



УДК 582.736:581.9/.4+575.86

О морфологической изменчивости и филогенетических связях представителей секции *Dorycnium* рода *Lotus* Крыма и Кавказа

М. В. Лысова¹, И. Г. Мещерский², Т. Е. Крамина^{1*}

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, г. Москва, 119991, Россия.
E-mail: maya-kut@mail.ru, *tkramina@yandex.ru

² Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, Ленинский проспект, 33, г. Москва, 119071, Россия. E-mail: meschersky@rambler.ru

* автор для переписки

Ключевые слова: география, систематика, филогения, ITS, Leguminosae, *Loteae*, *Lotus dorycnium*, *Lotus graecus*, *trnL* интрон, *trnL-F* спейсер.

Аннотация. В Крыму и на Кавказе секция *Dorycnium* (Mill.) D. D. Sokoloff рода *Lotus* L. s. l., относимая многими исследователями к роду *Dorycnium* Mill., представлена таксонами родства *L. graecus* L. (= *Dorycnium graecum*) и *L. dorycnium* L. (= *D. pentaphyllum*). Для уточнения видового состава, диагностических признаков и филогенетических связей представителей секции этих географических регионов были проанализированы семь крымских и пять кавказских выборок. Проведен морфологический анализ крымского и кавказского материала с использованием методов одномерной и многомерной (метод главных координат) статистики. Молекулярно-филогенетический анализ отдельно по ITS1-5,8S-ITS2 ядерной рДНК и *trnL-F* хлДНК выполнен с привлечением репрезентативного набора видов рода *Lotus* s. l. Исследование выявило присутствие на территории Крыма и Кавказа двух видов: *L. graecus* и *L. herbaceus* (Vill.) Jauzein (представителя комплекса *L. dorycnium*), отличающихся по многим морфологическим признакам (размерам цветков, листьев, зубцов чашечки, характеру опушения и наличию/отсутствию корневых отпрысков). Межвидовые гибриды не выявлены. В пределах каждого вида географической дифференциации между последовательностями обоих изученных маркеров (ITS и *trnL-F*) не наблюдалось. Данное исследование подтвердило, что комплекс *L. dorycnium* (включая *L. herbaceus*) из секции *Dorycnium* по пластидным данным не отделен от *L. hirsutus*, вида из секции *Bonjeanea* (Rchb.) D. D. Sokoloff с широким средиземноморским ареалом, не доходящим до Крыма и Кавказа, что было ранее показано по другим маркерам хлДНК.

On the morphological variability and phylogenetic relationships of Crimean and Caucasian members of *Lotus* section *Dorycnium*

M. V. Lysova¹, I. G. Meschersky², T. E. Kramina¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991, Russian Federation

² A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences,
Leninskiy pr. 33, 119071, Moscow, Russian Federation

Keywords: geography, ITS, Leguminosae, *Loteae*, *Lotus dorycnium*, *Lotus graecus*, phylogeny, taxonomy, *trnL* intron, *trnL-F* spacer.

Summary. In the Crimea and the Caucasus, the section *Dorycnium* (Mill.) D. D. Sokoloff of the genus *Lotus* L. s. l., attributed by many researchers to the genus *Dorycnium* Mill., is represented by taxa related to *L. graecus* L. (= *Dorycnium graecum*) and *L. dorycnium* L. (= *D. pentaphyllum*). To clarify the species composition, diagnostic features, and phylogenetic relationships of the representatives of the section in these two geographical regions, seven Crimean and five Caucasian samples were analyzed. A morphological analysis of the Crimean and Caucasian material was carried out using the methods of one-dimensional and multidimensional (Principal Coordinate Analysis) statistics. Separate molecular phylogenetic analyses by ITS1-5.8S-ITS2 nrDNA and *trnL-F* cpDNA were performed using a representative set of species of the genus *Lotus* s. l. The study revealed the presence of two species in the Crimea and the Caucasus: *L. graecus* and *L. herbaceus* (Vill.) Jauzein (a representative of the *L. dorycnium* complex), which differ in many morphological characters (e.g., sizes of flowers, leaves, calyx teeth, and the type of pubescence and the presence/absence of root offspring). Interspecific hybrids were not identified. Within each species, the geographical differentiation between the sequences of both studied markers (ITS and *trnL-F*) was not observed. The study confirmed that the *L. dorycnium* complex (including *L. herbaceus*) from *Lotus* section *Dorycnium* according to plastid data is not separated from *L. hirsutus*, a species from *Lotus* section *Bonjeanea* with a wide Mediterranean range that does not reach the Crimea and the Caucasus, as was previously shown by other cpDNA markers.

Введение

Проблема разделения родов *Lotus* и *Dorycnium* (Leguminosae, Loteae). К. Линней (Linnaeus, 1751) выделял род *Dorycnium*, но позднее включил его в род *Lotus* L., распространенный в Европе, Азии и Африке (Linnaeus, 1753). Ph. Miller (1754) восстановил род *Dorycnium* Mill. и включил в него два вида, в том числе вид, соответствующий *D. pentaphyllum* Scop. (= *Lotus dorycnium* L.).

В ходе последующего изучения европейских флор складывались представления о самостоятельности родов *Dorycnium* и *Lotus*. Так, представители рода *Dorycnium* отличаются от типичных представителей рода *Lotus* обычно полукустарниковой, а не травянистой жизненной формой, почти полным отсутствием рахиса листа, более мелкими цветками в густых частых соцветиях, белой или розовой, а не желтой окраской лепестков, слипающимися крыльями, несущими мешковидные полые поперечные выросты, короткой и тупой лодочкой, гладким, а не папиллированным стилодием, короткими, обычно односеменными плодами, створки которых при вскрывании не закручиваются (Kramina et al., 2016). Черты рода *Dorycnium*, отличающие его от *Lotus*, наиболее хорошо проявляются у представителей типовой секции *Dorycnium*. Однако ряд видов двух других секций (секции *Canaria* Rikli и секции *Bonjeanea* Taubert) несут мозаичное сочетание признаков типичных представителей *Lotus* и *Dorycnium*. Граница между этими родами остается дискуссионной (Kramina et al., 2016).

Система рода *Dorycnium*. Наиболее известна система рода *Dorycnium*, предложенная М.

Rikli (1901) в его монографии. Rikli выделял в роде три секции: **секцию *Canaria* Rikli** с тремя видами: *D. broussonetii* Webb et Berthel., *D. eriophthalmum* Webb et Berthel., *D. spectabile* Webb et Berthel.; **секцию *Bonjeanea* Taubert** с тремя видами: *D. hirsutum* (L.) Ser., *D. rectum* (L.) Ser., *D. latifolium* (L.) Ser. (синоним вида *D. graecum* Ser.); и **секцию *Eudorycnium* Boiss.** (современное название – секция *Dorycnium*) с видами: *D. herbaceum* Vill., *D. jordanii* Loret et Barr. (= *D. gracile* Jord.), *D. suffruticosum* Vill., *D. germanicum* Rouy, *D. anatolicum* Boiss., *D. haussknechtii* Boiss.

J. B. Gillett (1958) на основе морфологических данных исключил из рода *Dorycnium* секцию *Canaria*. Молекулярные исследования последних лет (Degtjareva et al., 2006; Kramina et al., 2016) подтвердили этот вывод и показали, что секция *Canaria* не является близкой к другим секциям *Dorycnium* и относится к южной эволюционной ветви рода *Lotus* (Kramina et al., 2016).

Объем секции *Bonjeanea* также был пересмотрен. На основе морфологического анализа и с опорой на работу P. Lassen (1986) в нее был включен *Lotus strictus* Fisch. et C. A. Mey., а *D. graecum* (= *L. graecus*) перенесен в секцию *Dorycnium* (Degtjareva et al., 2006). Молекулярно-филогенетические исследования показали, что секция *Bonjeanea* не является естественной (как в понимании Rikli, так и в более поздней трактовке) (Degtjareva et al., 2006; Kramina et al., 2016).

Состав секции *Dorycnium* трактуется по-разному. Согласно Degtjareva et al. (2006), в нее входят сложный видовой комплекс *Lotus dorycnium* L. s. l. (= *Dorycnium pentaphyllum*) и вид *L. graecus* L., а также родственные им виды (*L. fulgurans* (Porta) D. D. Sokoloff (= *Dorycnium*

fulgurans (Porta) Lassen), *L. sanguineus* (Vural) D. D. Sokoloff (= *D. sanguineum* Vural) и *L. axilliflorus* (Hub.-Mor.) D. D. Sokoloff (= *D. axilliflorum* Hub.-Mor.). Виды секции имеют широкий средиземноморский ареал, достигающий до Центральной и Восточной Европы, Крыма и Кавказа.

Взгляды на *Dorycnium* в европейских и азиатских «Флорах» в XX и начале XXI вв. Большинство авторов проанализированных нами источников рассматривают *Dorycnium* в ранге рода, отличного от рода *Lotus* (Ball, 1968; Demiriz, 1970; Rechinger, 1984; Greuter et al., 1989; Díaz Lifante, 2000). *Lotus strictus* относят либо к *Lotus* (Ball, 1968; Hejn, 1970; Chrtková-Žertová, 1984), либо к *Dorycnium* (Greuter et al., 1989). Как правило, морфологически хорошо обособленные виды, такие как *D. hirsutum*, *D. rectum* и *D. graecum*, трактуются разными авторами сходно, а наибольшие разногласия наблюдаются в трактовке комплекса *D. pentaphyllum*. Во «Flora Europaea» P. W. Ball (1968) выделяет в составе *D. pentaphyllum* четыре подвида: а) subsp. *pentaphyllum*, б) subsp. *germanicum*, в) subsp. *gracile*, г) subsp. *herbaceum*. Автор указывает, что эти подвиды рассматриваются многими авторами как виды, но (а), (б) и (в) часто трудно разделить по морфологическим признакам, а подвид (г), как правило, хорошо отличается, но образует редкие переходные формы с другими подвидами.

Demiriz (1970) для флоры Турции приводит *D. hirsutum*, *D. graecum*, *D. rectum*, *D. axilliflorum*, *D. pentaphyllum* subsp. *herbaceum*, *D. pentaphyllum* subsp. *anatolicum*, *D. pentaphyllum* subsp. *haussknechtii*, *D. amani* Zohary. Çelebioğlu (1977) провела морфолого-анатомическое исследование вегетативных и генеративных органов всех представителей *Dorycnium* Турции, приводимых для ее флоры (Demiriz, 1970), кроме *D. rectum* и *D. amani*. Ею было подробно описано их строение и выявлены различия между таксонами. Несмотря на детальный морфолого-анатомический анализ видов *Dorycnium*, проведенный Çelebioğlu, он основан на изучении только турецких представителей группы и выполнен на сравнительно небольших выборках, растения других частей ареала не были охвачены.

В 1983 г. М. Vural описал новый эндемичный вид *Dorycnium* для Турции, *D. sanguineum* Vural (Vural, Tan, 1983), который Соколов перенес в секцию *Dorycnium* рода *Lotus* (Sokoloff, 2003).

Во «Flora Iranica» К. Н. Rechinger (1984) приводит только два вида: *D. pentaphyllum* Scop. с единственным представленным на территории флоры подвидам *D. pentaphyllum* subsp. *haussknechtii* (Boiss.) Gams и *D. intermedium* Ledeb.

Greuter et al. (1989) в сводке по флоре Средиземноморского региона представляют *D. pentaphyllum* agg. в виде иерархической системы. Комплекс включает широко распространенные виды *D. herbaceum* Vill. и *D. pentaphyllum* Scop. и локальные эндемики Турции (*D. amani* Zohary и *D. axilliflorum* Huber-Morath) и Балеарских о-вов (*D. fulgurans* (Porta) Lassen). *D. pentaphyllum*, в свою очередь, включает пять подвидов: *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *anatolicum* (Boiss. et Heldr.) Gams, *D. pentaphyllum* subsp. *germanicum* (Gremli) Gams, *D. pentaphyllum* subsp. *haussknechtii* (Boiss.) Gams, *D. pentaphyllum* subsp. *pentaphyllum*, *D. pentaphyllum* subsp. *transmontanum* Franco, а *D. herbaceum* – два подвида: *D. herbaceum* subsp. *gracile* (Jordan) Nyman и *D. herbaceum* subsp. *herbaceum*.

На территории «Flora Iberica» Z. Díaz Lifante (2000) признает в составе секции *Dorycnium* виды *D. pentaphyllum* Scop., *D. gracile* Jord. (= *D. herbaceum* subsp. *gracile* (Jordan) Nyman) и *D. fulgurans* (Porta) Lassen. Типичный *D. herbaceum* для Пиренейского п-ова автором не отмечен.

Из истории изучения *Dorycnium* на территории бывшего СССР и России. На территории бывшего СССР представители рода *Dorycnium* распространены преимущественно в Крыму и на Кавказе (Steinberg, 1945), однако упоминается их произрастание также в Южной и Северной Бессарабии (Молдавии) и Карпатах (Steinberg, 1945; Minjaev, 1987). В большинстве флор и определителей признается распространение в Крыму и на Кавказе двух видов *Dorycnium*. Первый из них, *Dorycnium graecum* (L.) Ser. (syn. *D. latifolium* Willd.), обычно не вызывает разногласий, являясь хорошо очерченным видом, отмечен в горах (кроме Яйлы) и на Южном берегу Крыма, в Предкавказье, Дагестане, Зап. и Вост. Закавказье (Grossheim, 1930; Steinberg, 1945; Chernova, Kryukova, 1972; Galushko, 1980; Minjaev, 1987; Greuter et al., 1989; Golubev, 1996; Yena, 2012). Полный ареал *D. graecum* включает северо-восточное Средиземноморье и Причерноморье. Второй вид, приводимый для территории Крыма и Кавказа, относится к комплексу *D. pentaphyllum*

(= *Lotus dorycnium*). Общий ареал комплекса – широкий средиземноморский, доходящий на севере до Ц. Европы, а на востоке – до Крыма и Кавказа. Таксономические границы между видами (или подвидами) комплекса нечеткие, о чем уже говорилось выше. На территории Крыма и Кавказа представителей этой группы трактуют по-разному: 1) как *D. herbaceum* Vill. (Grossheim, 1930; Greuter et al., 1989; Golubev, 1996) или *D. pentaphyllum* Scop. subsp. *herbaceum* (Vill.) Rouy (Yena; 2012); 2) как *D. intermedium* Ldb. (Steinberg, 1945; Chernova, Kryukova, 1972; Galushko, 1980).

Общий ареал *D. herbaceum* Vill. включает также Ц. и ЮВ. Европу (Ball, 1968), С. и СЗ. Турцию (Demiriz, 1970). Рикли (Rikli, 1901) в своей монографии рода *Dorycnium* считает, что *D. intermedium* и *D. herbaceum* не отделены четко друг от друга ни морфологически, ни географически. На это ссылается Штейнберг (Steinberg, 1945), указывая, что только *D. intermedium*, представляющий собой восточную расу *D. herbaceum*, встречается во флоре СССР. Она приводит точку зрения Рикли о *D. herbaceum* как сборном виде, находящемся в процессе формообразования.

Н. А. Миняев (Minjaev, 1987) считал, что в европейской части СССР, помимо *D. graecum*, встречаются три отдельных вида: *D. pentaphyllum*, *D. herbaceum* и *D. intermedium*. Во флоре Северо-Западного Кавказа А. С. Зернов (Zerнов, 2006) представил два вида *Lotus* секции *Dorycnium* (Miller) D. D. Sokoloff: *L. graecus* L. (= *Dorycnium graecum* (L.) Ser.) и *L. dorycnium* L. s. l. (= *Dorycnium herbaceum* Vill.; *D. intermedium* Ledeb.).

Вид *D. herbaceum* был описан D. Villars в 1779 г. как растение с прямостоячими травянистыми стеблями и многосеменными бобами. Позднее он описал другой вид этой же группы, *D. suffruticosum*, и уточнил описание *D. herbaceum* (Villars, 1788). Он отметил, что *D. herbaceum* распространен в окрестностях Гренобля и Шамбери (Франция). В качестве черт, отличающих этот вид от *D. suffruticosum*, автор выделяет травянистые, а не полудревесневшие побеги, разветвленные в верхней части, а не от основания. Также для *D. herbaceum* характерны пятилисточковые листья без черешка; с листочками продолговатыми и тупыми, расширяющимися в верхней части, с закругленным окончанием; мелкие белые цветки, в два раза более многочисленные, чем у *D. suffruticosum*, расположенные на верхушках цветоносов; чашечка более удлиненная, оканчи-

вающаяся пятью зубцами, более правильными, чем у *D. suffruticosum* (Villars, 1788).

Ledebour (1820) описал *D. intermedium*, близкий к *D. herbaceum*, но отличающийся острыми обратнотуповидными листочками, треугольными зубцами чашечки, одревесневающими побегами, а особенно более мохнатой поверхностью, остроконечными листочками, цветками белыми, с лодочкой на конце пурпурно-черной, а не красноватой; трубкой чашечки с более короткими зубцами и отклоненными волосками, которые у *D. herbaceum* прижатые. Ледебур описал *D. intermedium* из Крыма (“*Legimus in lapidosis cretaceis et schistosis Tauriae*”), но отметил, что, по данным Биберштейна, он также, возможно, встречается в Иберии (Пиренейском п-ове) под названием *D. monspeliensis* (Ledebour, 1820).

Если *D. herbaceum* и *D. intermedium* считать одним видом, то приоритетным будет название *D. herbaceum*.

Молекулярно-филогенетические исследования *Dorycnium* и родственных таксонов. Филогенетические исследования трибы *Loteae* по маркеру nrITS показали, что род *Lotus* монофилетичен только при включении в его состав родов *Dorycnium* и *Tetragonolobus* Scop. (Allan et al., 2003; Degtjareva et al., 2006; Kramina et al., 2016). Молекулярно-филогенетический анализ рода *Lotus* s. l. (включая *Dorycnium* и *Tetragonolobus*), проведенный с использованием ядерных (nrITS, 5'ETS) и пластидных (*psbA-trnH* и интрона *rps16*) маркеров выявил в эволюции рода раннее расщепление на «южную» и «северную» ветви. Южная ветвь включает большинство (десять, согласно Degtjareva et al., 2006) секций рода *Lotus* и выделяется как по ядерным, так и по пластидным маркерам, а северная ветвь, объединяющая членов только трех секций (*Lotus*, *Dorycnium* и *Bonjeanea*), обособляется только по пластидным данным. Филогенетические взаимоотношения внутри этой ветви наиболее противоречивы (Kramina et al., 2016).

Таким образом, однозначного взгляда на состав и таксономическую структуру группы, ранее выделяемой в качестве рода *Dorycnium*, а в последнее время относимой к двум секциям рода *Lotus*, не существует. Вызывают разногласия и трактовки этой группы на территории России, хотя здесь она представлена небольшим числом таксонов. Дополнительные исследования в Крыму и на Кавказе могут представлять интерес для систематики группы и понимания ее объема.

Целями настоящей работы являлись: идентифицировать виды секции *Dorycnium* рода *Lotus* на территории Крыма и Кавказа; уточнить диагностические признаки видов секции *Dorycnium* этих регионов; установить филогенетическое положение крымских и кавказских образцов секции *Dorycnium* внутри рода *Lotus*.

Материалы и методы

Исследованный материал. Основным материалом для морфологического и молекулярного анализа служили собственные гербарные сборы 80 образцов представителей секции *Dorycnium* с семи точек на п-ове Крым (2015–2017 гг.) и пяти точек на Кавказе (2016–2017 гг.) (см. табл. 1 в приложении на сайте журнала; рис. 1). По секциям *Dorycnium* и *Bonjeanea* изучен гербарный материал из ряда отечественных и зарубежных гербариев (ANK, ISTE, GAZI, H, MA, MHA, MW, LE, YALT). При проведении молекуляр-

но-филогенетического анализа был использован репрезентативный материал по роду *Lotus*, охватывающий все секции рода, кроме секции *Benedictella*. В анализ были включены последовательности ITS и *trnL-F* из Генбанка (см. табл. 1), подавляющее большинство которых было получено ранее в исследованиях при участии одного из авторов настоящей статьи и опубликовано в ряде работ (Degtjareva et al., 2003, 2006, 2008; Kramina et al., 2012, 2016, 2018), а также последовательность *trnL-F*, взятая из пластидного генома *Lotus miyakojimae* Kramina, опубликованная под названием *L. japonicus* (Regel) Larsen (Kato et al., 2000). Кроме того, в настоящей работе были получены новые последовательности *trnL-F* и, отчасти, ITS для образцов нескольких видов из секций *Lotus* (вида *L. parviflorus* Desf.), *Dorycnium* (видов *L. herbaceus*, *L. axilliflorus*, *L. sanguineus*) и *Bonjeanea* (вида *L. hirsutus*) из разных регионов (см. табл. 1).

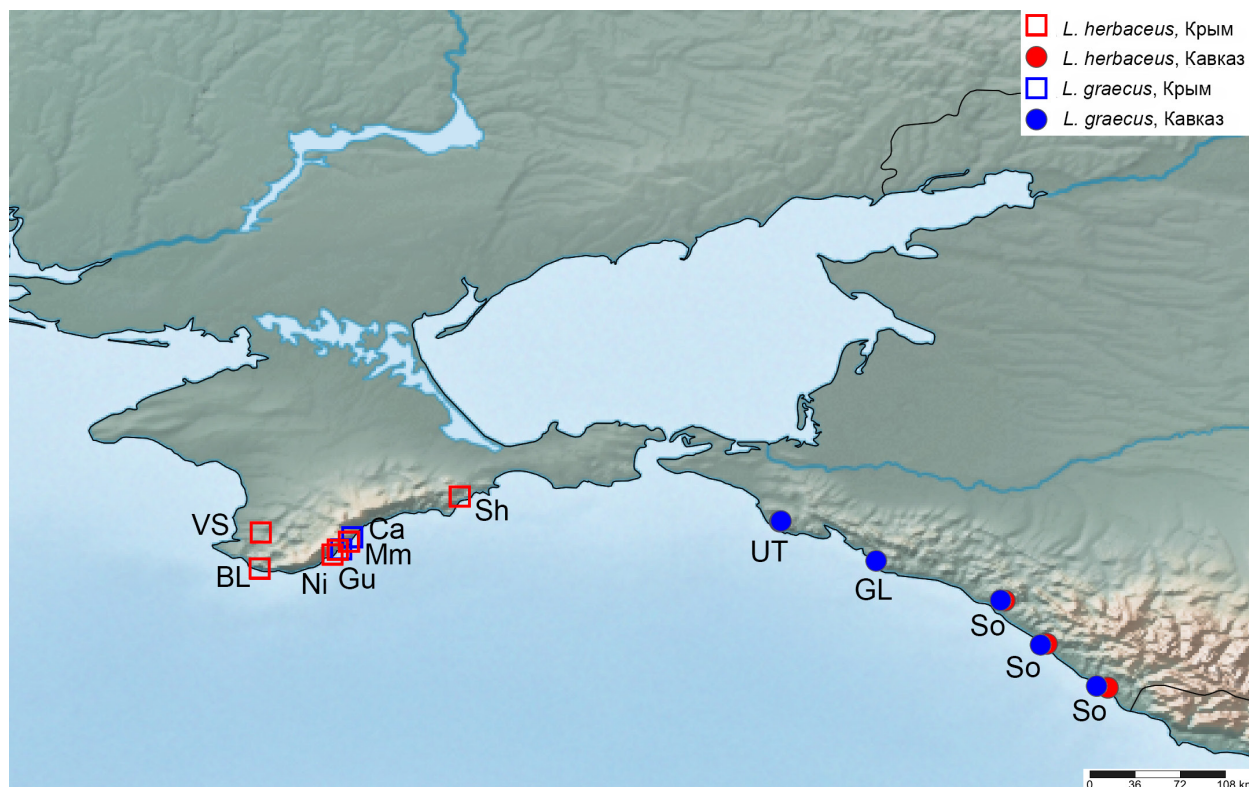


Рис. 1. Места сбора образцов *L. herbaceus* и *L. graecus* в Крыму и на Кавказе. Обозначения популяций см. в табл. 1 в приложении на сайте журнала.

Морфологический анализ. Морфометрия проводилась на выборке из 35 образцов растений (19 образцов *L. herbaceus* и 16 образцов *L. graecus*) в состоянии цветения по 22 количественным и 17 качественным признакам. Отбор признаков проводился на основе литературных данных и

собственных наблюдений. По количественным признакам проводили по три измерения каждого признака на растении и вычисляли среднее значение. Количественные признаки включали: 1) длину трубки чашечки (мм); 2) длину цветка (мм); 3) длину цветоножки (мм); 4) число цвет-

ков в элементарном соцветии; 5–10) длину (мм), ширину (мм) и индекс листочков средних и верхних листьев; 11–16) длину коротких и длинных волосков на листьях, стебле и чашечке (мм); 17–22) длину и ширину верхнего, бокового и нижнего зубцов чашечки (мм). Качественные признаки включали: 1–3) типы опушения на стебле, листьях и чашечке; 4–17) присутствие/отсутствие разных типов волосков (коротких прижатых, коротких курчавых, длинных прижатых, длинных курчавых и длинных отстоящих) на стебле, листьях и чашечке.

Статистический анализ морфологических данных проводили методами одномерной статистики в программе STATISTICA 7.1 for Windows (StatSoft Inc., 2006) и методом главных координат (МГК) в программе Past3.15 (Hammer et al., 2001). В качестве одномерных методов сравнения средних у двух видов по количественным признакам использовали тесты Стьюдента (для нормально распределенных признаков) и Манна-Уитни (для признаков с распределением, отклоняющимся от нормального). При сравнении двух географических популяций (крымской и кавказской) в пределах каждого вида применяли тест Манна-Уитни ввиду малого объема одной из сравниваемых выборок.

В МГК использовалась метрика Гоуэра (Gower, 1971), позволяющая проводить ординацию по качественным и количественным признакам. Полученные в результате анализа координатные оси отражают расстояния между образцами. В анализ включены 33 образца (17 образцов *L. herbaceus* и 16 образцов *L. graecus*). Два образца *L. herbaceus*, So4 и BL2, были исключены из-за отсутствующих значений некоторых признаков. Анализ проводился в двух вариантах: 1) по 22 количественным и 6 качественным признакам, 2) только по 22 количественным признакам.

Выделение, амплификация и секвенирование ДНК. Выделение геномной ДНК проводили с гербарных образцов набором NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Германия) согласно протоколу. Для молекулярно-филогенетического анализа были отобраны два участка ДНК: ITS1-2 ядерной рибосомальной ДНК и *trnL-F* спейсер и *trnL* интрон пластидной ДНК. Для амплификации этих участков использовались праймеры с известными последовательностями: для ITS1-2 – NNC-18S10 и C26A (Wen and Zimmer, 1996), а также универсальные праймеры ITS2 и

ITS3 (White et al., 1990); для *trnL-F* – праймеры с, d, e и f (Taberlet et al., 1991). Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводились на амплификаторе T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) в реакционном объеме 20 µl, содержащем 4 µl готового ПЦР-микса Mas^{DD}TaqMIX (200 µM каждого dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 U SmarTaqDNA полимеразы и реакционный буфер (Диалат Лтд., Москва)), 15 µl деионизированной воды, 3,2 pmol каждого праймера и 1 µl матрицы ДНК неизвестной концентрации. ПЦР проводился по программе: предварительная денатурация 94 °C, 3:00, 30 циклов (денатурация 94 °C, 0:30, отжиг праймеров 57 °C, 0:40, элонгация 72 °C, 1:00), финальная денатурация 94 °C, 0:30, финальный отжиг праймеров 57 °C, 0:40, финальная элонгация 72 °C, 3:00. Электрофорез продуктов ПЦР проводился в 1,2 % агарозном геле 20 минут при мощности 120В. Очистка амплификата осуществлялась колоночным способом с помощью набора Cleanup Mini (Евроген ЗАО). Подготовка к секвенированию включала в себя измерение концентрации очищенного амплификата с помощью NanoPhotometer N60 (Implen) с последующим разбавлением образца до концентрации 20 pmol/µl. На одну реакцию добавляли 3,2 pmol праймера и около 20 нг ДНК. Секвенировали прямые и обратные последовательности. Секвенирование производилось по Сэнгеру в лабораториях ЦКП «Геном», ЗАО «Синтол» и кабинета методов молекулярной диагностики ИПТЭ РАН. Полученные последовательности выравнивали с последовательностями из Генбанка, матрицу по ITS автоматически в программе MAFFT version 7.215 (Katoh et al., 2002; Katoh, Standley, 2013), а матрицу *trnL-F* – автоматически и вручную в программе BioEdit (Hall, 1999), ввиду наличия длинных инделей (Kramina et al., 2018). Полиморфизм ITS внутри образца определяли методом прямого секвенирования (без клонирования) по наличию двойных пиков на хроматограмме, проявляющихся при прямом и обратном прочтении, и при высоте минорного пика не менее 20 % от главного. Число гапло- и риботипов оценивали в программе DnaSP 6 (Rozas et al., 2017). При подсчете риботипов учитывали только главный сигнал (мажорный пик).

Молекулярно-филогенетический анализ проводили отдельно по ITS1-5,8S-ITS2 и *trnL-F* в программе MEGAX (Kumar et al., 2008) методом максимального правдоподобия (ML). Модель эволюции выбирали на основе информационного критерия AICc. В обоих анализах (ITS и

trnL-F) была отобрана модель GTR + G (General Time Reversible model – частоты оснований не равны, 6 скоростей замен; G – параметр гамма-распределения, показывающий варьирование скоростей замен между сайтами). При построении филогенетических деревьев использовали метод bootstrap с числом шагов 500. Анализ по ITS включал 111 индивидуальных последовательностей, по *trnL-F* – 87 индивидуальных последовательностей (табл. 1). В качестве внешних групп в обоих анализах использовались представители ближайших к роду *Lotus* родов: *Cytisopsis pseudocytisus* (Boiss.) Fertig, *Hammatolobium kremerianum* (Coss.) K. Müll. и *Tripodion tetraphyllum* (L.) Fourr.

Результаты

Морфологический анализ. Тесты Манна-Уитни и Стьюдента по количественным данным показали достоверные отличия между выборками двух видов (*L. graecus* и *L. herbaceus*) по большинству признаков. Выявлен ряд качественных отличий. Основные отличительные особенности двух видов на территории Крыма и Кавказа обобщены в таблице 2. *Lotus graecus* характеризуется более крупными размерами цветков и листочков всех листьев и более длинными зубцами чашечки, а также характером опушения стеблей и листьев (рис. 5). Некоторые признаки проявили сходный характер изменчивости у двух изученных видов, в частности: длина трубки чашечки (около 1,5 мм) и типы ее опушения (наличие коротких (до 0,5 мм) прижатых и длинных (0,5–1,7 мм) отстоящих волосков).

Сравнение двух географических выборок *L. herbaceus* из Крыма и Кавказа не выявило достоверных различий между ними по всем признакам, кроме ширины бокового зубца чашечки, которая была несколько больше ($p < 0,05$) в крымской популяции. При сопоставлении двух выборок *L. graecus* было выявлено больше достоверных ($p < 0,01–0,05$) отличий между географическими популяциями. Так, выборка с горы Кабель (Крым) отличалась по характеру опушения стебля (присутствовали только длинные курчавые волоски и отсутствовали короткие курчавые и длинные отстоящие волоски, характерные для выборок с Кавказа). Также крымская выборка характеризовалась более мелкими средними листьями и более широким боковым зубцом чашечки, чем кавказские популяции.

Ординация методом МГК по комплексу качественных и количественных признаков также выявила четкие отличия между двумя исследованными видами (рис. 2А). Все образцы *L. herbaceus* образовали единый кластер точек, в котором растения из Крыма и Кавказа перемешаны и неразделимы. Образцы *L. graecus* сгруппировались в два отдельных кластера, соответствующих выборкам из Кавказа и Крыма и хорошо обособленных как друг от друга, так и от кластера *L. herbaceus*. Анализ только по количественным данным выявил сходный характер кластеризации, но расстояния между выборками *L. graecus* с Кавказа и из Крыма были заметно меньше, что говорит о большом вкладе качественных признаков характера опушения в различия между географическими популяциями этого вида (рис. 2Б).

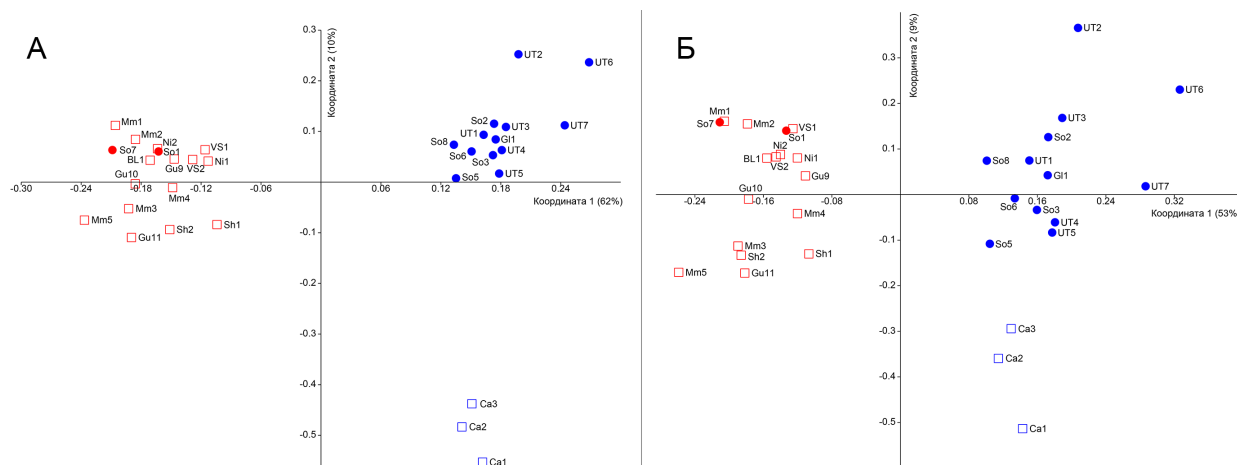


Рис. 2. Результаты анализа МГК крымских и кавказских образцов *L. herbaceus* и *L. graecus* по морфологическим данным. В скобках по координатным осям указана доля объясненной дисперсии. А. Анализ по количественным и качественным признакам. Б. Анализ только по количественным признакам. Символы образцов — как на рис. 1, названия образцов см. в табл. 1 в приложении.

Таблица 2

Отличительные признаки *Lotus graecus* и *L. herbaceus* в Крыму и на Кавказе

	<i>L. graecus</i> (N = 16)	<i>L. herbaceus</i> (N = 19)	Достоверность отличий (по р-значению)	
			Тест Стьюдента	Тест Манна-Уитни
Длина цветка, мм	5,7 ± 0,2 (4,4–8,2)	3,7 ± 0,08 (3,1–4,4)	***	
Длина листочка среднего листа, мм	24,1 ± 1,5 (16–37)	13,8 ± 0,5 (10–17)	***	
Ширина листочка среднего листа, мм	11,3 ± 1 (7,7–19,4)	4,5 ± 0,2 (3,4–6,4)		***
Длина листочка верхнего листа, мм	15,3 ± 0,9 (11–26)	9,9 ± 0,3 (8–12)		***
Ширина листочка верхнего листа, мм	6,4 ± 0,6 (4,5–14,7)	2,7 ± 0,4 (2,1–3,5)		***
Длина зубцов ча- шечки, мм (усред- нено для верхнего, бокового и нижнего зубцов)	1,7 ± 0,07 (1,2–2,3)	0,7 ± 0,03 (0,4–1)	***	
Ширина бокового зубца чашечки, мм	0,5 ± 0,02 (0,35–0,75)	0,4 ± 0,02 (0,3–0,55)		*
Волоски на стебле, длина (мм) и тип	Короткие (0,1–0,3) курчавые. Длинные (0,7–2) отстоящие	Короткие (0,1–0,3) прижатые. Длинные (0,8–1,5) отстоящие (есть/нет)		Длина коротких волосков – Длина длинных волосков – (отличия только в типе коротких во- лосков)
Волоски на листьях, длина (мм) и тип	Коротких нет. Длинные (0,9–1,6), прижатые и от- стоящие	Короткие (0,1–0,5) прижатые (есть/нет). Длинные (0,8–1,5) отстоящие	Длина длинных волосков *	
Волоски на чашеч- ке, длина (мм) и тип	Длинные (0,7–1,7) отстоящие. Короткие (0,25– 0,5) прижатые	Длинные (0,5–1,3) отстоящие. Короткие (0,1–0,4) прижатые	Длина коротких волосков *** Длина длинных волосков ***	
Корневые отпрыски	есть	нет		

Примеч.: для количественных признаков приведены средняя арифметическая ± ошибка средней (в верхней строке) и минимальное, и максимальное значения (в нижней строке). Для длин волосков указан только размах изменчивости. Достоверность отличий средних в выборках двух видов по количественным признакам (слева – по критерию Стьюдента (для нормально распределенных признаков), справа – по критерию Манна-Уитни (для признаков с распределением, отклоняющимся от нормального)): отличия недостоверны «←», отличия достоверны на уровне: * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001). Для качественных признаков (тип опушения, наличие корневых отпрысков) достоверность отличий не оценивалась.

Генетический анализ. Число полученных для каждой выборки и каждого маркера индивидуальных и уникальных последовательностей представлено в табл. 3.

У обоих видов в пределах индивидуальных образцов был отмечен полиморфизм последовательностей ITS. У *L. graecus* полиморфизм был отмечен для семи сайтов, соответствующих позициям референсного сиквенса *L. graecus* D9 (Генбанк № KT250876): ITS1 – 50, 105, 192, 193,

230; 5,8S рРНК – 394; ITS2 – 420. У *L. herbaceus* полиморфизм выявлен в восьми сайтах, соответствующих позициям референсного сиквенса *L. herbaceus* D6 (Генбанк № KT250882): ITS1 – 74, 183, 191, 208; ITS2 – 444, 526, 587, 590. Ни один из сайтов полиморфизма *L. herbaceus* не совпал с сайтами полиморфизма у *L. graecus*.

Длина использованного в филогенетическом анализе обобщенного выравнивания ранее опубликованных и впервые представляемых

последовательностей ITS составила, соответственно: 668 п.о., и соответствовала 1–601 позициям референсного сиквенса *Lotus herbaceus* D6 (Генбанк № KT250882). На данном участке было отмечено 272 переменных сайта, из них 204 – парсимонно-информативных. Длина обо-

щенного выравнивания *trnL-F* составила 1021 п.о. (1–845 позиции сиквенса *Lotus fulgurans* 937 (= *D. pentaphyllum* subsp. *fulgurans*), Генбанк № MF314954), включая 122 переменных сайта и 56 парсимонно-информативных признаков.

Таблица 3

Число нуклеотидных последовательностей, полученных для крымских и кавказских популяций *Lotus graecus* и *L. herbaceus*

	<i>trnL-F</i>		ITS	
	<i>Lotus graecus</i>			
	Кавказ	Крым	Кавказ	Крым
Число последовательностей	4	2	11	4
Число гаплотипов/риботипов ¹	3	2	5	3
	<i>Lotus herbaceus</i>			
	Кавказ	Крым	Кавказ	Крым
Число последовательностей	3	4	4	17
Число гаплотипов/риботипов ¹	3	3	1	1

Примеч.: ¹ – для ITS только по главному сигналу (без учета полиморфизма внутри образца).

Анализ методом ML по маркеру ITS (рис. 3) показал обособление южной клады рода *Lotus* (бутстреп поддержка (БП) 79), в которую не вошел лишь *L. glinoides* (секция *Chamaelotus* Kramina et D. D. Sokoloff). Все члены северной эволюционной ветви *Lotus* сгруппировались в несколько клад, среди которых: большая клада секции *Lotus* (р.мах.р. – БП 86), включающая большинство видов; клада секции *Lotus* группы *L. parviflorus* (БП 100); клада секции *Bonjeanea* с двумя видами (*L. rectus* и *L. strictus*) с низкой поддержкой (БП 61) и две клады секции *Dorycnium*, одна из которых включала также *L. hirsutus* из секции *Bonjeanea*. Первая из этих клад высоко поддержана (БП 98) и включает две субклады: а) все члены комплекса *L. dorycnium* (= *D. pentaphyllum*) и *L. fulgurans*, б) образцы *L. hirsutus*. Вторая клада (БП 81) включает *L. graecus* и близкие к нему турецкие эндемики *L. axilliflorus* и *L. sanguineus*. Все изученные образцы *L. herbaceus* из Крыма и Кавказа попали в общую кладу (хоть и неподдержанную) вместе с образцами *L. herbaceus* из Австрии и Греции. Все они надежно группируются с другими представителями комплекса *L. dorycnium*. Все образцы *L. graecus*, независимо от их географического происхождения (Крым, Кавказ, Турция, Греция),

образовали общую высоко поддержанную кладу (БП 94).

Анализ участка *trnL-F* методом ML (рис. 4) выявил южную и северную ветви рода *Lotus*, хоть и низко поддержанные. В состав южной клады входят те же представители, что и в анализе ITS, но к ним добавился *L. glinoides*. Северная ветвь дифференцирована нечетко, но включает ряд достаточно высоко поддержанных клад, таких как: комплекс *L. corniculatus* (БП 98), группа родства *L. conimbricensis* (БП 87), группа родства *L. graecus* (БП 82), включающая помимо этого вида также *L. axilliflorus* и *L. sanguineus*, а также отдельные виды: *L. parviflorus* (БП 86), *L. strictus* (БП 95), *L. rectus* (БП 91). Выделение комплекса *L. dorycnium* секции *Dorycnium* не поддержано, последовательности представителей этого комплекса (включая последовательности образцов *L. herbaceus* из Крыма и Кавказа) перемешаны с последовательностями *L. hirsutus* секции *Bonjeanea*, что не согласуется с морфологическими данными. *L. hirsutus* имеет обширный ареал, охватывающий Португалию и почти все страны Средиземноморского региона, за исключением Египта, Туниса и Марокко, и не доходящий до Крыма и Кавказа.

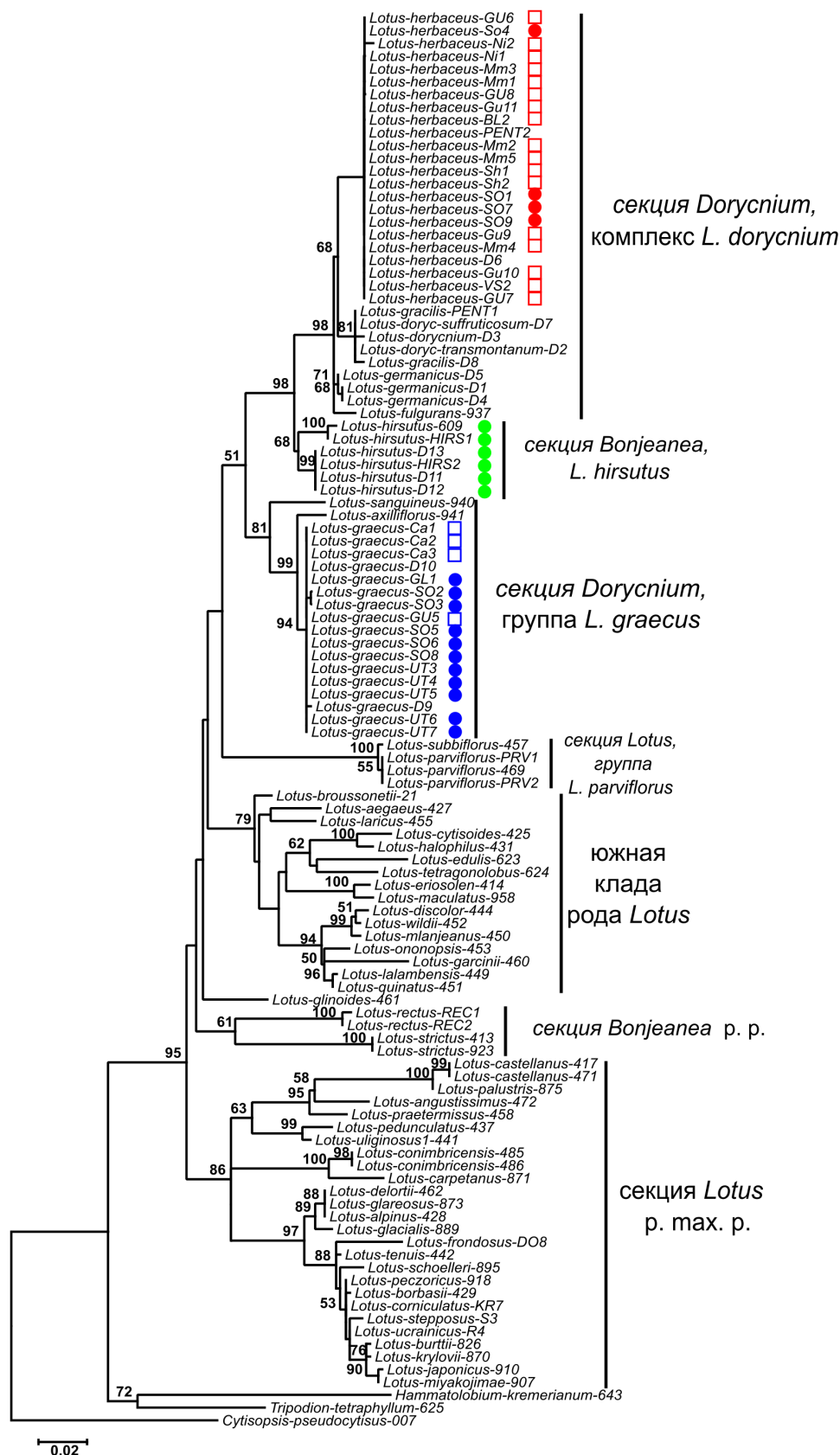


Рис. 3. Результаты филогенетического анализа рода *Lotus* (вкл. *Dorycnium* и *Tetragonolobus*) методом ML по участку ITS1-5,8S-ITS2 ядерной рДНК с расширенной представленностью крымских и кавказских представителей секции *Dorycnium*. Обозначение образцов – см. табл. 1. Приведены только значения бутстреп-поддержки узлов, превышающие 50. Цветными значками выделены образцы видов: *Lotus herbaceus* (красный кружок – с Кавказа, красный пустой квадрат – из Крыма), *L. graecus* (синий кружок – с Кавказа, синий пустой квадрат – из Крыма), *L. hirsutus* (зеленый кружок).

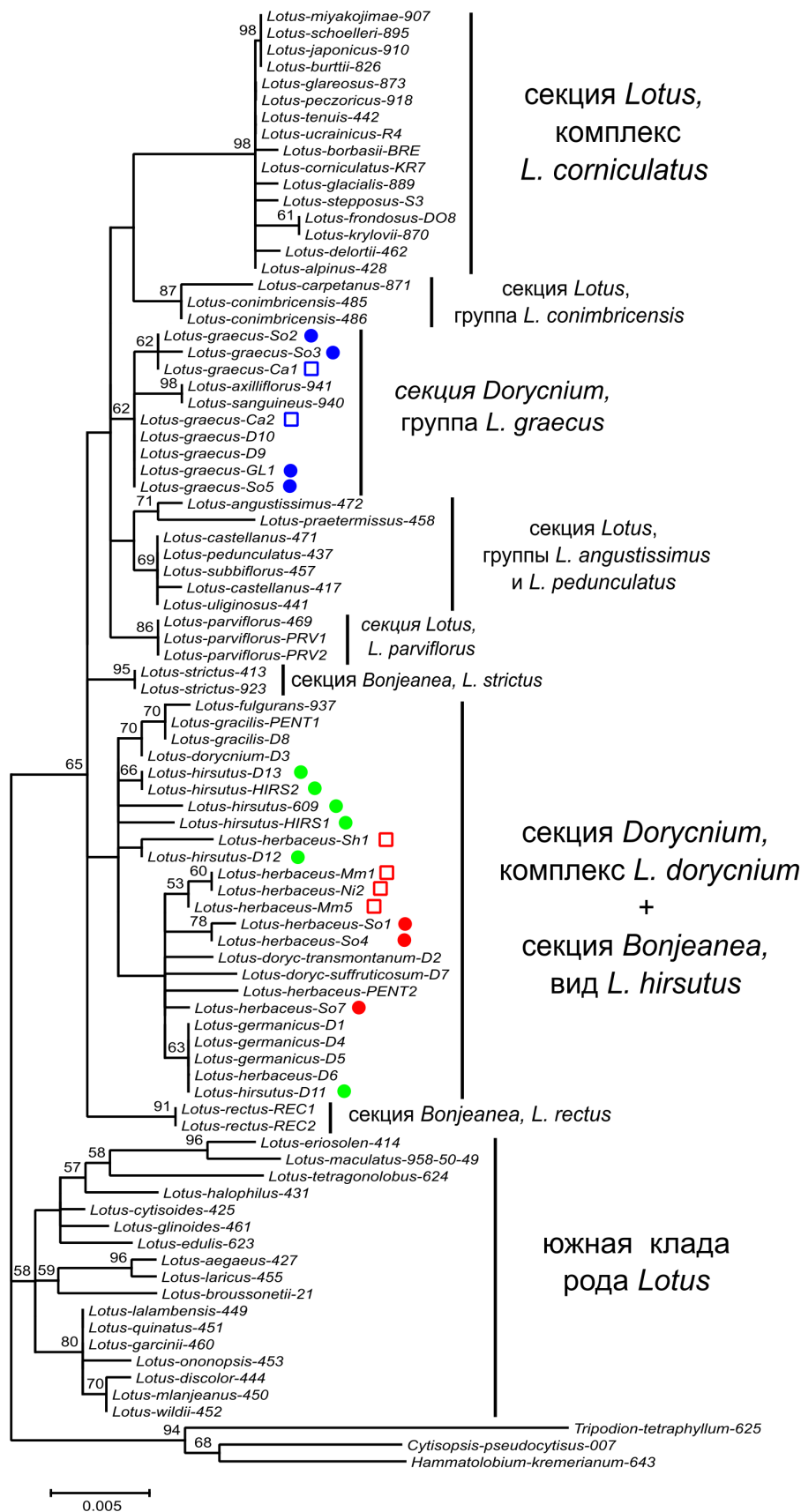


Рис. 4. Результаты филогенетического анализа рода *Lotus* (вкл. *Dorycnium* и *Tetragonolobus*) методом ML по участку *trnL-F* пластидной ДНК с расширенной представленностью крымских и кавказских представителей секции *Dorycnium*. Обозначение образцов – см. табл. 1 в приложении. Приведены только значения бутстреп-поддержки узлов, превышающие 50. Выделение образцов *Lotus herbaceus*, *L. graecus* и *L. hirsutus* – как на рис. 4.

Учитывая последние обстоятельства, мы провели дополнительный анализ литературных данных (Ball, 1968; Demiriz, 1970) и проанализировали более 200 гербарных образцов комплекса *L. dorycnium* и около 50 образцов вида *L. hirsutus* из гербарных коллекций ANK, GAZI, H, ISTE, LE, MHA, MW и MA, из чего следует, что, несмотря на некоторые черты сходства (короткие бобы с незакручивающимися при вскрывании створками, короткий рахис листа), различия между комплексом *L. dorycnium* и видом *L. hirsutus* по морфологии очень велики (см. рис. 5–6): размеры цветков (3–6 мм у *L. dorycnium* против 9–15 мм у *L. hirsutus*), характер лепестков (с поперечными мешковидными выростами у *L. dorycnium* и без таковых у *L. hirsutus*), размеры плодов (3–5 × 1,5–3 мм у *L. dorycnium* и 6–12 × 2–4 мм у *L. hirsutus*), число семян в плоде (обычно 1 у *L. dorycnium* и 2–6 у *L. hirsutus*), длина и форма зубцов чашечки (короткие треугольные у *L. dorycnium* и длинные ланцетно-шиловидные у *L. hirsutus*), характер опушения (полуотстоящее или прижатое у *L. dorycnium* и сильноотстоящее у *L. hirsutus*). Гибридных образцов между этими видами по морфологическим признакам до сих пор выявлено не было.

Обсуждение

Изучение отдельных морфологических признаков и анализ МГК по морфологическим данным показали, что виды *L. graecus* и *L. herbaceus* хорошо различимы, морфологически переходных образцов выявлено не было даже в местах совместного произрастания двух видов. При этом образцы из Кавказа и Крыма в пределах *L. herbaceus* не обособляются, а в пределах *L. graecus* можно различить крымскую и кавказскую популяции.

Выявление достаточно большого числа (7–8) полиморфных сайтов в последовательностях ITS обоих изученных видов может свидетельствовать о том, что оба таксона могли произойти в результате сравнительно недавней гибридизации, после которой ITS еще не успел стабилизироваться. Подобные примеры описаны для представителей разных семейств цветковых (Hřibová et al., 2011; Peruzzi et al., 2012; Punina et al., 2012; Hodač et al., 2014; Efimov et al., 2018). Полиморфизм в ITS также был продемонстрирован и для некоторых видов *Lotus*, возникших в результате гибридизации (Sandral et al., 2010; Kramina et al.,

2012), и межвидовых гибридов *Dorycnium* (в нашем понимании, секции *Dorycnium* рода *Lotus*) (Conesa et al., 2010). Большинство видов рода *Lotus*, напротив, имеет ITS последовательности, лишённые полиморфизмов внутри образца (Kramina et al., 2016).

Полностью различные сайты полиморфизма ITS у видов *L. graecus* и *L. herbaceus* позволяют предположить, что их возможное гибридное происхождение не связано. Однако изученных материалов пока недостаточно для обоснованных предположений о родительских таксонах, которые могли участвовать в этих событиях гибридизации.

Возможны и другие причины полиморфизма в ITS. Так, для пионов лишь часть полиморфизмов поддерживала гипотезу о гибридном происхождении от определенных видов, тогда как другая часть характеризовалась присутствием дополнительных нуклеотидов и могла быть следствием внутривидовой генетической дифференциации (Efimov et al., 2018).

Молекулярно-филогенетический анализ по ITS1-5,8S-ITS2 и *trnL-F* подтвердил основные направления филогении рода *Lotus* (включая *Dorycnium* и *Tetragonolobus*), полученные ранее (Degtjareva et al., 2006; Kramina et al., 2016). Результаты проведенного исследования поддерживают выводы об отсутствии соответствия между разделением бывших представителей рода *Dorycnium* на секции *Dorycnium* и *Bonjeanea* и молекулярно-генетическими данными (Kramina et al., 2016). Настоящее исследование поддерживает представления о том, что виды секции *Bonjeanea* (*L. strictus*, *L. rectus* и *L. hirsutus*) не являются монофилетической группой, а последний из них как по ядерным, так и по пластидным данным сближается скорее с видами секции *Dorycnium*, чем с видами своей секции (Degtjareva et al., 2006; Kramina et al., 2016). Филогенетические отношения внутри клады родства *Lotus dorycnium* разрешены лишь частично.

Как было ранее установлено в анализе спейсера *psbA-trnH* и интрона *rps16* (Kramina et al., 2016), а в настоящем исследовании подтверждено на примере участка *trnL-F*, по последовательностям пластидной ДНК виды секций *Lotus*, *Dorycnium* и *Bonjeanea* образуют отдельную, «северную», ветвь рода *Lotus*, эволюционная судьба которой, по-видимому, включала события сетчатой эволюции, как отдаленной, так и современной, и требует дальнейшего изучения.

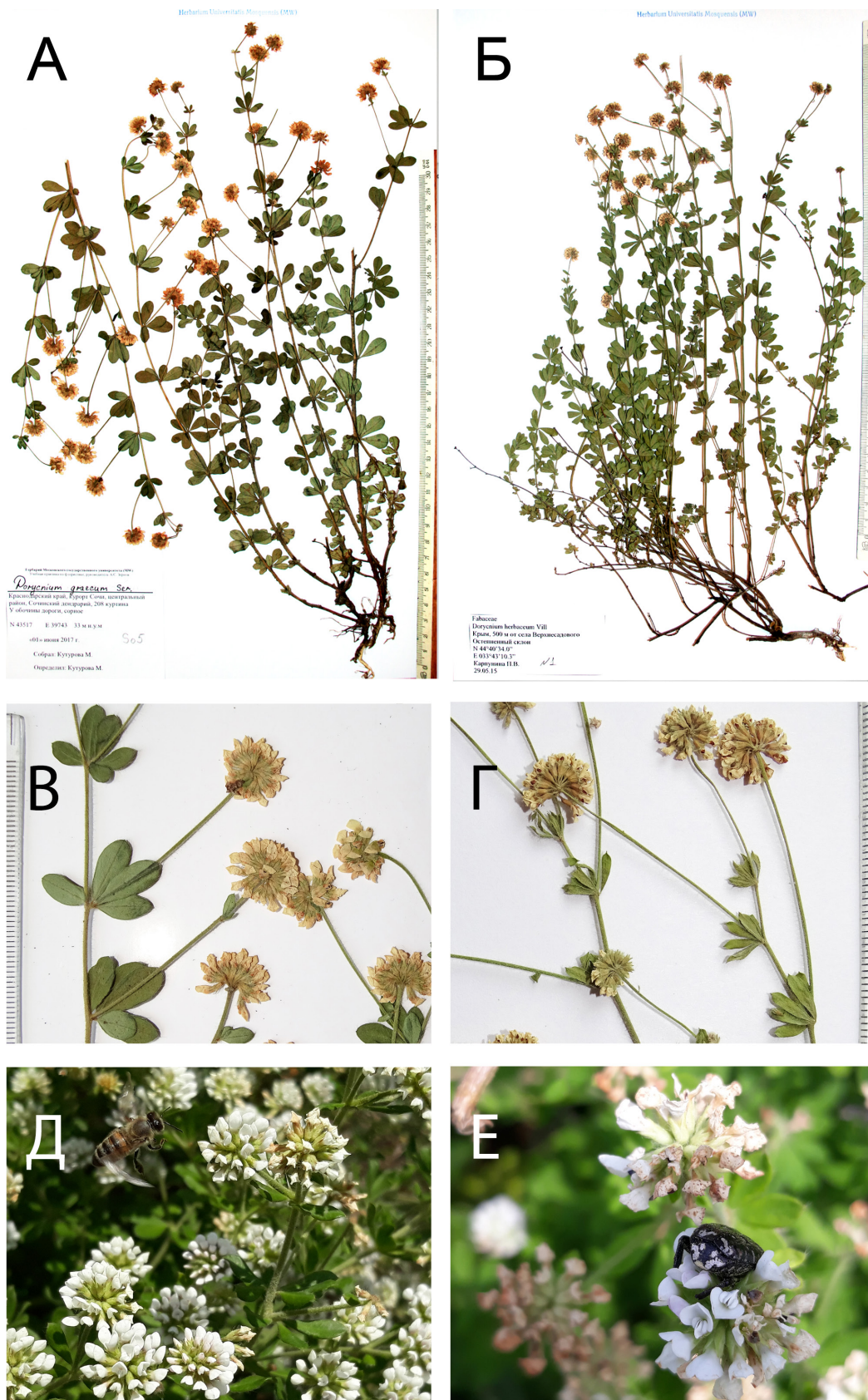


Рис. 5. Образцы *Lotus graecus* L. и *L. herbaceus* (Vill.) Jauzein. А, В – *L. graecus*, So5, «Краснодарский край, курорт Сочи, Сочинский дендрарий, 43°34' с. ш. 39°45' в. д. 01 VI 2017. М. Кутурова s. n.» (MW); Б, Г – *L. herbaceus*, VS1, «Крым, 500 м от с. Верхнесадового, 44°41' с. ш. 33°41' в. д. 29 V 2015. П. В. Карпунина s. n.» (MW); А, Б – общий вид гербарного образца (фото С. Р. Майорова), В, Г – участки побегов с соцветиями (фото Т. Е. Краминой); Д, Е – внешний вид цветущих растений: Д – *L. graecus*, «Турция, Стамбул, окр. Синекли»; Е – *L. herbaceus*, «Россия, Сочи, между ж/д станциями Солоники и Лазаревская» (Д–Е, фото М. В. Лысовой).



Рис. 6. Гербарные образцы *L. hirsutus* L. А – “Croatia, Istria, Pula. 31 V 2010. J. Calvo and A. Unió JC4730” (МА), побеги с соцветиями; Б – “Italia, Sicilia, Ragusa. 09 VI 2000. Álvarez et al. IA1784” (МА), образец HIRS2, плоды (фото Т. Е. Краминой).

Филогенетический анализ по четырем пластидным маркерам (*psbA-trnH*, *rps16* intron, *trnL* intron, *trnL-F*), проведенный для выборки 65 видов рода *Lotus* (включая *Dorycnium*), подтвердил обособление общей высоко поддерживанной клады, в которой перемешаны образцы комплекса *L. dorycnium* и вида *L. hirsutus* (Kramina et al., 2019). Нам представляется маловероятным объяснение близких филогенетических связей между членами комплекса *L. dorycnium*, с одной стороны, и *L. hirsutus* из секции *Bonjeanea*, с другой, современной гибридизацией этих двух таксонов. Потенциально гибридизация возможна, учитывая пересекающиеся ареалы и одинаковое число хромосом у этих таксонов, $2n = 14$ (Goldblatt, Johnson, 1979), но гибридных образцов по морфологии, как уже сказано, до сих пор выявлено не было. Возможно, мы имеем дело со скрытой гибридизацией (гибрид морфологически неотличим или слабо отличим от одного из родителей) или с остатками древнего полиморфизма (т. е. неполной сортировкой линий), что требует более глубокого изучения с привлечением турецкого материала, т. к. именно Турция является центром разнообразия группы, трактуемой как род *Dorycnium*.

Проведенное нами исследование показало, что нуклеотидные последовательности как *L. graecus*, так и *L. herbaceus* из Крыма и Кавказа не образуют отдельных, свойственных конкретному региону клад. Видимо, эти виды заселили данные территории, находящиеся на крайнем северо-восточном пределе их ареалов, сравнительно недавно и географически разделенные популяции не приобрели существенных отличий в последовательностях. Однако, если рассматри-

вать весь комплекс *L. dorycnium* (= *D. pentaphyllum*), то по данным ITS прослеживается тенденция к географической дифференциации. В частности, выделяются клада западноевропейских образцов (D2 из Португалии, D3 и PENT1 из Испании, D7 и D8 из Франции) и клада центрально-европейских и балканских образцов (D1 из Словении, D4 из Германии, D5 из Черногории). Изучение этой тенденции может стать целью будущих исследований, которые потребуют более репрезентативных выборок со всех частей ареала комплекса *L. dorycnium*.

Выводы

Морфологический и молекулярно-филогенетический анализ (с использованием маркеров ITS1-5,8S-ITS2 ядерной рибосомальной ДНК и *trnL-F* пластидной ДНК) крымских и кавказских выборок секции *Dorycnium* рода *Lotus* подтвердил присутствие на этих территориях двух видов: *L. graecus* L. и *L. herbaceus* (Vill.) Jauzein (представителя комплекса *L. dorycnium* L.).

L. graecus по сравнению с *L. herbaceus* характеризуется более крупными размерами цветков (около 5,5 мм против 3,5 мм) и листочков всех листьев (15–24 × 6–11 мм против 10–14 × 3–5 мм), более длинными зубцами чашечки (1,2–2 мм против 0,4–1 мм), а также отличается характером опушения и наличием корневых отпрысков.

В пределах каждого вида географические популяции из Крыма и Кавказа представлены сходными последовательностями обоих изученных маркеров (ITS и *trnL-F*).

Отсутствие разделения по пластидным данным между комплексом *L. dorycnium* (включая *L. herbaceus*) из секции *Dorycnium* и *L. hirsutus* из секции *Bonjeanea*, выявленное ранее по маркерам *psbA-trnH* и *rps16*, подтвердилось и по маркеру *trnL-F*.

Мы предпочитаем использовать для представителей комплекса *L. dorycnium* из крымского и кавказского регионов название *L. herbaceus* как основанное на более раннем базиионе (*D. herbaceum* Vill.), чем *D. intermedium* Ledeb., но считаем, что для более обоснованного решения необходимо изучить типовые материалы Вилларса и Ледебура по этим и близким видам, а также пределы варьирования видов этой группы на всем ареале.

Благодарности

Мы благодарим кураторов гербариев ANK, ISTE, GAZI, H, MA, MHA, MW, LE, YALT за предоставление возможности работать с материалом по роду *Lotus* s. l., О. В. Юрцеву, П. В. Карпунину, К. И. Фомичева и А. О. Виричеву за помощь в сборе материала. Выражаем искреннюю признательность Д. Д. Соколову за ценные замечания и советы и С. Р. Майорову и А. Д. Милько за помощь в подготовке иллюстраций. Молекулярно-филогенетическая часть исследования выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00883, сборы материала в 2016–2017 гг. проведены при поддержке гранта РНФ «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» (грант № 14-50-00029).

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Allan G. J., Zimmer E. A., Wagner W. L., Sokoloff D. D. 2003. Molecular phylogenetic analyses of tribe *Loteae* (Leguminosae): implications for classification and biogeography. In: *Advances in legume systematics*. Part 10. Eds. B. B. Klitgaard, A. Bruneau. Royal Botanic Gardens, Kew, 371–393 pp.
- Ball P. W. 1968. *Dorycnium* Miller. In: *Flora Europaea*. Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge, 172–173 pp.
- Çelebioğlu T. 1977. Études morphologiques et cytologiques sur les espèces du *Dorycnium* de la Turquie. *Ayri Baski: Biyoloji Dergisi* 27(2–4): 1–77.
- Chernova N. M., Kryukova I. V. 1972. *Dorycnium* Mill. In: *Opredelitel Vysshikh rasteniy Kryma [Key to higher plants of Crimea]*. Ed. N. I. Rubtsov. Nauka, Leningrad, 262 p. [In Russian]. (Чернова Н. М., Крюкова И. В. *Dorycnium* Mill. // Определитель высших растений Крыма. Ред. Н. И. Рубцов. Л.: Наука, 1972. С. 262).
- Chrtková-Žertová A. 1984. *Lotus*. In: *Flora Iranica*. № 157. Ed. K. H. Rechinger. Akademische Druck und Verlagsanstalt, Graz, Austria, pp. 327–342.
- Conesa M. Á., Mus M., Rosselló J. A. 2010. Who threatens who? Natural hybridization between *Lotus dorycnium* and the island endemic *Lotus fulgurans* (Fabaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 1–12. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2010.01456.x
- Degtjareva G. V., Kramina T. E., Sokoloff D. D., Samigullin T. H., Sandral G., Valiejo-Roman C. M. 2008. New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, *Loteae*). *Wulfenia* 15: 35–49.
- Degtjareva G. V., Kramina T. E., Sokoloff D. D., Samigullin T. H., Valiejo-Roman C. M., Antonov A. S. 2006. Phylogeny of the genus *Lotus* (Leguminosae, *Loteae*): evidence from nrITS sequences and morphology. *Canadian Journal of Botany* 84: 813–830. DOI: 10.1139/b06-035
- Degtjareva G. V., Valiejo-Roman C. M., Kramina T. E., Mironov E. M., Samigullin T. H., Sokoloff D. D. 2003. Taxonomic and phylogenetic relationships between Old World and New World members of the tribe *Loteae* (Leguminosae): new insight from molecular and morphological data, with special emphasis on *Ornithopus*. *Wulfenia* 10: 15–50.
- Demiriz H. 1970. *Dorycnium* Miller. In: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 3. Ed. P. H. Davis. Edinburgh University Press, Edinburgh, 512–518 pp.
- Díaz Lifante Z. 2000. *Dorycnium* Mill. In: *Flora Iberica*. Vol. 7(2). Real Jardín Botánico, Madrid, 812–823 pp.
- Efimov S. V., Degtjareva G. V., Terentjeva E. I., Samigullin T. H., Logacheva M. D., Valiejo-Roman C. M. 2017. Polymorphism of the ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal DNA in *Paeonia lactiflora* Pall. (Paeoniaceae) determined using next-generation sequencing technology. *Skvortsovia* 4(1): 6–7.
- Galushko A. I. 1980. *Flora Severnogo Kavkaza. Opredelitel [Flora of the North Caucasus. The key]*. Vol. 2. Izdatelstvo Rostovskogo universiteta, Rostov-na-Donu, 352 pp. [In Russian]. (Галушко А. И. *Флора Северного Кавказа. Определитель*. Т. 2. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета, 1980. 352 с.).
- Gillett J. B. 1958. *Lotus* in Africa south of the Sahara (excluding Cape Verde Islands and Socotra) and its distinction from *Dorycnium*. *Kew Bull.* 13(3): 361–381. DOI: 10.2307/4118089
- Goldblatt P., Johnson D. E. (Eds.) 1979. *Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN)*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO, USA. URL: <http://www.tropicos.org/Project/IPCN> (Accessed 2 March 2019).

- Golubev V. N.** 1996. *Biologicheskaya flora Kryma* [Biological Flora of Crimea]. NBS-NNC, Yalta, 126 pp. [In Russian]. (**Голубев В. Н.** Биологическая флора Крыма. 2-е изд. Ялта: НБС-ННЦ, 1996. 126 с.).
- Gower J. C.** 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27: 857–874. DOI: 10.2307/2528823
- Greuter W., Burdet H. M., Long G.** 1989. *Med-Checklist. Vol. 4. Dicotyledones (Lauraceae-Rhamnaceae)*. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Geneva. URL: <http://ww2.bgbm.org/mcl/>
- Grossheim A. A.** 1930. *Flora Kavkaza. Dvudolnyye (Saururaceae – Leguminosae)* [Flora of the Caucasus. Dicotyledons (Saururaceae – Leguminosae)]. Vol. 2. Tiflis, 438 pp. [In Russian]. (**Гроссгейм А. А.** Флора Кавказа. Двудольные (Saururaceae – Leguminosae). Т. 2. Тифлис, 1930. 438 с.).
- Hall T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D.** 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1–9. URL: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Heyn C. C.** 1970. *Lotus L.* In: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 3. Ed. P. H. Davis. Edinburgh University Press, Edinburgh, 518–531 pp.
- Hodač L., Scheben A. P., Hojsgaard D., Paun O., Hörandl E.** 2014. ITS Polymorphisms Shed Light on Hybrid Evolution in Apomictic Plants: A Case Study on the *Ranunculus auricomus* Complex. *PLoS ONE* 9(7): e103003. DOI: 10.1371/journal.pone.0103003
- Hřibová E., Čížková J., Christelová P., Taudien S., de Langhe E., Doležel J.** 2011. The ITS1-5.8S-ITS2 Sequence Region in the Musaceae: Structure, Diversity and Use in Molecular Phylogeny *PLoS ONE* 6(3): e17863. DOI: 10.1371/journal.pone.0017863
- Kato T., Kaneko T., Sato S., Nakamura Y., Tabata S.** 2000. Complete Structure of the Chloroplast Genome of a Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* 7: 323–330. DOI: 10.1093/dnares/7.6.323
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T.** 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066. DOI: 10.1093/nar/gkf436
- Katoh K., Standley D. M.** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772–780. DOI: 10.1093/molbev/mst010
- Kramina T. E., Degtjareva G. V., Meschersky I. G.** 2012. Analysis of hybridization between tetraploid *Lotus corniculatus* and diploid *Lotus stepposus* (Fabaceae-Loteae): morphological and molecular aspects. *Plant Systematics and Evolution* 298: 629–644. DOI: 10.1007/s00606-011-0572-6
- Kramina T. E., Degtjareva G. V., Samigullin T. H., Valiejo-Roman C. M., Kirkbride J. H. Jr., Volis S., Deng T., Sokoloff D. D.** 2016. Phylogeny of *Lotus* (Leguminosae: Loteae): Partial incongruence between nrITS, nrETS and plastid markers and biogeographic implications. *Taxon* 65(5): 997–1018. DOI: 10.12705/655.4
- Kramina T. E., Meschersky I. G., Degtjareva G. V., Samigullin T. H., Belokon Yu. S., Schanzer I. A.** 2018. Genetic variation in the *Lotus corniculatus* complex (Fabaceae) in Northern Eurasia as inferred from nuclear microsatellites and plastid *trnL-trnF* sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 188: 87–116. DOI: 10.1093/botlinnean/boy042
- Kramina T. E., Samigullin T. H., Degtjareva G. V., Meschersky I. G., Lysova M. V., Sokoloff D. D.** 2019. Genus *Lotus* (Leguminosae): phylogeny and genetic structure of species. *Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok. – Vostok Marine Biological Station, September 8–13, 2019: Program & Abstracts*. Vladivostok, p. 35.
- Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K.** 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299–306. DOI: 10.1093/bib/bbn017
- Lassen P.** 1986. *Acmispon* sect. *Simpeteria*, *Acmispon roudairei*, *Dorycnium strictum*, *Lotus benoistii*. *Willdenowia* 16(1): 107–112.
- Ledebour C. F. von.** 1820. *Index Seminum Horti Academici Dorpatensis*. Dorpati Livon., 1–18 pp.
- Linnaeus C.** 1751. *Philosophia Botanica*. Stockholmiae, 362 pp. (Перевод на русский язык: **Линней К.** Философия ботаники. М.: Наука, 1989. 456 с.).
- Linnaeus C.** 1753. *Species Plantarum*. Т. 2. Holmiae, 561–1199 pp.
- Miller Ph.** 1754. *The Gardeners Dictionary*. Ed. 4. Vol. 1. London, Sine pag.
- Minjaev N. A.** 1987. *Dorycnium* Mill. In: *Flora yevropeyskoy chasti SSSR* [Flora Partis Europaeae URSS]. Vol. VI. Nauka, Leningrad, 115–119 pp. [In Russian]. (**Миняев Н. А.** *Dorycnium* Mill. // Флора европейской части СССР. Т. VI. Л.: Наука, 1987. С. 115–119).
- Peruzzi L., Bedini G., Andreucci A.** 2012. Homoploid hybrid speciation in *Doronicum* L. (Asteraceae)? Morphological, karyological and molecular evidences. *Plant Biosystems* 146(4): 867–877. DOI: 10.1080/11263504.2011.634445
- Punina E. O., Machs E. M., Krapivskaya E. E., Kim E. S., Mordak E. V., Myakoshina Yu. A., Rodionov A. V.** 2012. Interspecific hybridization in the genus *Paeonia* (Paeoniaceae): polymorphic sites in transcribed spacers of the

- 45S rRNA genes as indicators of natural and artificial peony hybrids. *Russian Journal of Genetics* 48(7): 684–697. DOI: 10.1134/S1022795412070113
- Rechinger K. H.** 1984. *Dorycnium*. In: *Flora Iranica*. № 157. Ed. by K. H. Rechinger. Akademische Druck und Verlagsanstalt, Graz, Austria, 344–346 pp.
- Rikli M.** 1901. Die Gattung *Dorycnium*. *Bot. Jahrb.* Bd. 31: 314–404.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E., Sánchez-Gracia A.** 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299–3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
- Sandral G., Degtjareva G. V., Kramina T. E., Sokoloff D. D., Samigullin T. H., Hughes S., Valiejo-Roman C. M.** 2010. Are *Lotus creticus* and *Lotus cytisoides* (Leguminosae) closely related species? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequence data. *Genet. Resources Crop Evol.* 57: 501–514. DOI: 10.1007/s10722-009-9486-3
- Sokoloff D. D.** 2003. On taxonomy and phylogeny of the tribe *Loteae* DC. (Leguminosae). *Byulleten MOIP. Otdel biologicheskij* [Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological series] 108, 3: 35–48 [In Russian]. (**Соколов Д. Д.** 2003. О системе и филогении трибы *Loteae* DC. (Leguminosae) // Бюл. МОИП. Отд. биол., 2003. Т. 108, вып. 3. С. 35–48).
- StatSoft Inc.** 2006. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. URL: www.statsoft.com (<https://www.tibco.com/products/tibco-statistica>)
- Steinberg E. I.** 1945. *Dorycnium* L. In: *Flora SSSR [Flora of the USSR]*. Т. XI. Publishers of Academy of Sciences of USSR, Moscow, Leningrad, 281–284 pp. [In Russian]. (**Штейнберг Е. И.** Род Дорикниум – *Dorycnium* L. // Флора СССР. Т. 11. М. – Л.: Изд-во Акад. наук СССР, 1945. С. 281–284).
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.** 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109. DOI: 10.1007/BF00037152
- Villars D.** 1779. *Prospectus de l'Histoire des plantes de Dauphiné, et d'une nouvelle méthode de botanique, suivi d'un catalogue des plantes*. Grenoble: l'Imprimerie royale, [1]–56, 49 [i.e. 57] p., 1 h. de grab. calc.
- Villars D.** 1788. *Histoire des plantes de Dauphiné*. Tome troisieme. [i]–xxxii. Grenoble, Lyon, Paris, [1]–580 pp.
- Vural M., Tan K.** 1983. New taxa and records from Turkey. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 41(1): 65–76.
- Wen J., Zimmer E. A.** 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the Ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6(2): 167–177. DOI: 10.1006/mpev.1996.0069
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. Academic Press, San Diego, 315–322 pp.
- Yena A. V.** 2012. *Spontaneous flora of the Crimean Peninsula*. N. Orianda, Simferopol, 232 pp. [In Russian]. (**Ена А. В.** Природная флора Крымского полуострова. Симферополь: Н. Орианда, 2012. 232 с.).
- Zernov A. S.** 2006. *Flora Severo-Zapadnogo Kavkaza*. Tovarithchestvo nauchnykh izdaniy KMK, Moscow, 664 pp. [In Russian]. (**Зернов А. С.** Флора Северо-Западного Кавказа. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 664 с.).