

БИОЛОГИЯ

Ботаника. Почвоведение

УДК 582.542

DOI 10.18101/2587-7148-2019-2-5-14

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ *PAPAVER POPOVII* SIPL. СРЕДИ МАКОВ БАЙКАЛЬСКОЙ СИБИРИ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н. К. Бадмаева, Н. Б. Ешисамбуева, Е. В. Бухарова, Б-Ц. Б. Намзалов

© **Бадмаева Наталья Карловна**

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьянова, 6
E-mail: badmayevan@mail.ru

© **Ешисамбуева Наталья Баторовна**

«Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова»
670000, Улан-Удэ ул. Смолина, д. 24а
E-mail: Darieshisambueva@yandex.ru

© **Бухарова Евгения Васильевна**

Кандидат биологических наук, «Заповедное Подлеморье»
670045, Улан-Удэ, ул. Комсомольская, 44-64
E-mail: darakna@mail.ru

© **Намзалов Бимба-Цырен Батомункуевич**

Доктор биологических наук, профессор
«Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова»
670000, Улан-Удэ ул. Смолина, д. 24а
E-mail: namzalov@rambler.ru

В работе приведены сведения по межвидовым отношениям 8 характерных таксонов рода *Papaver* L. Забайкалья и Прибайкалья, Восточного Саян. Проведено молекулярно-генетическое исследование маков региона и их отношение эндемику побережья оз. Байкал *Papaver popovii* Sipl. В результате сравнительного анализа получены данные о родстве маков Байкальской Сибири. Выявлены связи родства между видами *P. rubro-aurantiacum*, *P. pseudocanescens* и *P. setosum*, объединяющиеся в одну кладу. С другой стороны анализ образцов из различных забайкальских популяций одного вида *P. nudicaule* показали их неоднородность и при этом они также имели некоторые морфологические отличия. Результаты исследований подтвердили самостоятельность эндемичного таксона *Papaver popovii* Sipl. Однако генетический анализ обнаружил близость ее с другим эндемичным видом западного побережья Байкала — *P. olchonense*. Следует также отметить, что анализ древа подтвердил самостоятельность таких видов

как *P. croceum* и *P. czekanowskii*. Заслуживает внимания позиция *P. rubro-aurantiacum*, формирующая субкладу из родства *P. setosum* — *P. pseudocanescens*.

Ключевые слова: род *Papaver*, ISSR-анализ, ITS1–5.8S–ITS2, филогенетическое дерево.

Для цитирования:

Бадмаева Н. К., Ешисамбуева Н. Б., Бухарова Е. В., Намзалов Б-Ц. Б. Систематическое положение *Papaver porovii* Sipl. среди маков Байкальской Сибири на основе молекулярно-генетических исследований // Вестник Бурятского государственного университета. Биология, география. 2019. № 2. С. 5–14.

Вид *Papaver porovii* Sipl. впервые описан В.Н. Сипливинским по его собственным сборам 8.09.1971 г. с острова Мохнатый Калтыгей в Чивыркуйском заливе оз. Байкал (Сипливинский, 1973). Изотип хранится в гербарии П.Н. Крылова (ТК), дубликат хранится в гербарии ЛЕ, Ботанического института (Гуреева, Балашова, 2017).

P. porovii — узколокальный эндемик побережий оз. Байкал, является ледниковым реликтом (Попов, Бусик, 1966) и краснокнижным редким охраняемым видом. В Бурятии отмечен в Баргузинском районе в Чивыркуйском заливе на островах Лохматый и Голый Калтыгей. Вне Бурятии в Иркутской области обнаружен в нескольких пунктах Ольхонского района: мысы Уюга, Зундук, Шартлай, Рытый и на острове Ольхон — мыс Хобой и Саган-Хушун (Красная книга Республики Бурятия ..., 2002; Красная книга Иркутской ..., 2010; Красная книга Республики Бурятия ..., 2013).

На острове Лохматый Калтыгей отмечена популяция *P. porovii* площадью около 400 кв. м. Структура популяции полночленная, отмечается семенное возобновление. Плотность ценопопуляций — до 3 особей на 1 кв. м. Лимитирующими факторами, возможно, являются экзогенные факторы, такие как, эрозия каменисто-щебнистых склонов, усиление рекреационной нагрузки на местообитания.

Вид охраняется в пределах Забайкальского национального парка (Аненхонов, Пыхалова, 2010). Вне Бурятии большинство известных в Иркутской области популяций взяты под охрану в Байкало-Ленском заповеднике, Прибайкальском природном национальном парке и комплексном памятнике природы областного значения «Мыс Хобой» (Красная книга Иркутской ..., 2010).

P. porovii многолетнее травянистое рыхлодерновинное растение (рис. 1). Листья на длинных тонких черешках, разреженно беловолосистые, пластинки в 2–2,5 раза короче черешков, яйцевидные, дважды перисторассеченные, доли листьев продолговатые или яйцевидные, глубоко, почти до основания, надрезанные на линейно-ланцетные дольки. Цветоносы 12–45 см высотой, прижато опушенные светлыми волосками. Чашелистики густо опушены темно-бурыми или рыжеватыми волосками. Цветки 3–6 см диаметром, чаще белые, реже серно-желтые. Коробочки 1,0–1,5 см длиной, продолговато-обратнояйцевидные, с рассеянными светлыми или слегка рыжеватыми щетинками, иногда почти голые (Флора Сибири, 1994).



Рис. 1. *Papaver popovii* Sipl. Чивыркуйский залив, остров Лохматый. Мак Попова на крутых каменистых склонах с группировками *Draba hirta* L., *Cortusa sibirica* Andrз. и других. (Фото Е. В. Бухаровой)

В систематике рода *Papaver* L. много вопросов, связанных с таксономией. Некоторые морфологические признаки сильно варьируют в зависимости от экологических условий. Хотя количество видов, произрастающих на территории Байкальской Сибири невелико, высок процент эндемиков от общего числа видов (Флора Сибири, 1994; Малышев, Пешкова, 1984).

Во «Флоре СССР» (1937) род обработан М. Г. Поповым и число таксонов составляет 52, из них 8 видов отмечалось в Восточной Сибири. С. К. Черепанов (1995) указывает 99 таксонов рода *Papaver* для России и сопредельных государств, из них 26 таксонов приводятся для Восточной Сибири. Во «Флоре Сибири» (1994) в обработке Г. А. Пешковой род представлен 32 таксонами. По «Определителю растений Бурятии» (2001) в обработке К. И. Осипова 12 видов встречаются в Западном Забайкалье. По «Конспекту Флоры Азиатской России» (2012) 18 таксонов указаны для Байкальской Сибири.

Материалы и методы.

ДНК выделен из 11 гербарных образцов 8 таксонов (Таблица 1.). Ваучерные гербарные образцы хранятся в гербарии UUN.

Молекулярно-генетические исследования проводились по общепринятым протоколам с индивидуальным подбором праймеров и условий амплификации.

Тотальную ДНК выделяли из 20 мг высушенных в силикагеле образцов с использованием кита «NucleoSpin Plant II Kit» (Macherey-Nagel, Германия) по стандартному протоколу производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в термоциклере BIO-RAD T100™ (BIO-RAD, США).

Таблица 1

Список образцов для молекулярно-генетического исследования

№	Виды	Происхождение образца (ваучер)
1	<i>P. nudicaule L.</i>	Гербарий высших растений Иркутского госуниверситета РБ. Кяхтинский р-н, 3,8 км ЮВ с. Мурочи грядовые пески. Н. А. Дулепова
2	<i>P. nudicaule L.</i>	Гербарий высших растений Иркутского госуниверситета. РБ. Селенгинский р-н, у парома через р. Чикой, в районе впадения его в Селенгу. 12.06.2006 г. Соб.: И. Евтушенко, Е. Ведерникова. Опр.: Н. А. Дулепова
3	<i>P. croceum</i>	ИОЭБ СО РАН Гербарий УУН. Восточный Саян, Китойские Гольцы, левобережье Горлык-Гола, верх. ключа Зеленого. h-2300 м., альпийский луг. Соб.: Шумкин В. П. 30 июля 2002г.
4	<i>P. popovii Sipl.</i>	ИОЭБ СО РАН Гербарий УУН. Баргузинский р-н, Чивыркуйский залив, о. Большой Калтыгей, N 53°48.930, E 109°05.063, Крутой каменистый склон. Соб.: Бадмаева Н.К. 5.07. 13.
5	<i>P. czekanovskii</i>	ИОЭБ СО РАН Гербарий УУН. Баунтовский район долина реки Горбылок Глинисто песчаный берег. Г. А. Пешкова, 1991.
6	<i>P. nudicaule L.</i>	Гербарий высш. раст. Иркутского госуниверситета. РБ, Бичурский р-н, 10 км СВ от пос. Окино-Ключи, лев. берег р. Хилок. Парковый ильмовник в пойме реки. 14.06.2006 Собрал: В. Чепинога, А. Фролов; Определил: Н. А. Дулепова. №16107
7	<i>P. olchonense</i> Peshkova	Гербарий Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Ирк) Иркутская область, Ольхонский р-н, поб-е оз. Байкал, мыс. Уюга, Галечниковый перешеек. 4.09.2010 г. Соб.: Д. А. Кривенко, Е. С. Преловская. 15.11.2010 г. Опр: С. Г. Казановский
8	<i>P. rubro-aurantiacum</i> Ficher ex R.Sweet	Гербарий УУН Института биологии БФ СО АН СССР. РБ. Кабанский р-н, степь. Соб.: Т. Г. Бойков
9	<i>P. rubro-aurantiacum</i> Ficher ex R.Sweet	ИОЭБ СО РАН Гербарий УУН. РБ Еравинский р-н. Долина р.Зазы, в 5 км к сев.-востоку от устья р. Ехэ Горхон, 982 м. N 53°12'351" E 111°48.960". Злаково-разнотравная степь Соб. и опр.: О. А. Аненхонов, 2008
10	<i>P. psedocanescene</i>	Гербарий УУН Института биологии БФ СО АН СССР. РБ. Окинский р-н долина р. Китой, 10 км к зап. От устья р. Сатан-Сойр на песчаной осыпи. Соб. и опр.: О. А. Аненхонов 24.08.1992
11	<i>P. setosum</i>	Гербарий УУН Института биологии БФ СО РАН СССР РБ, хр. Улан-Бургасы, долина р. Мостовая, опушка леса. Соб. и опр.: Т. Г. Бойков 11.07.1986

Амплификация ДНК для участка *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК проводилась в растворе объемом 20 мкл, содержащем 2 мкл 10x *Tag*-буфера; 2 мкл 25 мМ $MgCl_2$ (финальная концентрация — 2,5 мМ); 2 мкл 10 мМ dNTPs (финальная концентрация — 0,2 мМ); 1 мкл DMSO (4%); 1 мкл 10 пмоль прямого (F) и 1 мкл 10 пмоль обратного (R) праймеров; 8,7 мкл стерильной деионизированной воды (dd H_2O); 0,3 мкл *Tag*-полимеразы (5 ед/мкл); 2 мкл геномной ДНК (20–40 нг/мкл) (реактивы и праймеры фирмы «Синтол», Россия). Участок *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК амплифицировали с использованием праймеров: ITS1 (F), ITSB (R) и ITS2 (R) (табл. 3) в программе по A. Gardiner et al. (2005). ПЦР-продукты визуализировали в 1%-ном агарозном геле с использованием SybrGreen (фирмы «BioDye» Москва, Россия) при 4 В/см. Амплификат очищали набором Mini Elute PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК измеряли флуориметром Qubit (Invitrogen, США). Секвенирование *ITS1-5.8S-ITS2* рДНК выполнялось по методу Сэнгера на базе «Синтол» (Москва). Последовательности выравнивали вручную в программе BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Филогенетическое дерево на основе ITS1–5.8S–ITS2 региона построено в программе Winclada, с применением программы Nona.

Результаты и обсуждение

Для определения уровней межвидового полиморфизма, и определения взаимоотношений между видами и точного идентифицирования образцов, был использован метод, основанный на применении ISSR-анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов с ISSR-праймерами. Для ISSR-анализа видов исследуемого рода был проведен предварительный поиск рабочих праймеров. Были протестированы 17 ISSR-праймеров. Длина праймеров составила от 11 п.н. до 18 п.н., температура отжига от 36 до 58,7 °С. Из них были выбраны пять праймеров, которые дали наибольшее количество ампликонов в пределах от 200 до 1500 пар нуклеотид: 17898A, 17898B, UBC-857, UBC-818, 835-B. В таблице 2 даны характеристики рабочих праймеров.

Таблица 2

Характеристика праймеров для амплификации ISSR

Праймер*	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Формула	Темп-ра отжига, °С.
17898A	CACACACACACAAC	(CA)6AC	42
17898B	CACACACACACAGT	(CA)6GT	42
UBC857B	ACACACACACACACTG	(AC)8TG	36
UBC818	CACACACACACACAG	(CA)G	36
UBC835B	AGAGAGAGAGAGAGATT	(AG)8TT	52

*Праймеры синтезированы в компании «Евроген» (Москва).

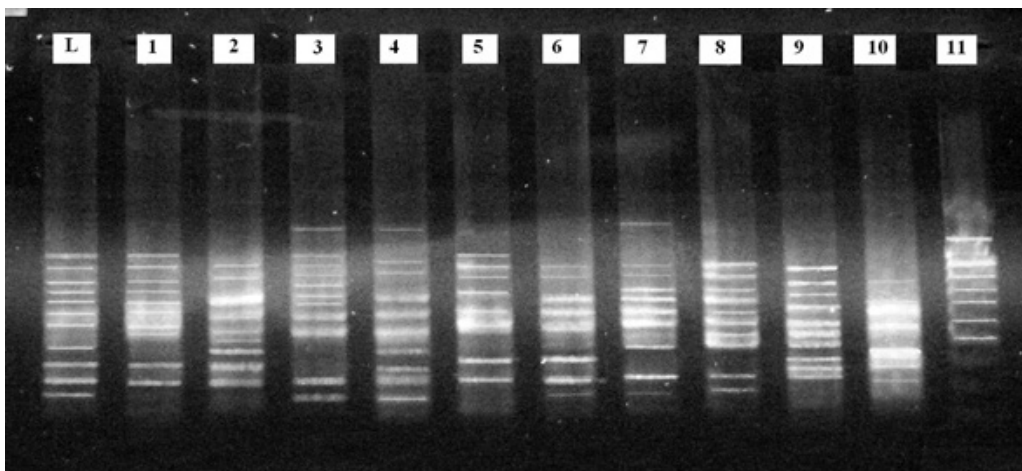


Рис. 2. Гель с праймера 835-В. L — мол. линейка. Номера образцов даны выше в тексте.

На рисунке 2. показана наиболее информативная гель-электрофорез с праймера 835-В. При обработке пяти гелей была составлена бинарная матрица, где отсутствие ампликона обозначали «0», присутствие «1». На основании полученной матрицы с пяти праймеров с использованием методов иерархического кластерного анализа (UPGMA) в программе «Статистика» и ближайшего связывания в программе TreescopW 3.2 определены генетические расстояния между видами и построены дендограммы, отражающие взаимоотношения анализируемых видов рода *Papaver* (рис. 3 и 4).

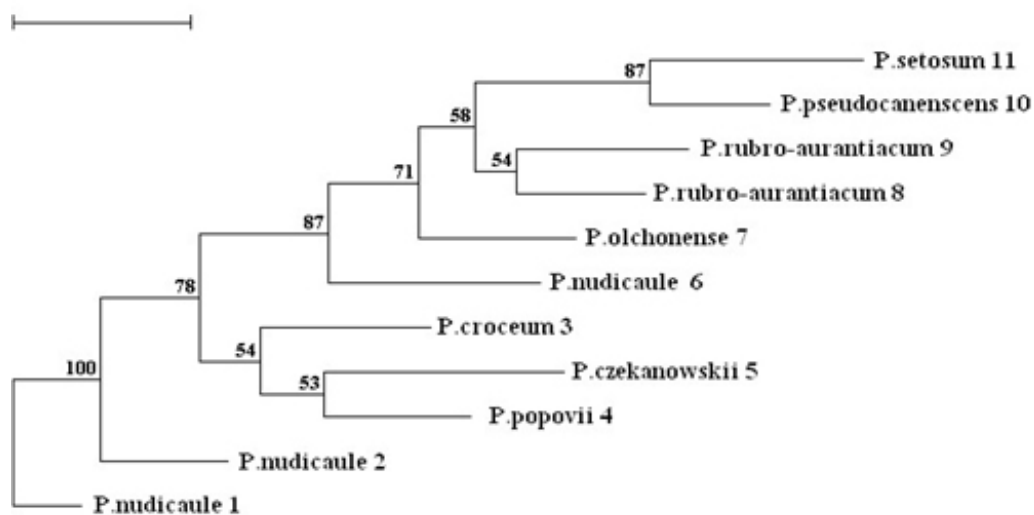


Рис. 3. ISSR-дендрограмма построенная при помощи кластерного анализа UPGMA, показывающее взаимоотношения 8 видов рода *Papaver* Западного Забайкалья.

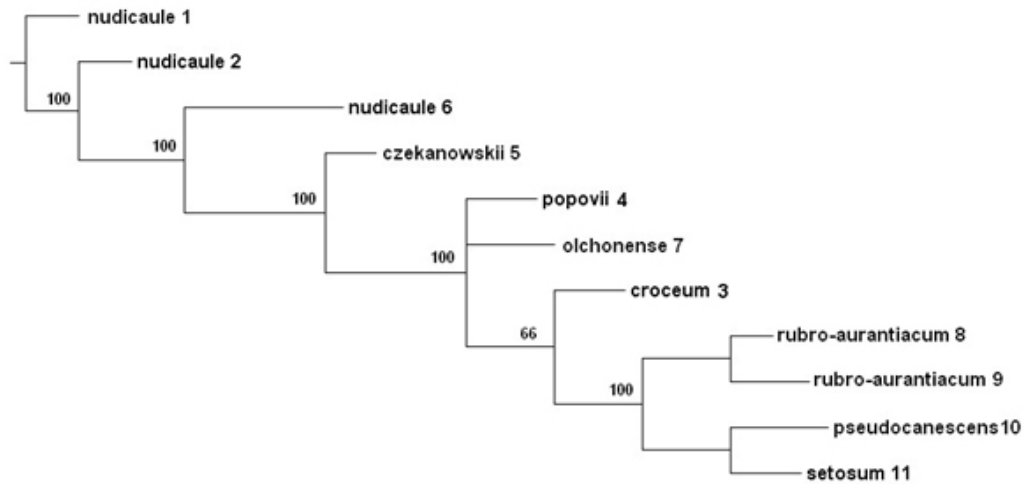


Рис. 4. ISSR-дендрограмма построенная по методу ближайшего связывания, показывающее взаимоотношения 8 видов рода *Papaver* Западного Забайкалья.

Обе ISSR-дендрограммы дали более-менее одинаковые результаты. Так, например, на обеих дендрограммах *P. pseudocanescens* (обр.10) группируется в одном кластере с *P. setosum* (обр.11). И особенно выделяется *P. olchonense* (обр.7), он образует свой отдельный кластер. На UPGMA дендрограмме хорошо выделяется две большие клады, образцы видов *P. nudicaule* (обр.1) (Кяхтинский район), *P. nudicaule* (обр.2) (Селенгинский район), *P. croceum* (обр.3) (Восточный саян), *P. popovii* (обр.4) (Баргузинский район), *P. czezanowski* (обр.5) (Баунтовский район), *P. nudicaule* (обр.6) (Бичурский район) вошли в первую кладу. А образцы видов *P. rubro-aurantiacum* (обр.8–9) (Еравинский район, Кабанский район), *P. pseudocanescens* (обр.10) (Окинский район), *P. setosum* (обр.11) (Хр. Улан-Бургасы) составили вторую кладу, также вторая клада распадается еще на две маленькие субклады. Два образца вида *P. rubro-aurantiacum* (обр.8–9) из Кабанского и Еравнинского районов объединяются в одну субкладу. Образцы *P. pseudocanescens* (обр.10) из Окинского района и *P. setosum* (обр.11) с хр. Улан-Бургасы группируются в первую маленькую субкладу. *P. popovii* (обр.4) и *P. czezanowski* (обр.5) объединяются в одну субкладу.

Следует указать, что филогенетическое дерево, построенное на основе ITS1–5.8S–ITS2 подтверждает данные, полученные на основе деревьев ISSR-гелей (рис. 5).

В целом, полученные нами результаты позволяют сделать некоторые выводы о родственных связях в изученной группе видов. Образцы вида *P. rubro-aurantiacum* из Кабанского и Еравнинского районов и *P. pseudocanescens* (Окинский район долина реки Китой), *P. setosum* (Хр. Улан-Бургасы, долина р. Мостовая) объединяются в одну кладу, что доказывает родственные отношения.

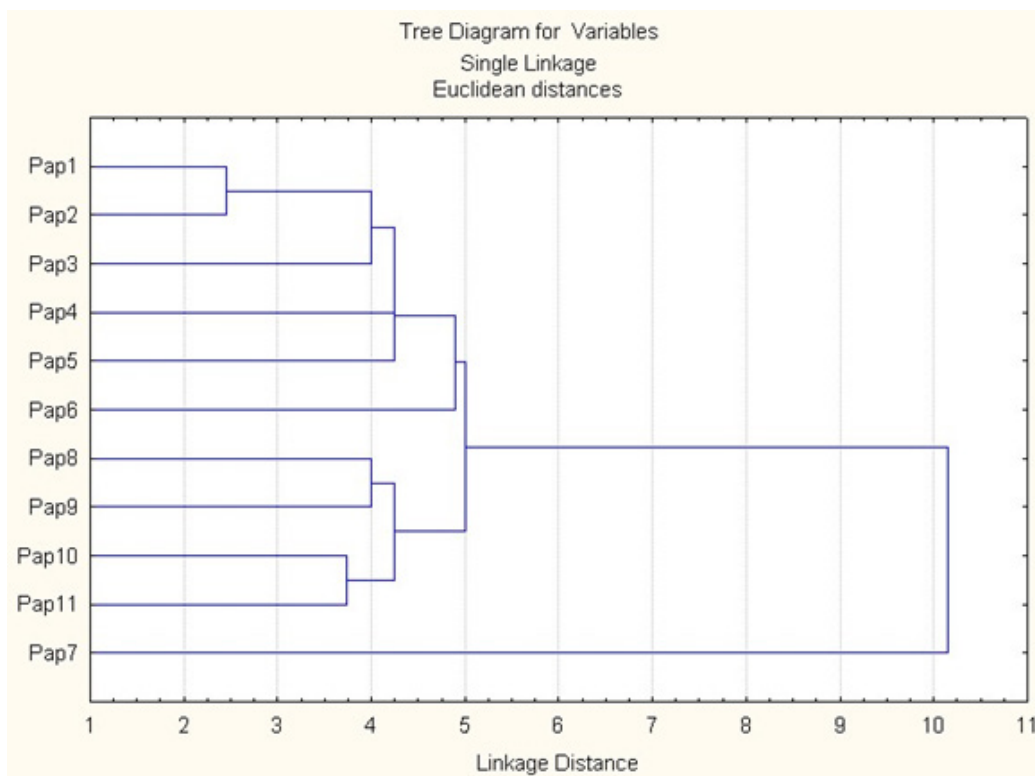


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное на основе ITS1–5.8S–ITS2 региона, показывающее взаимоотношения изученных видов рода *Papaver*.

На основании полученного филогенетического дерева на основе последовательностей ITS1–5.8S–ITS2, можно утверждать, что *P. porovii* (Баргузинский район, Чивыркуйский залив, о. Большой Калтыгей), является эндемиком и самостоятельным таксоном, и в то же время близок с эндемиком *P. olchonense* (Иркутская область, Ольхонский район, маломорское побережье оз. Байкал, мыс. Уюга). Анализ дерева также подтвердил самостоятельность таких видов, как *P. rubroaurantiacum*, *P. croceum*, *P. czekanowskii*.

Образцы вида *P. nudicaule* 1 (Кяхтинский район), *P. nudicaule* 2 (Селенгинский район), *P. nudicaule* 6 (Бичурский район) на древе не объединились в одну кладу. ISSR– и ITS–анализы показали неоднородность 3-х образцов *P. nudicaule* из разных районов, морфологически эти образцы также сильно отличались. Нельзя сделать окончательные выводы и по таким видам, как *P. pseudocanescens* и *P. setosum*, которые группируются в одну кладу.

Благодарности. Сбор образцов проведен при поддержке проекта РФФИ № 18-45-030026; молекулярно-генетические исследования проведены при поддержке бюджетного проекта ИОЭБ СО РАН № АААА-А17-117011810036-3 и гранта БГУ № 19-10-0502

Литература

1. Аненхонов О. А., Пыхалова Т. Д. Конспект флоры сосудистых растений Забайкальского национального парка. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2010. 228 с.
2. Гуреева И. И., Балашова В. Ф. Типовые образцы *Papaveraceae* Juss. в Гербарии им. П. Н. Крылова (ТК) // Систематические заметки. 2017. № 116. С. 29–37.
3. Конспект Флоры Азиатской России: Сосудистые растения / Л. И. Малышев [и др.]; под ред. К. С. Байкова. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 640 с.
4. Красная книга Иркутской области / Правительство Иркутской области. Министерство природных ресурсов и экологии Иркутской области. Ответственный редактор В. В. Попов. Иркутск: ООО Изд-во «Время странствий», 2010. 480 с.
5. Красная книга республики Бурятия: Редкие и исчезающие виды растений и грибов / Изд. 2-е перераб. и доп. Новосибирск: Наука, 2002. 340 с.
6. Красная книга Республики Бурятия: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов / Изд. 3-е, перераб. и доп., отв. ред. Н. М. Пронин. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2013. 688 с.
7. Малышев Л. И., Пешкова Г. А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Москва: Наука, 1984. 266 с.
8. Определитель растений Бурятии / под ред. О. А. Аненхонова. Улан-Удэ, 2001. 672 с.
9. Попов М. Г., Бусик В. В. Конспект флоры побережий озера Байкал. М.–Л.: Наука, 1966. 216 с.
10. Сипливинский В. Н. Заметки о байкальской флоре, 1 // Новости систематики высших растений. 1973. Т. 10. С. 345–361.
11. Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1994. Т. 7. 312 с.
12. Флора СССР / под ред. В. Л. Комарова, Б. К. Шишкина. Москва; Ленинград: Изд-во Академии Наук СССР, 1937. Т. 7. 790 с.
13. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб.: Мир и семья, 1995. 992 с.
14. Gardiner, A., Ignatov M., Huttunen S. & Troitsky A. On resurrection of the families Pseudoleskeaceae Schimp. and Pylaisiaceae Schimp. (Musci, Hypnales) // Taxon. 2005. Vol. 54. P. 651–663.
15. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. // Nucl. Acids. Symp. 1999. Ser. 41. P. 95–98.

THE SYSTEMATIC POSITION OF PAPAVER POPOVII SIPL. AMONG THE POPPIES OF BAIKAL SIBERIA BASED ON MOLECULAR GENETIC STUDIES

N. K. Badmaeva, N. B. Eshisambueva, E. V. Bukharova, B. B. Namzalov

Badmaeva Natalya Karlovna

Cand. Sci. (Biol.),

Institute of General and Experimental Biology SD RAS, 8 Sahyanova st., Ulan-Ude, 670047

E-mail: badmayevan@mail.ru

Yeshisambueva Natalya Batorovna

Banzarov Buryat State University, 24a Smolina st., Ulan-Ude, 670000

E-mail: Darieshisambueva@yandex.ru

Bukharova Evgenia Vasilyevna

Cand. Sci. (Biol.),
Federal State Institution "Zapovednoe Podlemorye",
44-64 Komsomolskaya st., Ulan-Ude, 670045
E-mail: darakna@mail.ru

Namzalov Bimba-Tsyren Batomunkuevich

Doctor of Biological Sciences, professor
Banzarov Buryat State University, 24a Smolina st., Ulan-Ude, 670000
E-mail: namzalov@rambler.ru

The article presents information on interspecific relations of 8 characteristic taxa of the genus *Papaver* L. of Transbaikalia, Pribaikalye and Eastern Sayan. A molecular genetic study of poppies in the region and their relationship to the endemic of the coast of the lake Baikal *Papaver popovii* Sipl. Because of a comparative analysis, data on the relationship of poppies of the Baikal Siberia were obtained. Relationships between the species of *P. rubro-aurantiacum*, *P. pseudocanescens* and *P. setosum*, uniting into one clade, are revealed. On the other hand, the analysis of samples from different Transbaikalian populations of the same species of *P. nudicaule* showed their heterogeneity and, at the same time, they also had some morphological differences. The study results confirmed the independence of the endemic taxa *Papaver popovii* Sipl. However, genetic analysis revealed its proximity with another endemic species of the western coast of Lake Baikal — *P. olchonense*. It should also be noted that the analysis of the phylogenetic tree confirmed the independence of such species as *P. croceum* and *P. czekanowskii*. The position of *P. rubro-aurantiacum*, which forms the subclade from the relationship of *P. setosum* — *P. pseudocanescens*, deserves attention.

Keywords: genus *Papaver* L, ISSR-analysis, ITS1-5.8S-ITS2, phylogenetic tree.