



УДК 581.95(571.54)

О секционной принадлежности видов *Corydalis gorinensis*, *Corydalis gorodkovii* и *Corydalis magadanica*, произрастающих на Дальнем Востоке

К. К. Рябова^{1,2,6*}, И. Е. Ямских^{1,7}, М. Г. Хорева^{3,8}, И. П. Щеглова^{4,9}, О. А. Мочалова^{3,10}, М. Г. Куцев^{1,5,11}

¹ Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, д. 79, г. Красноярск, 660041, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»,
ул. Академгородок, д. 50, г. Красноярск, 660036, Россия

³ Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, ул. Портовая, д. 18, г. Магадан, 685000, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Заповедное Приамурье» Комсомольский филиал,
пр. Мира, д. 54, г. Комсомольск-на-Амуре, 681000, Россия

⁵ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, д. 61, г. Барнаул, 656049, Россия

⁶ E-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0008-0896-4249>

⁷ E-mail: iyamskikh@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1424-9547>

⁸ E-mail: mkhoreva@ibpn.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2290-3043>

⁹ E-mail: sh.mishka@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0009-4727-0319>

¹⁰ E-mail: mochalova@inbox.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1325-112X>

¹¹ E-mail: m_kucev@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2284-6851>

* Автор для переписки

Ключевые слова: генетический анализ, филогения, *Corydalis arctica*, *Corydalis gorinensis*, *Corydalis gorodkovii*, *Corydalis magadanica*, ISSR-PCR-анализ, *matK*, *rbcL*, *rpoB-trnC*, *trnL-trnF*.

Аннотация. Статья посвящена определению секционной принадлежности клубневых хохлаток – *Corydalis magadanica*, *C. gorinensis*, *C. gorodkovii*, произрастающих на Дальнем Востоке, с использованием ISSR-PCR и хлоропластных маркеров. *Corydalis* является одним из наиболее крупных родов растений. У ученых нет единого мнения о секционной принадлежности некоторых видов хохлаток, что обусловлено высокой изменчивостью их вегетативных и генеративных признаков. Исследований родства на основе анализа генетических маркеров для данных видов ранее не проводилось. С помощью ISSR-анализа установлено, что уровень генетического разнообразия в популяциях дальневосточных хохлаток и сибирского вида *C. bracteata* варьирует от 36,94 до 57,66 % и имеет минимальные показатели у произрастающей обособленно популяции редкого вида *C. gorinensis*. Изученные популяции характеризуются высоким уровнем генетической дифференциации ($G_{st} = 0,5462$) и достоверно относятся к разным видам. На UPGMA-дендрограмме особи данных видов формируют четко обособленные группы. Генетическое сходство наблюдается между *C. magadanica* и *C. gorinensis*. Анализ последовательностей с использованием хлоропластных молекулярных маркеров *matK*, *rbcL*, а также межгенного спейсера *trnL-trnF* не показал различий между *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* и *C. magadanica*, что свидетельствует об их близком родстве. Маркер *rpoB-trnC* оказался более информативным и выявил у *C. gorinensis* точечную мутацию и 6-нуклеотидную делецию. Топология филогенетических деревьев была идентичной для отдельных маркеров. Изучаемые нами дальневосточные виды входят в секцию *Corydalis*, наиболее тесно объединяясь с европейскими видами: *Corydalis intermedia*, *Corydalis solida* и сибирским *C. bracteata*. Морфологическая характеристика дальневосточных видов также соответствует описанию видов секции *Corydalis*, приведенному во «Флоре Китая». Изучение последовательностей ДНК указало на принадлежность впервые секвенированного вида *Corydalis arctica* к секции *Dactylotuber*.

On the sectional affiliation of *Corydalis gorinensis*, *Corydalis gorodkovii*, and *Corydalis magadanica* growing in the Far East

K. K. Ryabova^{1,2}, I. E. Yamskikh¹, M. G. Khoreva³, I. P. Shcheglova⁴, O. A. Mochalova³, M. G. Kutsev^{1,5}

¹ Siberian Federal University, Svobodny Pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

² Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

³ Institute of the biological problems of the North FEB RAS, Portovaya St., 18, Magadan, 685000, Russian Federation

⁴ Federal State-Funded Institution "Zapovednoye Priamurye", Komsomolsky Branch, Mira Pr., 54, Komsomolsk-on-Amur, 681000, Russian Federation

⁵ Altai State University, Lenina Pr., 61, Barnaul, 656049, Russian Federation

Keywords: *Corydalis arctica*, *Corydalis gorinensis*, *Corydalis gorodkovii*, *Corydalis magadanica*, genetic analysis, ISSR-PCR-analysis, *matK*, phylogeny, *rbcl*, *rpoB-trnC*, *trnL-trnF*.

Summary. This article is devoted to determining the sectional identity of tuberous *Corydalis* – *Corydalis magadanica*, *C. gorinensis*, *C. gorodkovii*, growing in the Russian Far East, using ISSR-PCR and chloroplast markers. *Corydalis* is one of the largest plant genera. Scientists do not have a consensus on the sectional affiliation of some *Corydalis* species, which is due to the high variability of vegetative and generative organs. Relationship studies based on the analysis of genetic markers of these species have not been conducted. ISSR-analysis showed that the level of genetic diversity in the populations of the Far Eastern *Corydalis* and the Siberian species *C. bracteata* varies from 36.94 to 57.66 % and has minimal values in the isolated population of the rare species *C. gorinensis*. The studied populations are characterized by a high level of genetic differentiation ($G_{st} = 0,5462$) and reliably belong to different species. On the UPGMA-dendrogram, individuals of these species form clearly distinct groups. Genetic similarity is observed between *C. magadanica* and *C. gorinensis*. Sequence analysis using chloroplast molecular markers *matK*, *rbcl*, as well as the intergenic spacer *trnL-trnF* showed no differences between *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* and *C. magadanica*, which indicates their relative origin. The *rpoB-trnC* marker was more informative and revealed a single mutation and a 6-nucleotide deletion in *C. gorinensis*. The topology of the phylogenetic trees was identical for individual markers. The Far Eastern species are included in the *Corydalis* section, most closely uniting with the European species: *Corydalis intermedia*, *Corydalis solida* and the Siberian species *C. bracteata*. The morphological characteristics of the Far Eastern species also correspond to the description of the species of the *Corydalis* section given in the «Flora of China». The DNA sequence indicates that *Corydalis arctica* belongs to the *Dactylotuber* section.

Введение

В последнее время в связи с использованием биоинформатических подходов и молекулярно-генетических методов в систематике растений все чаще подвергаются ревизии крупные таксоны. К таким таксонам относится род *Corydalis* DC., включающий, по последним данным, 528 видов (World Flora Online, 2023. URL: <http://www.worldfloraonline.org>). Изучение молекулярной филогении видов может внести значительные коррективы в устоявшуюся таксономическую систему.

Объектами нашего исследования являются произрастающие на Дальнем Востоке популяции видов *Corydalis magadanica* Khokhr. и *Cory-*

dalis gorodkovii Karav., относимые, согласно «Конспекту флоры Азиатской России» (Conspectus Florae..., 2012), к секции *Raphanituber* Khokhr., а также *Corydalis gorinensis* V. M. Van из секции *Pes-gallinaceus* Irmisch. Для сравнительного изучения в исследование включены популяции видов *Corydalis bracteata* (Stephan ex Willd.) Pers. (секция *Pes-gallinaceus* Irmisch.) и *Corydalis arctica* Popov (секция *Dactylotuber* Rupr.) (Conspectus Florae..., 2012).

Отнесение перечисленных видов к разным секциям остается дискуссионным вопросом. Так, описывая новый вид *C. gorinensis*, В. М. Ван (Van, 1984) отнес его к секции *Pes-gallinaceus*. Однако Т. А. Безделева (Bezdeleva, Kachura, 1988) утверждает, что признаки окраски цвет-

ка, формы нектарников, лепестков, рыльца и числа пыльцевых сосочков на нем указывают на родство *C. gorinensis* с видами *C. gorodkovii* и *C. magadanica* из секции *Raphanituber*. В то же время *C. gorodkovii* по структуре годичного побега и по форме листовой пластинки более тяготеет к видам секции *Dactylotuber*. Также Т. А. Безделева отмечает, что по форме клубня и способу его возобновления большинство особей *C. magadanica* и *C. gorodkovii* близки видам секции *Pes-gallinaceus*, однако у отдельных растений клубни в основании делятся, подобно клубням у видов из секции *Dactylotuber*, что и послужило причиной для выделения этих видов в особую секцию (Bezdeleva, Kachura, 1988).

В «Конспекте флоры Азиатской России» (Conspectus Florae..., 2012) секции *Corydalis* и *Pes-gallinaceus* приводятся в качестве синонимов и включают виды *C. gorinensis* и *C. bracteata*, а виды *C. gorodkovii* и *C. magadanica* остаются в секции *Raphanituber*. М. А. Михайлова в обзоре представителей рода *Corydalis*, произрастающих в Якутии, причисляет *C. gorodkovii* к секции *Corydalis* (Mikhaylova, 2018). В соответствии с современной классификацией «Флоры Китая» (eFloras. URL: <http://www.efloras.org>), секции *Raphanituber* и *Pes-gallinaceus* объединены в секцию *Corydalis*. Таким образом, у ученых нет единой точки зрения на секционную принадлежность дальневосточных хохлаток, а анализ морфологических признаков, характеризующихся высокой изменчивостью, не вносит ясности в решение данного вопроса.

В наиболее полном обзоре молекулярной филогении хохлаток (Chen et al., 2023) было достоверно установлено разделение рода *Corydalis* на три подрода: *Cremnocapnos* Wendelbo, *Sophorocapnos* Turczaninow и *Corydalis*. Внутри последнего авторы выделили 34 секции. В филогенетический анализ 65 кодирующих белки последовательностей пластид (CDS) было включено 313 видов хохлаток. Филогенетические деревья строились с использованием методов максимального правдоподобия (ML) и байесовского подхода (BI) и показали почти идентичную топологию. Виды *C. bracteata*, *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* и *C. magadanica* в данном филогенетическом исследовании не представлены, однако внесены авторами в секцию *Corydalis* на основе морфологических признаков, вид *C. arctica* в статье не упоминается (Chen et al., 2023).

Цель настоящей работы состоит в определении секционной принадлежности клубневых хохлаток, собранных на российском Дальнем Востоке, с использованием методов молекулярно-генетического анализа.

Материалы и методы

Объектами исследования являются популяции *Corydalis magadanica* (Cm), *C. gorodkovii* (Cgd), *C. gorinensis* (Cgn), а также *C. bracteata* (Cb) и *C. arctica* (Ca), включенные в исследование для сравнительного изучения (табл. 1). Точки сбора представлены на рисунке 1. Ваучерные образцы *C. magadanica*, *C. gorodkovii* и *C. arctica* исследованных популяций хранятся в гербарии Института биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук (MAG) и доступны онлайн (<https://herbarium.ibpn.ru>).

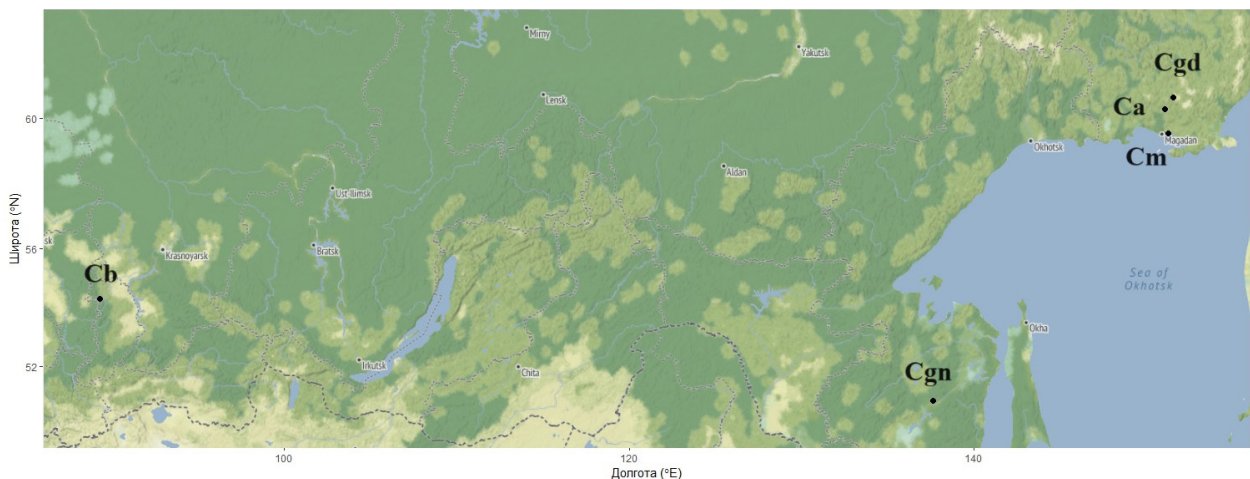


Рис. 1. Расположение популяций видов рода *Corydalis* (нумерация в соответствии с табл. 1).

Таблица 1

Местонахождение исследованных популяций видов рода *Corydalis*

| Вид | Местонахождение | Координаты | Фитоценоз | № поп |
|-------------------------------------|---|---|--|-------|
| Магаданская область, Ольский р-н | | | | |
| <i>Corydalis magadanica</i> | Мыс Ньюкля, приморский склон южной эксп. | 59°34'06.6" с. ш. 151°14'24.9" в. д. | разнотравно-злаковый луг | См |
| Магаданская область, Хасынский р-н | | | | |
| <i>Corydalis gorodkovii</i> | Яблоневый перевал, восточный гребень сопки 1157 м | 60°35'55.3" с. ш. 151°32'42.5" в. д. | щербнистая тундра | Сgd |
| <i>Corydalis arctica</i> | Окр. пос. Карамекен, руч. Туманный | 60°15'28.0" с. ш. 151°03'06.8" в. д. | моховина по ручью в лиственничнике | Са |
| Хабаровский край, Комсомольский р-н | | | | |
| <i>Corydalis gorinensis</i> | Заповедник «Комсомольский», устьевая часть реки Горин, мыс «Первый бык» | 50°45'18.0" с. ш. 137°35'34.8" в. д. | задернованная осыпь на приречном склоне, разнотравно-кустарниковая | Сgn |
| Республика Хакасия, Ширинский р-н | | | | |
| <i>Corydalis bracteata</i> | окр. п. Коммунар | 54°21'10.4" с. ш. 89°16'41.1" в. д. | смешанный лес разнотравно-осочковый | Сb |

Исследования проводились в лаборатории кафедры геномики и биоинформатики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета. Образцами для генетического анализа служили выделенные ДНК 7–10 экземпляров из каждой популяции. Экстракцию тотальной ДНК производили с помощью коммерческого набора DiamondDNA (ООО «Научно-производственная фирма «Алтайбиотех»», г. Барнаул). Для изучения генетической изменчивости использовался ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) метод. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси с помощью набора для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl₂) (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск) в следующем составе на один образец: 7 мкл ddH₂O; 4 мкл 5x ПЦР буфер (+MgCl₂); 4 мкл 10mM праймера; 0,2 мкл

HS-Taq DNA-полимеразы (5 ед. акт./мкл); 0,4 мкл 50x смеси dNTP; 2,4 мкл 50mM MgCl₂; 2 мкл ДНК. Амплификацию проводили с праймерами, дающими наиболее полиморфный результат (Ryabova et al., 2021) (табл. 2). Программа амплификации: 95 °C (5 мин); 13 циклов: 95 °C (20 с), 55 °C (45 с, понижение температуры на 0,7 °C в каждом последующем цикле), 72 °C (90 с); 25 циклов: 95 °C (20 с), 44 °C (30 с), 72 °C (90 с); 72 °C (7 мин). Визуализацию продуктов амплификации проводили в проходящем УФ-излучении с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). Электрофореграммы анализировали с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты.

Таблица 2

Праймеры, их последовательности, использованные в ISSR-анализе 4 популяций видов *Corydalis*

| Название праймера | Последовательность 5'–3' | Общее количество амплифицированных фрагментов ДНК | Количество полиморфных локусов | Процент полиморфных локусов |
|-------------------|--------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|
| HB12 | (CAC) ₃ GC | 24 | 22 | 91,6 |
| HB13 | (GAG) ₃ GC | 26 | 25 | 96,2 |
| HB14 | (CTC) ₃ GC | 20 | 19 | 95 |
| ISSR-17 | (GACA) ₄ | 31 | 31 | 100 |
| ISSR-23 | (AC) ₈ TA | 15 | 14 | 93,3 |

Обработку результатов анализа проводили с помощью программы Popgene version 1.32 (Yeh et al., 1999) и определяли: процент полиморфных локусов (P), генетическое разнообразие Нея (I_o), информационный индекс Шеннона (H_e), генетические дистанции Нея (D), показатель подразделенности популяций (G_{st}). Дендрограмма сходства особей популяций строилась при помощи компьютерной программы TFGPA version 1.3 невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA – unweighted pair-group method using arithmetic average) со значением бутстрепа 5000.

Для проведения филогенетического анализа были секвенированы следующие участки пластидной ДНК: кодирующая ген матуразы K (*matK*), ген большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы (*rbcL*), а также межгенные спейсеры *trnL-trnF* (между генами тРНК-Leu и тРНК-Phe) и *rpoB-trnC* (между

геном β -субъединицы РНК-полимеразы *rpoB* и геном, кодирующим тРНК-Cys). Используемые праймеры приведены в таблице 3. Полимеразную цепную реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси с помощью набора для проведения ПЦР Биомастер HS-Taq ПЦР-Color 2x (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск) в следующем составе на один образец: 25 мкл готовой PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск), 21 мкл ddH₂O, по 1 мкл 10мМ соответствующих праймеров (forward и revers), 2 мкл ДНК. Программа амплификации: 95°C (3 мин); 35 циклов: 95 °C (20 с), 57 °C (30 с), 72 °C (30 с); 72 °C (5 мин). Определение нуклеотидных последовательностей проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MD, USA) (ЦКП «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск).

Таблица 3

Праймеры, их последовательности, использованные для секвенирования участков хлДНК видов рода *Corydalis*

| Участок | Пары праймеров | Последовательность 5'-3' | Источник |
|------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| <i>matK</i> | 3F-KIM | CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG | Kim, 2010 |
| | 1R-KIM | ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC | |
| <i>rbcL</i> | 1F | ATGTCACCACAAACAGAAAC | Olmstead et al., 1992 |
| | 724R | TCGCATGTACCTGCAGTAGC | Fay et al., 1997 |
| <i>trnL-trnF</i> | e | GGTTCAAGTCCCTCTATCCC | Taberlet et al., 1991 |
| | f | ATTTGAACTGGTGACACGAG | |
| <i>rpoB-trnC</i> | rpoBF | CCTTGATCAATGAACCTACAAAATC | Miikeda et al., 2006 |
| | trnCR | ATTTGCAGTCCCTCTGCCTTAC | |

Для построения филогенетического дерева были отобраны последовательности как изучаемых нами видов (табл. 4), так и видов из близкородственных секций (*Corydalis*, *Dactylotuber* Ruprecht, *Benecinctae* Fedde, *Lividae* Mikhailova, *Leonticoides* DC., *Oocarpnos* Popov ex Wendelbo, *Chrysocarpnos* Wendelbo, *Archaeocarpnos* Popov ex Mikhailova), полные геномы которых размещены в NCBI. В качестве аутгруппы использовался вид *Fumaria officinalis* L. Выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004), реализованного в программе MEGA X (Kumar, 2018). Подбор модели нуклеотидных замен и построение филогенетического дерева производились на веб-сервере IQ-TREE со значением параметра бутстрепа 10000. Стратегия построения деревьев – Maximum Likelihood (ML). Полученные выравнивания были картированы на соот-

ветствующие последовательности VK063234 *Corydalis solida* (L.) Clairv.

Результаты исследований

ISSR-PCR-анализ

В ходе ISSR-PCR-анализа 4 популяций видов *C. magadanica*, *C. gorodkovii*, *C. gorinensis* и *C. bracteata* с использованием 5 праймеров выявлено 116 ампликонов, суммарный процент полиморфизма которых равен 95,6 % (см. табл. 2). Генное разнообразие Нея (H_e) в суммарной выборке составляет 0,38, индекс Шеннона (I_o) – 0,56. Минимальное генетическое разнообразие зафиксировано у популяции *C. gorinensis*: P = 36,94 %; H_e = 0,14; I_o = 0,21 (табл. 5). Высокий уровень полиморфизма отмечен для *C. magadanica* (P = 57,66 %; H_e = 0,20; I_o = 0,30), а также *C. bracteata* (P = 51,35 %; H_e = 0,20; I_o = 0,29).

Таблица 4

Номера секвенированных последовательностей хпДНК видов
рода *Corydalis* в базе данных GenBank

| Вид | Номер в GenBank | | | |
|----------------------|-----------------|-------------|------------------|------------------|
| | <i>matK</i> | <i>rbcL</i> | <i>trnL-trnF</i> | <i>rpoB-trnC</i> |
| <i>C. arctica</i> | PP503382 | PP226942 | PP226946 | PP215038 |
| <i>C. bracteata</i> | OR538557 | PP503385 | PP503386 | OR538563 |
| <i>C. gorinensis</i> | PP503384 | PP226944 | PP226948 | PP215037 |
| <i>C. gorodkovii</i> | PP503381 | PP226941 | PP226945 | PP215036 |
| <i>C. magadanica</i> | PP503383 | PP226943 | PP226947 | PP215039 |

Таблица 5

Генетический полиморфизм популяций видов рода *Corydalis* на основе ISSR-PCR-анализа

| Показатели | <i>C. magadanica</i> | <i>C. gorinensis</i> | <i>C. gorodkovii</i> | <i>C. bracteata</i> |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| P, % | 57,66 | 36,94 | 41,44 | 51,35 |
| $H_e \pm SD$ | 0,20 \pm 0,19 | 0,14 \pm 0,20 | 0,14 \pm 0,18 | 0,20 \pm 0,21 |
| $I_o \pm SD$ | 0,30 \pm 0,28 | 0,21 \pm 0,29 | 0,22 \pm 0,27 | 0,29 \pm 0,30 |

Примеч.: P – процент полиморфных локусов; H_e – генное разнообразие Нея; I_o – индекс Шеннона; SD – стандартные отклонения.

Наибольшие значения генетических дистанций Нея (Nei, 1972) (D) наблюдаются между популяцией *C. bracteata* и остальными видами ($D = 0,5030-0,5828$) (табл. 6), ввиду их географической и систематической отдаленности. Наиболее схожими являются виды *C. magadanica* и *C. gorinensis* ($D = 0,1844$). Общий показатель подразделенности популяций (G_{st}) для всей выборки составил 0,5462. Такое высокое значение указывает на нахождение в выборке образцов разных видов. Значения G_{st} при попарном сравнении популяций варьируют от 0,2924 до 0,5175 и также демонстрируют минимальные отличия между *C. gorinensis* и *C. magadanica*.

Дендрограмма сходства популяций, построенная на основе данных ISSR-PCR-анализа, представлена на рисунке 2. Особи изучаемых видов формируют четко обособленные группы. Как было отмечено ранее, отдельно обособился географически наиболее отдаленный вид *C. bracteata*. Наиболее схожими являются *C. magadanica* и *C. gorinensis*.

Филогенетический анализ

Для построения филогенетических деревьев были секвенированы наиболее типичные образцы из изучаемых популяций. Филогения строилась по молекулярным маркерам: *matK*, *rbcL*, *trnL-trnF* и *rpoB-trnC* (табл. 7). Сравнение хлоропластных последовательностей *matK* и *rbcL*, а также межгенного спейсера *trnL-trnF* не пока-

зало различий между *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* и *C. magadanica*. Однако в межгенной последовательности *rpoB-trnC* обнаружены следующие различия: в положении 444 (при выравнивании трех последовательностей на BK063234 *C. solida*) у *C. gorinensis* отмечена замена цитозина на тимин (у *C. gorodkovii* и *C. magadanica* – цитозин). Так же с 599 по 604 нуклеотид у *C. gorinensis* обнаружена делеция 6 нуклеотидов, в то время как у *C. gorodkovii* и *C. magadanica* присутствует фрагмент GTTGAA. Такое небольшое количество различий между видами может свидетельствовать об их близком родстве.

Топология филогенетических деревьев была идентичной для отдельных маркеров. Для построения консенсусной модели были соединены соответствующие последовательности в общее выравнивание длиной 2665 нуклеотидов (рис. 3). Изучаемые нами образцы входят в секцию *Corydalis*, наиболее тесно объединяясь с европейскими видами: *Corydalis intermedia*, *C. solida* и сибирским *C. bracteata*. Зарубежные авторы (Chen et al., 2023) причисляют *C. intermedia* и *C. solida* к крупной секции *Corydalis*. Если придерживаться этой точки зрения, то к секции *Corydalis* следует отнести и *C. magadanica*, *C. gorinensis*, *C. gorodkovii*. Исследование последовательностей ДНК также указало на объединение впервые секвенированного нами вида *C. arctica* и *C. hsiaowutaishanensis* Т. Р. Wang из секции *Dactyloctenium*.

Таблица 6

Степень генетической дифференциации (G_{st}) (над диагональю) и дистанции Нея (D) (под диагональю) между видами рода *Corydalis* на основе ISSR-PCR-анализа

| | <i>C. magadanica</i> | <i>C. gorinensis</i> | <i>C. gorodkovii</i> | <i>C. bracteata</i> |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| <i>C. magadanica</i> | | 0,2924 | 0,3928 | 0,4670 |
| <i>C. gorinensis</i> | 0,1844 | | 0,4553 | 0,5175 |
| <i>C. gorodkovii</i> | 0,3063 | 0,3237 | | 0,4898 |
| <i>C. bracteata</i> | 0,5693 | 0,5828 | 0,5030 | |

Таблица 7

Характеристики выравниваний секвенированных последовательностей хпДНК видов рода *Corydalis*

| Маркер | Выравнивание на BK063234 <i>C. solida</i> | Длина выравнивания |
|-------------------------|---|--------------------|
| <i>matK</i> | 494–1256 | 763 |
| <i>rbcL</i> | 53–723 | 671 |
| <i>trnL-trnF + trnF</i> | 78–410 + 1–43 | 333 + 43 |
| <i>rpoB + rpoB-trnC</i> | 3166–3207 + 1–812 | 42 + 813 |

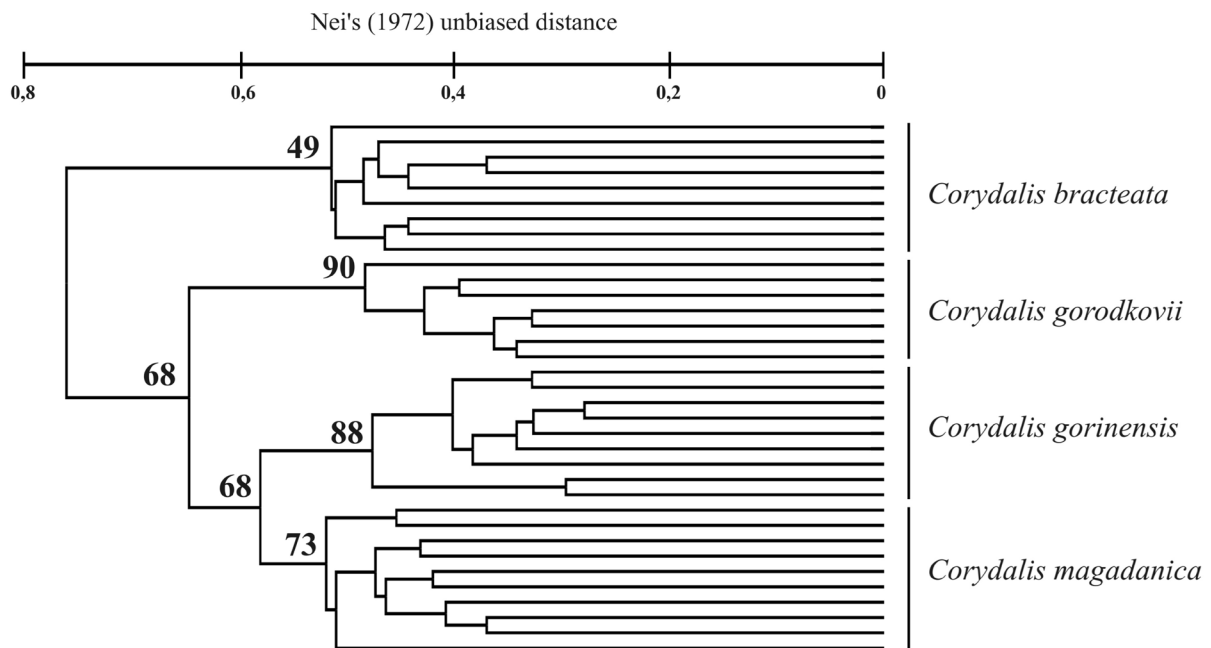


Рис. 2. Дендрограмма сходства видов рода *Corydalis* на основе ISSR-PCR-анализа.

Обсуждение результатов

Результаты молекулярно-генетического анализа с использованием ISSR-маркеров показали тесное родство видов *C. magadanica*, *C. gorodkovii*, *C. gorinensis*, несмотря на географическую удаленность и изолированность популяции хохлатки горинской (*Corydalis gorinensis*). На дендрограмме сходства изучаемые виды формируют четко обособленные клады. Для данных видов характерны следующие сходные

морфологические признаки: вытянутый или шаровидный клубень, стебель с 1(2) чешуевидным листом, цельные яйцевидные прицветники. Отличия заключаются в цвете венчика, количестве цветков в соцветии, форме шпорца, нектарника, отгибов венчика, рыльца и коробочек.

Следует отметить, что хохлатка горинская имеет очень ограниченное распространение. Данный вид занесен в «Красную книгу Хабаровского края», категория 2 (Van, Antonova, 2019). Вид описан из приустьевой части р. Горин в за-

поведнике «Комсомольский». Известны отдельные популяции, произрастающие выше по течению р. Горин (Yermoschkin, 2004) и на отрогах хр. Мяо-Чан в устье р. Холдоми (Van, 2010). В 2020 г. найдены два новых местообитания *C. gorinensis* в верховьях левых притоков среднего течения р. Амгунь – р. Нилан и р. Пра-

вый Сокдюкан, в районе им. Полины Осипенко (Shcheglova, 2023). Согласно нашим исследованиям, для данного вида характерен относительно низкий уровень генетической изменчивости популяций, что часто отмечается для редких видов растений, имеющих ограниченное распространение.

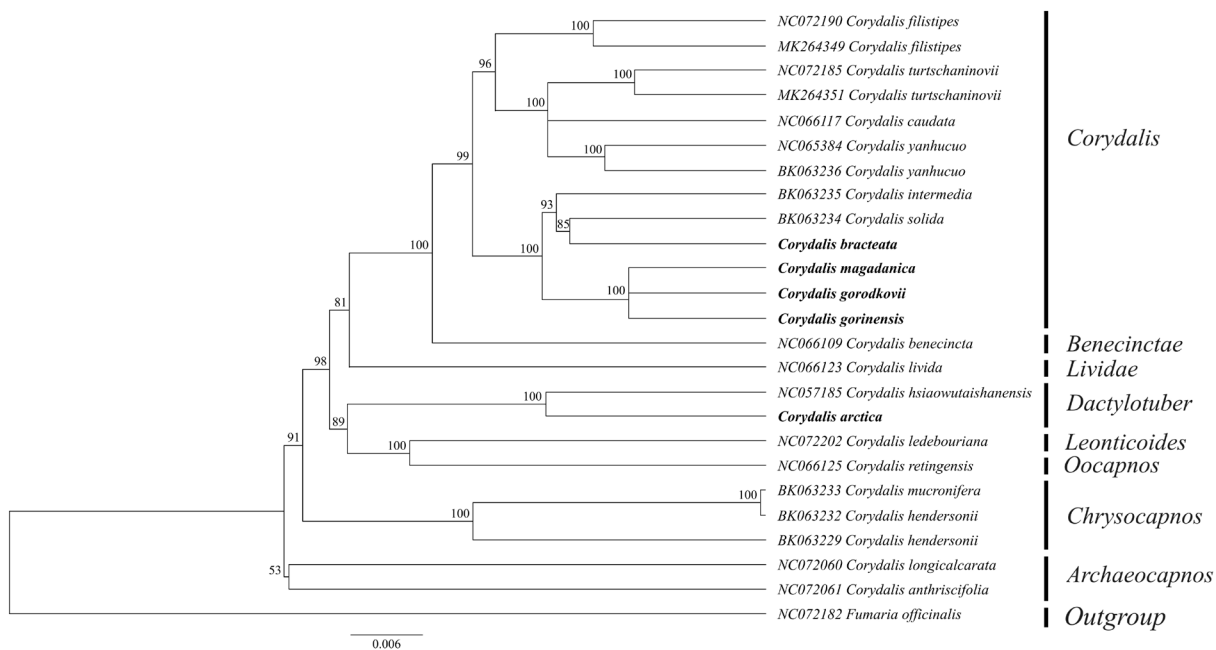


Рис. 3. Филогенетическое дерево видов рода *Corydalis*, на основе участков генов *matK*, *rbcL* и межгенных спейсеров *trnL-trnF*, *rpoB-trnC* хпДНК методом максимального правдоподобия (ML). Цифрами обозначены значения бутстрэпа.

На филогенетическом дереве, построенном на основе анализа участков хлоропластной ДНК, мы также не видим значимых отличий дальневосточных хохлаток друг от друга. Основное отличие обнаружено в последовательности межгенного спейсера *rpoB-trnC* у *C. gorinensis*, в которой, в отличие от двух других видов, наблюдаются транзигция цитозина на тимин и 6-нуклеотидная делеция. Во всех остальных изучаемых участках последовательности идентичны, что говорит об их близком родстве. Следовательно, по данным молекулярно-генетического анализа, три изученных вида являются генетически близкими и должны быть отнесены к одной секции.

Вид *C. bracteata*, используемый нами для сравнения, отличается от дальневосточных хохлаток обратнотлицевидными, иногда почковидными, глубоко гребенчато-надрезанными прицветниками и формой рыльца пестика, объединяясь с *C. gorinensis* по признаку наличия выемки на отгибе венчика. ISSR-анализ показал генетиче-

скую обособленность особей данного вида от *C. magadanica*, *C. gorodkovii*, *C. gorinensis*, что связано не только с географической, но и систематической удаленностью. На филогенетическом дереве данный вид образует сестринскую субкладу с европейскими *C. intermedia* и *C. solida*, имеющими сине-фиолетовые цветки. Это также свидетельствует о генетической обособленности изучаемых дальневосточных хохлаток.

Изучаемые нами *C. magadanica*, *C. gorodkovii*, *C. gorinensis* и *C. bracteata* на филогенетическом дереве входят в общую кладу секции *Corydalis* (Chen et al., 2023). Данная секция объединяет секции *Raphanituber* и *Pes-gallinaceus*, а виды, составляющие ее, в соответствии с «Флорой Китая», характеризуются следующими признаками: проростки с 1 семядолью; клубень твердый, округлый, диаметром 0,5–3 см с единственным пучком корней в основании; верхушка с пучком мелких чешуек, откуда обычно растут 1 или 2 стебля. На каждом генеративном побеге обра-

зается 1 новый клубень. У основания стебля находится 1 стеблеобъемлющий чешуйчатый лист на уровне земли. Прикорневые листья отсутствуют у генеративных особей. Стеблевых листьев 2 (редко 1 или 3): очередные, черешковые, от одно- до четырех-тройчатораздельных или перистораздельных. Соцветие – простая кисть. Прицветники зеленые, крупные, от цельных до разделенных. Чашелистики обычно мелкие. Наружные лепестки без гребня, вершина обычно широкая, от тупой до глубоко выемчатой; нектарник от тупого до заостренного. Рыльце квадратное, плоское, с краевыми простыми сопочками (Zhang et al., 2008). Для изучаемых нами видов характерны вышеприведенные признаки, следовательно, мы можем отнести *C. magadanica*, *C. gorodkovii*, *C. gorinensis*, *C. bracteata* к секции *Corydalis*.

Вид *C. arctica*, чьи молекулярные маркеры секвенированы нами впервые, на филогенетическом дереве объединяется в одну кладу с *Corydalis hsiaowutaishanensis* из секции *Dactyloctenium*. Для данной секции характерны раздвоенный клубень, 1–3 чешуевидных листа, 2–6 ассимилирующих листьев, кисти малоцветковые, коробочка обратнойцевидная, сильно раскрывающаяся (Zhang et al., 2008).

Заключение

Проведенный ISSR-PCR-анализ показал, что уровень генетического разнообразия в популяциях *C. magadanica*, *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* и *C. bracteata* варьирует от 36,94 до 57,66 % и имеет минимальные показатели у произрастающей

обособленно популяции редкого вида *C. gorinensis* ($P = 36,94\%$). Высокий уровень полиморфизма (51–58 %) отмечен для *C. magadanica* и *C. bracteata*. Наибольшее генетическое сходство наблюдается для *C. magadanica* и *C. gorinensis*. Изученные популяции характеризуются очень высоким уровнем генетической дифференциации ($G_{st} = 0,5462$) и достоверно относятся к разным видам.

Анализ последовательностей с использованием хлоропластных молекулярных маркеров *matK*, *rbcL*, а также межгенного спейсера *trnL-trnF* не показали различий между *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* и *C. magadanica*. Маркер *rpoB-trnC* оказался более информативным и выявил у *C. gorinensis* точечную мутацию и 6-нуклеотидную делецию. Тем не менее данные три вида имеют минимальные различия и обнаруживают тесное генетическое сходство по сравнению с другими видами.

Филогенетический анализ показал принадлежность изучаемых видов к секции *Corydalis*. *C. magadanica*, *C. gorinensis*, *C. gorodkovii* и *C. bracteata* достоверно объединяются с европейскими *C. intermedia* и *C. solida* в отдельную субкладу внутри данной секции. Вторую субкладу формируют азиатские виды хохлатки. Объединение *C. arctica* и *C. hsiaowutaishanensis* подтверждает принадлежность первого к секции *Dactyloctenium*.

Благодарности

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР лаборатории ботаники ИБПС ДВО РАН 1022040500936-0 и базового проекта ФИЦ КНЦ СО РАН FWES-2022-0003 (2022–2024).

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Bezdeleva T. A., Kachura N. N.** 1988. Rod *Corydalis* Vent. na sovetском Dalnem Vostoke. *V. L. Komarov Memorial Lectures* 35: 123–146. [In Russian] (**Безделева Т. А., Качура Н. Н.** Род *Corydalis* Vent. на советском Дальнем Востоке // Комаровские чтения, 1988. Т. 35. С. 123–146).
- Chen J. T., Liden M., Huang X. H., Zhang L., Zhang X. J., Kuang T. H., Sun H.** 2023. An updated classification for the hyper-diverse genus *Corydalis* (Papaveraceae: Fumarioideae) based on phylogenomic and morphological evidence. *Journal of Integrative Plant Biology* 65(9): 2138–2156. DOI: 10.1111/jipb.13499
- Conspectus Florae Rossiae Asiaticae: plantae vasculares.* 2012. K. S. Baikov (ed.). Novosibirsk: Publishing house of the Siberian Branch of the RAS. 640 pp. [In Russian] (**Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения.** Под ред. К. С. Байкова. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 640 с.).
- Fay M. F., Swensen S. M., Chase M. W.** 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bull.* 52: 111–120.
- Edgar R. C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5): 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340
- Kim K.-J.** 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Bot. J. Linn. Soc.* 164:1–9. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2010.01071.x

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.** 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Miikeda O., Kita K., Handa T., Yukawa T.** 2006. Phylogenetic relationships of *Clematis* (*Ranunculaceae*) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 152: 153–168. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2006.00551.x
- Mikhaylova M. A.** 2018. Genus *Corydalis* (*Fumariaceae*) in Yakutia. *Novosti Sist. Vyssh. Rast.* 49: 56–70. [In Russian] (**Михайлова М. А.** 2018. Род *Corydalis* (*Fumariaceae*) в Якутии // Новости сист. высш. раст., 2018. Т. 49. С. 56–70. DOI: 10.31111/novitates/2018.49.56
- Nei M.** 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283–292. DOI: 10.1086/282771
- Olmstead R. G., Michaels H. J., Scotts K. M., Palmer J. D.** 1992. Monophyly of the *Asteridae* and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 249–265.
- Ryabova K. K., Yamskikh I. Ye., Stepanov N. V.** 2021. Polymorphism in populations of *Corydalis subjenisseensis* s. l. (*Papaveraceae*) in the south of the Yenisei Siberia. *Problems of botany of South Siberia and Mongolia* 20, 1: 393–396. [In Russian] (**Рябова К. К., Ямских И. Е., Степанов Н. В.** 2021. Полиморфизм популяций *Corydalis subjenisseensis* s. l. (*Papaveraceae*) на юге Приенисейской Сибири // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2021. Т. 20, № 1. С. 393–396. DOI: 10.14258/pbssm.2021078
- Shcheglova I. P.** 2023. New data on distribution and ecology of *Corydalis gorinensis* (*Fumariaceae*). *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology* 45: 70–74. [In Russian] (**Щеглова И. П.** Новые сведения о распространении и экологии *Corydalis gorinensis* (*Fumariaceae*) // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология, 2023. Т. 45. С. 70–74). DOI: 10.26516/2073-3372.2023.45.70
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.** 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105–1109. DOI: 10.1007/BF00037152
- Van V. M.** 1984. A new species of the genus *Corydalis* (*Papaveraceae*) from Khabarovsk region. *Bot. Zhurn.* 69(4): 544–547. [In Russian] (**Ван В. М.** Новый вид рода *Corydalis* (*Papaveraceae*) из Хабаровского края // Бот. журн., 1984. Т. 69, № 4. С. 544–547).
- Van V. M., Antonova L. A.** 2019. *Corydalis gorinensis* Van. In: *Krasnaya kniga Khabarovskogo kraja. Redkiye i nakhodyashchiesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy rasteniy, gribov i zhivotnykh* [Red Book of the Khabarovsk Krai]. B. A. Voronov. (ed.). Voronezh: «MIR» P. 96. [In Russian] (**Ван В. М., Антонова Л. А.** Хохлатка горинская – *Corydalis gorinensis* Van. // Красная книга Хабаровского края. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений, грибов и животных; под ред. Б. А. Воронов. Воронеж: «МИР», 2019. С. 96).
- WFO [2023]. *World Flora Online*. URL: <http://www.worldfloraonline.org/> (Accessed 1 March 2023).
- Yeh F., Yang R., Boyle T.** 1999. *POPGENE version 1.32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis*. University of Alberta; Canada: Molecular Biology and Biotechnology Center. 29 pp.
- Yermoschkin A. V.** 2004. Floristic records of vascular plants in the lower amur basin. *Bot. Zhurn.* 89(6): 1020–1022. [In Russian] (**Ермошкин А. В.** Флористические находки сосудистых растений в бассейне Нижнего Амура // Бот. журн., 2004. Т. 89, № 6. С. 1020–1022).
- Zhang M., Su Z., Lidén M.** 2008. *Corydalis* DC. In: Z.-Y. Wu, P. H. Raven, D.-Y. Hong (eds.). *Flora of China*. Vol. 7. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. Pp. 295–428.