii) Novosibirsk, 1988, 137 p. [in Russian] (Никифорова О. В. Дикорастущие вики Сибири. Новосибирск, 1988. 137 с.).
- Probatova N. S., Shatokhina A. V., Rudyka E. G. Chromosome numbers of some dicotyledons of the flora of the Amur Region (Chisla hromosom nekotoryh dvudolnyh flory Amurskoj oblasti) // *Bot. Zh.*, 2005, vol. 90, no. 5, pp. 779–792 [in Russian] (Пробатова Н. С., Шатокхина А. В., Рудыка Э. Г. Числа хромосом некоторых двудольных флоры Амурской области // *Ботан. Журн.* 2005. Т. 90. № 5. С. 779–792).
- Repjev S. I., Stankevich A. K. Flora of cultivated plants. Vetch. St. Petersburg, 1999, vol. IV, part 2, 491 p. [in Russian] (Репьев С.И., Станкевич А.К. Культурная флора. Вика. СПб, 1999. Т. IV Часть 2. 491 с.).
- Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnI (UAA) intron // *BMC Ecology*, 2003, vol. 3, pp. 8.
- Ryzhova N. N., Burlyayeva M. O., Kochieva E. Z., Vishnyakova M. A. Using of ITS sequences for the evaluation of taxonomic relations of the representatives of tribe *Vicieae* (Adans.) Bronn sem. Fabaceae Lindl (Ispolzovanie ITS posledovatel'nostej dlya ocenki taksonomicheskikh otnoshenij u predstavitelej triby *Vicieae* (Adans.) Bronn sem. Fabaceae Lindl) // *Ecological genetics*, 2007, vol. 5, no. 3, pp. 5–14 [in Russian] Рыжова Н. Н., Бурляева М. О., Кочиева Е. З., Вишнякова М. А. Использование ITS последовательностей для оценки таксономических отношений у представителей трибы *Vicieae* (Adans.) Bronn sem. Fabaceae Lindl // *Экологическая генетика*. 2007. Т. V. № 3. С. 5–14).
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467.
- Song J., Shi L., Li D., Sun Y., Niu Y. et al. Extensive Pyrosequencing Reveals Frequent Intra-Genomic Variations of Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA // *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43971. doi: 10.1371/journal.pone.0043971
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*, 2011, vol. 28, pp. 2731–2739.
- Yang T., Jiang J., Burlyayeva M., Hu J., Coyne C. J., Kumar S., Redden R., Sun X., Wang F., Chang J., Hao X., Guan J., Zong X. Large scale microsatellite development in grasspea (*Lathyrus sativus* L.), an orphan legume of the arid areas // *BMC Plant Biol.*, 2014, 14:65. doi: 10.1186/1471-2229-14-65.
- Wang F., Yang T., Burlyayeva M. O., Li L., Jiang J., Fang L., Redden R., Zong X. Genetic Diversity of Grasspea and Its Relative Species Revealed by SSR Markers // *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0118542. doi:10.1371/journal.pone.0118542.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. / In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., editors. PCR protocols: a Guide to methods and Applications. San Diego, Academic Press, 1990, pp. 315–322.