

СООБЩЕНИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *CORYDALIS BRACTEATA* SENSU LATO (PAPAVERACEAE) ИЗ ЮЖНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. К. К. Рябова^{1,2,*}, И. Е. Ямских^{1,**}, Н. В. Степанов^{1,***}, М. Г. Куцев^{1,3,****}

¹Сибирский федеральный университет

пр-т Свободный, 79, Красноярск, 660041, Россия

²Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр СО РАН”

ул. Академгородок, 50, Красноярск, 660036, Россия

³Алтайский государственный университет

пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия

*e-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru

**e-mail: iyamskikh@mail.ru

***e-mail: stepanov-nik@mail.ru

****e-mail: m_kucev@mail.ru

Поступила в редакцию 09.03.2023 г.

Получена после доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

В работе впервые проведено изучение морфологического и генетического разнообразия 6 популяций *Corydalis bracteata* Pers. s.l., произрастающих в растительных сообществах Красноярской лесостепи, Западного Саяна, Кузнецкого Алатау, Алтая. В ходе морфологического анализа выявлено разделение совокупности популяций на две группы. Наличие крупного вытянутого дополнительного клубенька в пазухе прикорневой чешуи, крупные размеры прицветника и цветков, максимальная высота растений сближают особи из красноярской и западносаянской популяций с недавно описанным видом *Corydalis talpina* Stepanov – хохлаткой кротовой. Эти результаты подтверждаются и проведенным ISSR-PCR анализом генетической изменчивости популяций хохлатки. Высокие значения коэффициента подразделенности популяций ($G_{st} = 37.58\%$) свидетельствуют о наличии в общей выборке разных видов. Разделение на две группы также продемонстрировано при построении дендрограммы и при кластеризации генотипов с использованием байесовского подхода, реализованного в программном обеспечении STRUCTURE 2.3.4. Секвенирование последовательностей хлоропластного гена *matK* и межгенного спейсера *trnB-trnC* показало, что растения из популяций СВ1 и СВ2, выделяемых нами в вид *C. talpina*, отличаются от других образцов тремя видоспецифичными нуклеотидными заменами (SNPs), одна из которых – миссенс-мутация. Согласованные результаты морфологического и генетического анализов свидетельствуют о дифференциации популяций желтоцветковых хохлаток из Южной Сибири, изначально относимых к виду *C. bracteata*, и указывают на морфологическую и генетическую обособленность *C. talpina*.

Ключевые слова: морфологическое разнообразие, генетическое разнообразие, хохлатка крупноприцветниковая, хохлатка кротовая, ISSR-PCR маркеры, филогенетический анализ, *Corydalis bracteata*, *C. talpina*, Fumarioidae, Papaveraceae

DOI: 10.31857/S0006813624010069, EDN: EWXODA

Род хохлатка (*Corydalis* DC.), относящийся к семейству Papaveraceae, подсемейству Fumarioidae, является таксономически сложным и включает 546 видов (<http://www.worldfloraonline.org>). По данным «Конспекта флоры Азиатской

России» (Malyshev, 2012), распространенным видом на этой территории является *C. bracteata* Pers., относящийся к секции *Pes-gallinaceus* Irmisch. Из родства *C. bracteata* с севера Красноярского края К.Ф. Ледебуром был описан

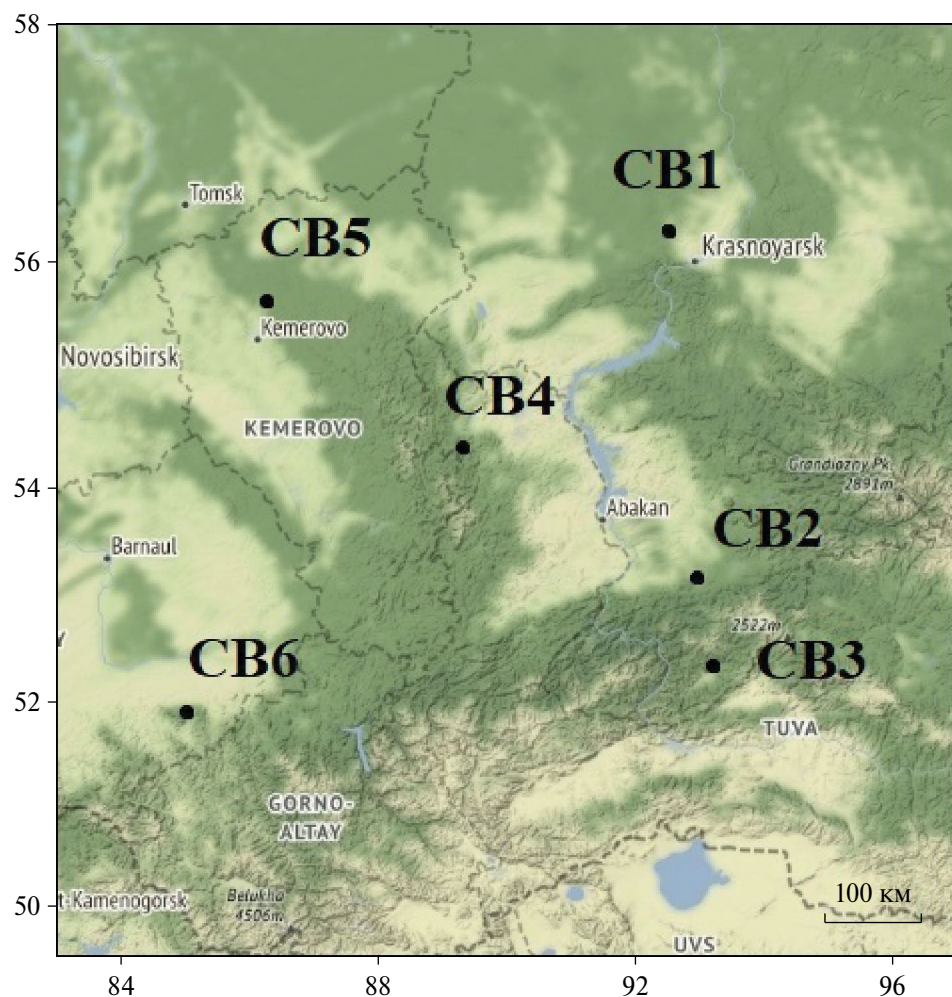


Рис. 1. Расположение популяций *Corydalis bracteata* s. l. (нумерация в соответствии с табл. 1).

Fig. 1. Map of the location of *Corydalis bracteata* s. l. populations (the numbers correspond to Table 1).

вид *Corydalis gracilis* Ledeb. (Ledebour, 1842), а с территории Приенисейских Саян недавно было описано еще два вида — *Corydalis talpina* Stepanov и *Corydalis bombylina* Stepanov (Stepanov, 2015). В иностранной литературе *C. bracteata* входит в секцию *Corydalis* в связи с объединением секций *Pes-gallinaceus* Irmisch. и *Raphanituber* Khokhryakov (Zhang et al., 2008).

C. bracteata s.l. имеет неморальную природу, является весенним эфемероидом. Основной ареал вида охватывает Южную Сибирь с явным тяготением к западной ее части. Г.А. Пешкова (Peshkova, 1984) относит *C. bracteata* к монтанному элементу флоры, максимальную активность вид имеет в пределах черневого и подтаежного горных поясов, при этом тяготеет к мелколистным и смешанным лесным сообществам. По предварительным данным, *C. bracteata* s.str. распространен преимущественно на юге Западной

Сибири, а восточная граница может достигать р. Енисей. В остальных частях ареала *C. bracteata* замещается родственными видами. Один из них — *Corydalis talpina* — наиболее редкий, связанный с реликтовыми черневыми сообществами в нижних высотных поясах Приенисейских Саян (Stepanov, 2016). *C. bracteata* и *C. talpina* обладают морфологическим сходством, однако у особей *C. talpina* отмечено формирование дочернего клубенька в пазухе прикорневого листа. Для выявления таксономически значимых морфологических признаков с использованием методов современной статистики и изучения генетической дифференциации популяций желтоцветковой хохлатки нами были проведены настоящие исследования.

Цель исследований — сравнительный морфолого-генетический анализ популяций *Corydalis*

Таблица 1. Характеристика местообитаний *Corydalis bracteata* s.l.

Table 1. Description of habitats of *Corydalis bracteata* s.l.

№ популяции Population number	Фитоценоз; местоположение Phytocoenosis; location	Состав древостоя Stand composition	Доминирующие виды травяного яруса Dominants of the grass cover
Красноярская лесостепь (Красноярский край) / Krasnoyarsk forest-steppe (Krasnoyarsk Territory)			
CB1	Сосново-березовый лес, разнотравный; Емельяновский р-н, окр. д. Крутая Pine-birch forb forest; Emelyanovsky district, Krutaya village N56.259061°, E92.452176°	6Б2Е2С <i>Betula pendula</i> – 60% <i>Picea obovata</i> – 20% <i>Pinus sylvestris</i> – 20%	<i>Corydalis bracteata</i> (15%) <i>Carex macroura</i> (15%) <i>Calamagrostis arundinacea</i> (15%) <i>Adoxa moschatellina</i> (10%) <i>Equisetum pratense</i> (10%)
Западный Саян (Красноярский край) / Western Sayan (Krasnoyarsk Territory)			
CB2	Черневой осинник папоротниково-разнотравный; Ермаковский р-н, окр. пос. Танзыбей Chern aspen forest with fern and forb cover; Yermakovsky District, Tanzybey village N53.136475°, E92.915468°	8Ос2П <i>Populus tremula</i> – 80% <i>Abies sibirica</i> – 20%;	<i>Anemone altaica</i> (40%) <i>Matteuccia struthiopteris</i> (40%) <i>Corydalis bracteata</i> (20%) <i>Corydalis subjenisseensis</i> (10%)
CB3	Березово-лиственничный лес разнотравно-осочковый; Ермаковский р-н, природный парк “Ергаки”, кордон Таловка Birch-larch forest, with forb and sedge cover; Yermakovsky District, Natural Park “Ergaki”, Talovka ranger station N52.341828°, E93.164233°	6Л4Б <i>Larix sibirica</i> – 60% <i>Betula pendula</i> – 40%	<i>Carex macroura</i> (50%) <i>Corydalis bracteata</i> (10%) <i>Anemone jenseensis</i> (5%)
Кузнецкий Алатау (Республика Хакасия) / Kuznetsk Alatau (Republic of Khakassia)			
CB4	Смешанный лес разнотравно-осочковый; Ширинский р-н, окр. пос. Коммунар Mixed forest with forb and sedge cover; Shirinsky district, Kommunar village N54.347447°, E89.293087°	4Е3Б3Л <i>Picea obovata</i> – 40% <i>Betula pendula</i> – 30% <i>Larix sibirica</i> – 30%	<i>Carex macroura</i> (60%) <i>Corydalis bracteata</i> (20%) <i>Calamagrostis langsdorffii</i> (15%)
Кузнецкий Алатау (Кемеровская область) / Kuznetsk Alatau (Kemerovo Region)			
CB5	Пихтово-осиновый лес крупнотравный, окр. г. Кемерово; 55.470358° с.ш., 86.235021° в.д. Fir-aspen forest, with tall herbs, Kemerovo district, Kemerovo; N55.470358°, E86.235021°	7Ос3П <i>Populus tremula</i> – 70% <i>Abies sibirica</i> – 30%	<i>Corydalis bracteata</i> (20%) <i>Anemone altaica</i> (10%) <i>Erythronium sibiricum</i> (10%)
Алтай (Алтайский край) / Altai (Altai Territory)			
CB6	Смешанный лес разнотравно-орляковый; Смоленский район, окр. г. Белокурихи Mixed forest with forbs and bracken; Smolensky district, Belokurikha N51.916393°, E84.960607°	4Б3С3Ос <i>Betula pendula</i> – 40% <i>Pinus sylvestris</i> – 30% <i>Populus tremula</i> – 30%	<i>Pteridium pinetorum</i> (70%) <i>Carex macroura</i> (40%) <i>Corydalis bracteata</i> (30%) <i>Aegopodium podagraria</i> (20%)

bracteata sensu lato, произрастающих в горах Южной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала проводился в мае – июне 2018–2022 гг. в пределах Красноярской лесостепи (Емельяновский р-н), северо-восточной части Западного Саяна (Ермаковский р-н) Красноярского края, в восточных отрогах Кузнецкого Алатау (Ширинский р-н, Республика Хакасия), в центральной части Кузнецкого Алатау (окр. г. Кемерово), а также в предгорьях Алтая (окр. г. Белокурихи, Алтайский край) (рис. 1). Объектами исследований служили 6 популяций желтоцветковой хохлатки (табл. 1).

Измерения морфометрических параметров для оценки внутри- и межпопуляционной изменчивости проводились на 30 генеративных особях в каждой популяции. Для репрезентативности выборки использовался метод случайного отбора: по выбранной наугад линии, не повторяющей каких-либо определенных условий, отбиралось каждое седьмое растение (Shmidt, 1984). Большая часть оцениваемых нами морфометрических признаков приводится в качестве диагностических для определения видов во “Флоре Сибири” (Flora..., 1994). Измерены следующие параметры: длина цветоноса (x_1); длина стебля (x_2); количество цветков (x_3); длина прикорневой чешуи (x_4); длина (x_5), ширина (x_6), количество зубчиков (x_7) нижнего прицветника; длина отгиба (x_8), длина шпорца (x_9) венчика нижнего цветка; длина (x_{10}), ширина (x_{11}) клубенька в пазухе прикорневой чешуи. Также вычислялись относительные признаки: отношение длины цветоноса к длине стебля (x_1/x_2); форма нижнего прицветника (x_5/x_6); отношение длины венчика к длине шпорца (x_8/x_9); длина венчика (x_8+x_9); размер клубенька в пазухе прикорневой чешуи ($x_{10}*x_{11}$).

Тестирование данных на нормальность распределения признаков проводили с помощью метода Шапиро – Уилка (Shapiro, 1968). При математической обработке данных рассчитывали пределы варьирования признака, среднее арифметическое и его ошибку, среднее квадратичное отклонение, коэффициент вариации. Для установления достоверных различий

между средними значениями измеренных признаков использовали тест Тьюки, позволяющий проводить попарные сравнения между средними значениями каждой группы, реализуемые в пакете stats для RStudio версии 3.6.2. (Miller, 1981; Chambers, 1992; Yandell, 1997). Для изучения сопряженной изменчивости и выявления диагностического комплекса ключевых индикаторных признаков в общей морфологической структуре растений был использован метод главных компонент (Principal component analysis, PCA), реализованный в базовом пакете stats, с последующей визуализацией с помощью пакета factoextra версия 1.0.7 для R (Kassambara, Mundt, 2020). Собственные значения значимых факторов превышали единицу согласно критерию Кайзера (Kaiser, 1960), а совместный вклад в общую дисперсию составлял более 80%.

Образцами для генетического анализа служили выделенные ДНК 5–10 экземпляров из каждой популяции. Экстракцию тотальной ДНК производили с помощью коммерческого набора DiamondDNA (ООО «Научно-производственная фирма “Алтайбиотех”», 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”, Новосибирск) в следующем составе на один образец: 7 мкл ddH₂O; 4 мкл 5x ПЦР буфер (+MgCl₂); 4 мкл 10мМ праймера; 0.2 мкл HS-Taq DNA-полимеразы (5 ед. акт/мкл); 0.4 мкл 50x смеси dNTP; 2.4 мкл 50мМ MgCl₂; 2 мкл ДНК.

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). Предварительно на 2 образцах ДНК были выявлены праймеры, дающие воспроизводимый полиморфный результат (Mansour et al., 2009; Paterson et al., 2009). Разделение продуктов амплификации производилось в 1.3%-м агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере в ТАЕ-буфере при 220 V с применением бромистого этидия. Визуализацию продуктов амплификации проводили в проходящем УФ-излучении с помощью системы гель-документирования

Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали ДНК-маркеры (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск).

Электрофореграммы анализировали с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты. 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_o), генетические дистанции Нея (D), показатель подразделенности популяций (G_{st}). Дендрограмма сходства особей популяций строилась при помощи R-пакета pvcust (Suzuki, Shimodaira, 2006) невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA — unweighted pair-group method using arithmetic average) при 5000 репликаций бутстрэпа.

Для оценки генетической структуры популяций на основе данных ISSR-PCR анализа был использован байесовский подход (MCMC: марковская цепь Монте-Карло), реализованный в программном обеспечении STRUCTURE версии 2.3.4. (Pritchard et al., 2000). Использовалось длительное выгорание (Burn-In) 100 000 и MCMC 500 000 циклов. При проведении нескольких прогонов результаты были равнозначными, что говорит о стабильности результатов. Количество возможных кластеров (K) проверялось от 2 до 10.

Для проведения филогенетического анализа секвенировали участки хлоропластной ДНК: ген *matK* с использованием праймеров 1R_KIM (5'-CGT-ACA-GTA-CTT-TTG-TGT-TTA-CGA-G-3') и 3F_KIM (5'-CCC-AGT-CCA-TCT-GGA-AAT-CTT-GGT-TC-3') (Kim, 2010) и межгенный участок *rpoB-trnC* с праймерами rpoBF (5'-CCT-TGA-TCA-ATG-AAC-CTA-CAA-AAT-C-3') и trnCRR (5'-ATT-TGC-AGT-CCT-CTG-CCT-TAC-3') (Miikeda et al., 2006) производства ЗАО “Евроген” (г. Москва) в двух повторностях. Полимеразную цепную реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси с помощью набора для проведения ПЦР Биомастер HS-Taq ПЦР-Color 2x (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск) в следующем составе на один образец: 25 мкл готовой PCR-смеси

(ООО “Биолабмикс”, Новосибирск), 21 мкл ddH₂O, по 1 мкл 10мМ соответствующих праймеров (forward и revers), 2 мкл ДНК. Программа амплификации: 3 мин 95°C; 35 циклов: 20 с 95°C, 30 с 57°C, 30 с 72°C; 5 мин 72°C. Для секвенирования использовали набор реактивов BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, MD, USA). Определение нуклеотидных последовательностей Forward цепей ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MD, USA) (ЦКП “Геномика” СО РАН, г. Новосибирск).

Выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004), реализованного в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Для филогенетического анализа использовался метод максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) со значением параметра бутстрэпа 1000. В анализ были включены по 6 последовательностей, впервые секвенированных для *C. bracteata* s.l. участков *matK* и *rpoB-trnC*. Из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) были добавлены наиболее похожие соответствующие последовательности хохлаток секции *Corydalis* (Zhang et al., 2008; Xu et al., 2022). В качестве аутгруппы использовали вид *Fumaria officinalis* L. При поиске мутаций их положение определялось при выравнивании секвенированных нами образцов на соответствующую последовательность BK063235 *Corydalis intermedia* (L.) Mérat как принадлежащую к наиболее близкородственному виду из имеющихся в базе данных GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изученные популяции *Corydalis bracteata* s.l. произрастают в подтаежных смешанных сосново-березовых, березово-лиственничных лесах, черневых осинниках и пихтарниках (табл. 1).

Оценку межпопуляционной изменчивости признаков хохлаток производили по 11 морфометрическим признакам и 5 относительным параметрам (табл. 2). В результате изучения внутрипопуляционной изменчивости установлено, что большинство вегетативных признаков вида характеризуются высоким и очень высоким уровнями изменчивости согласно шкале С.А. Мамаева (Мамаев, 1972). Наименее

Таблица 2. Среднепопуляционные значения признаков *Corydalis bracteata* s.l.
Table 2. Average population values of *Corydalis bracteata* s.l.

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6
x1 – Длина цветоноса, см x1 – Peduncle length, cm	4.11 ± 0.96	3.57 ± 0.70	2.02 ± 0.39	5.69 ± 0.81	2.74 ± 0.37	1.70 ± 0.31
x2 – Длина стебля, см x2 – Stem length, cm	28.06 ± 1.32	27.07 ± 1.35	17.66 ± 1.05	19.89 ± 1.92	9.09 ± 0.40	12.23 ± 0.72
x3 – Количество цветков, ед. x3 – Number of flowers, pcs	4.57 ± 0.78	4.70 ± 0.72	4.59 ± 0.65	9.37 ± 1.52	9.74 ± 1.09	4.49 ± 0.60
x4 – Длина прикорневой чешуи, см x4 – Length of scale leaf, cm	1.53 ± 0.11	1.80 ± 0.17	1.69 ± 0.10	1.52 ± 0.13	1.65 ± 0.11	1.13 ± 0.09
x5 – Длина нижнего прицветника, мм x5 – Length of lowermost bract, mm	21.83 ± 1.74	22.04 ± 1.35	18.10 ± 1.30	18.69 ± 1.63	15.28 ± 0.77	11.09 ± 0.89
x6 – Ширина нижнего прицветника, мм x6 – Width of lowermost bract, mm	11.33 ± 0.87	12.35 ± 0.85	10.28 ± 1.06	12.23 ± 1.46	9.66 ± 0.72	6.86 ± 0.78
x7 – Количество зубчиков нижнего прицветника, ед. x7 – Number of lowermost bract teeth, pcs	5.50 ± 0.34	5.13 ± 0.19	6.21 ± 0.38	7.27 ± 0.91	5.66 ± 0.28	5.09 ± 0.32
x8 – Длина отгиба венчика нижнего цветка, см x8 – Length of corolla limb of lowermost flower, cm	1.92 ± 0.10	2.04 ± 0.07	1.70 ± 0.07	1.60 ± 0.08	1.23 ± 0.08	1.21 ± 0.07
x9 – Длина шпорца венчика нижнего цветка, см x9 – Length of spur of lowermost flower, cm	1.70 ± 0.06	1.71 ± 0.05	1.49 ± 0.08	1.51 ± 0.08	0.77 ± 0.08	1.19 ± 0.07
x10 – Длина клубенька, мм x10 – Tuber length, mm	5.39 ± 0.90	8.39 ± 1.55	–	–	–	–
x11 – Ширина клубенька, мм x11 – Tuber width, mm	4.25 ± 0.52	4.80 ± 0.64	–	–	–	–
x5/x6 – Отношение длины нижнего прицветника к его ширине x5/x6 – Length to width ratio in lowermost bract	1.98 ± 0.17	1.82 ± 0.15	1.82 ± 0.13	1.59 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.71 ± 0.16
x8/x9 – Отношение длины отгиба венчика нижнего цветка к длине шпорца x8/x9 – Limb length to spur length ratio in corolla of lowermost flower	1.13 ± 0.06	1.20 ± 0.04	1.15 ± 0.05	1.07 ± 0.05	1.75 ± 0.15	1.05 ± 0.08
x8+x9 – Длина цветка, см x8+x9 – Flower length, cm	3.62 ± 0.14	3.75 ± 0.10	3.18 ± 0.14	3.11 ± 0.14	2.00 ± 0.14	2.40 ± 0.10
x10*x11 – Размер клубенька x10*x11 – Tuber size	25.61 ± 6.80	43.91 ± 12.18	–	–	–	–

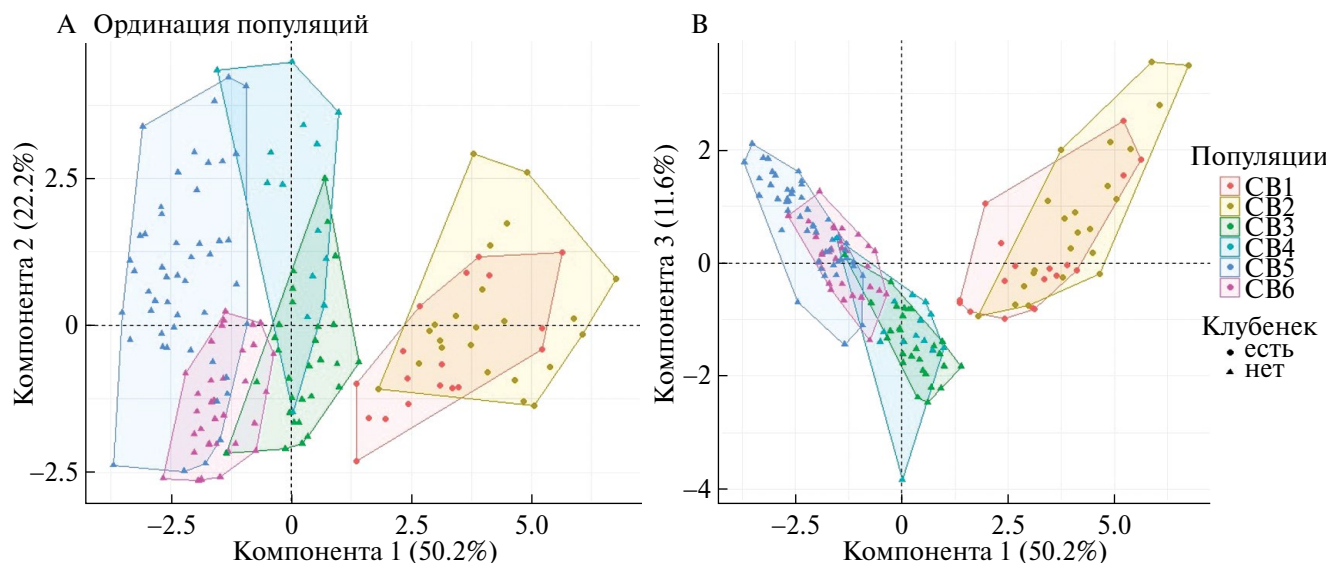


Рис. 2. Ординация популяций в плоскостях 1 и 2 компонент (А) и 1 и 3 компонент (В).

Fig. 2. Ordination of populations in the planes of the 1st and 2nd components (A), and 1st and 3rd components (B).

изменчивыми являются признаки цветка: x_8 (коэффициент вариации изменяется от 9 до 25%), x_9 ($C_v = 8-37\%$), x_8+x_9 ($C_v = 7-26\%$). Высокая степень изменчивости характерна для длины цветоноса x_1 ($C_v = 38-65\%$) и сопряженных с ним параметров x_1/x_2 ($C_v = 41-63\%$), ($38-48\%$).

Максимальные размеры осевых органов (x_1 , x_2) наблюдаются у особей красноярской популяции хохлатки СВ1, длина цветоноса и стебля которых варьирует от 1.5 до 9.2 см и от 22.9 до 39.3 см соответственно. Также высокие показатели длины стебля характерны для западно-сибирской СВ2 (21.2–34.6 см), а длинные цветоносы отмечены для хакасской популяции СВ4 (1–9.9 см). Генеративные органы наилучшим образом развиты у особей популяций из Кузнецкого Алатау СВ4 и СВ5, где число цветков составляет 6–21 и 3–17 соответственно. Минимальная длина шпорца характерна для кемеровской СВ5 и алтайской СВ6 популяций и составляет 4–15 мм. Самые крупные венчики наблюдаются у особей популяций СВ1 (2.6–4.1 см) и СВ2 (3.3–4.2 см). Миниатюрные прицветники характерны для СВ5 (длина 10–21 мм, ширина 6–17 мм) и СВ6 (длина 7–17 мм, ширина 3–16 мм).

Следует отметить, что все представители популяций СВ1 и СВ2 содержали дочерний (дополнительный) клубенок 3–17 мм длиной и 3–8 мм шириной в пазухе прикорневой чешуи,

тогда как у особей популяций СВ3–СВ6 он отсутствовал.

Для выявления достоверных различий между исследуемыми признаками проведен тест Тьюки. В табл. 3 указано количество достоверных различий при попарном сравнении популяций. Так, красноярская популяция СВ1 и западно-сибирская СВ2 демонстрируют максимальные отличия от хакасской СВ4 и кемеровской СВ5. Морфологическим сходством обладают популяции СВ1 и СВ2, а также западно-сибирская СВ3 и хакасская СВ4.

Ввиду слабой информативности, связанной с низким уровнем внутри- и межпопуляционной изменчивости, из дальнейшего анализа были удалены следующие признаки: x_4 , x_6 , x_5/x_6 , x_8/x_9 . В результате изучения сопряженной изменчивости морфометрических признаков хохлаток с использованием РСА-метода выявлено, что первые три компонента являются значимыми. Их собственные значения превышают 1, а суммарный вклад в общую дисперсию равен 84.07%. Первая главная компонента наиболее тесно связана сильной положительной связью с признаками осевых органов, размером цветка и клубенька в пазухе прикорневой чешуи (x_2 , x_5 , x_8 , x_9 , x_8+x_9 , x_{10} , x_{11} , $x_{10}*x_{11}$). Вторая компонента описывает признаки количества цветков и параметры цветоноса (x_1 , x_1/x_2 , x_3), третья представляет признаки количества зубчиков прицветника (x_7).

Таблица 3. Количество достоверных различий морфометрических признаков между популяциями (тест Тьюки)
Table 3. The number of significant differences in morphometric characteristics between populations (Tukey’s test)

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5
CB2	3				
CB3	9	10			
CB4	12	12	4		
CB5	13	12	8	9	
CB6	11	11	8	11	9

Ординация особей популяций в плоскостях первой и второй компонент обособляет популяции CB1 и CB2, имеющие длинные стебли и прицветники, крупные цветки, а главное – крупный вытянутый клубенок в пазухе прикорневого листа (рис. 2). Другие популяции не имеют клубенька и образуют вторую совокупность. Группа из 4 популяций также дифференцирована. Особи кемеровской (CB5) и алтайской (CB6) популяций, характеризующиеся короткими стеблями, мелкими цветками и прицветниками, несколько обособляются от популяций CB3 и CB4, занимающих промежуточное положение. Обращает на себя внимание распределение популяций относительно второй компоненты: CB3 и CB6 характеризуются короткими цветоносами, а CB4 и CB5 длинными цветоносами с большим количеством цветков. Также разделение наблюдается в плоскостях первой и третьей компонент: CB1, CB2, CB5, CB6 характеризуются малым, а CB3, CB4 – большим количеством зубчиков нижнего прицветника. Таким образом, мы видим четкое разделение популяций по морфологическим признакам на две группы. Первая представлена красноярской (CB1) и западносибирской (CB2) популяциями, которые характеризуются длинными стеблями, крупными прицветниками. Однако их главное отличие – крупный вытянутый клубенок в пазухе прикорневой чешуи. Аналогичные признаки характерны для недавно описанного вида *C. talpina* – хохлатки кротовой.

Вторая группа популяций объединяет многоцветковые растения, не имеющие клубенька в пазухе прикорневой чешуи: западносибирскую CB3, хакасскую CB4, кемеровскую CB5 и алтайскую CB6. В табл. 4 приводим наиболее

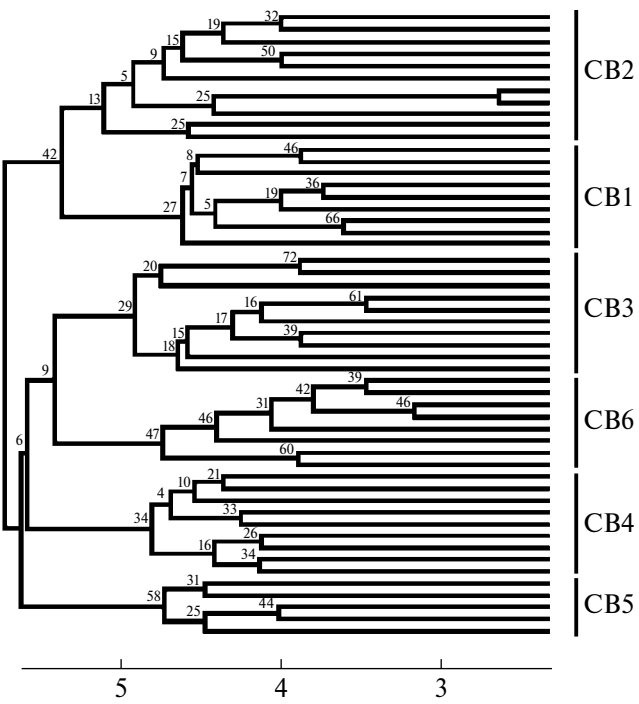


Рис. 3. Дендрограмма сходства образцов *Corydalis bracteata* s.l. на основе ISSR-PCR анализа.
Fig. 3. Dendrogram of similarity of *Corydalis bracteata* s.l. samples based on ISSR-PCR analysis.

информативные морфологические признаки, разделяющие наши популяции на две группы. Генетический полиморфизм 6 популяций изучен с помощью ISSR-PCR метода. В анализе использованы ISSR-праймеры, дающие воспроизводимый полиморфный результат: HB12, HB14, ISSR17, ISSR23 (Zietkiewicz et al., 1994). Выявлено 89 фрагментов ДНК, суммарный полиморфизм которых составляет 100% (табл. 5). Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьировало от 19 (HB12 и ISSR23) до 29 (ISSR17). Генное разнообразие Нея (H_e) в суммарной выборке

Таблица 4. Значимые диагностические признаки хохлаток из родства *Corydalis bracteata* s.l.

Table 4. Significant diagnostic features of *Corydalis* affined to *C. bracteata* s.l.

Популяция Population	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6
Местоположение Location	Красноярская лесостепь (Красноярский край) Krasnoyarsk forest-steppe (Krasnoyarsk Territory)	Западный Саян (Красноярский край) Western Sayan (Krasnoyarsk Territory)	Западный Саян (Красноярский край) Western Sayan (Krasnoyarsk Territory)	Кузнецкий Алатау (Республика Хакасия) Kuznetsk Alatau (Republic of Khakassia)	Кузнецкий Алатау (Кемеровская область) Kuznetsk Alatau (Kemerovo Region)	Алтай (Алтайский край) Altai (Altai Territory)
Вид Species	<i>C. talpina</i>		<i>C. bracteata</i>			
Стебель Stem	Длинные (21–39 см) Long (21–39 cm)		Средней длины (10–29 см) Medium length (10–29 cm)		Короткие (6–16 см) Short (6–16 cm)	
Количество цветков Number of flowers	2–9			2–16 Длинные цветоносы относительно стеблей 2–16 Long peduncles relative to stems		2–9
Количество зубчиков прицветника Number of bract teeth	4–6		5–10		3–6	
Длина прицветника, мм Bract length, mm	15–28		12–26		7–20	
Клубенек Tuber	Вытянутый 2–9 мм дл. 3–6 мм шир. Elongated 2–9 mm long 3–6 mm wide	Вытянутый Длина 2–17 мм Ширина 2–7 мм Elongated Length 2–17 mm Width 2–7 mm	Нет None	Нет None	Нет None	Нет None
Длина шпорца, мм Spur length, mm	15–20		11–19		4–15	

составило 0.3331, индекс Шеннона (I_o) – 0.4991. Уровень выявляемого внутрипопуляционного генетического разнообразия средний (47.19–65.17%). Показатели генетического полиморфизма максимальны для западносаянских популяций CB2 ($P = 65.17\%$; $H_e = 0.2337$; $I_o = 0.3495$) и CB3 ($P = 61.80\%$; $H_e = 0.2187$; $I_o = 0.3289$). Минимальные значения отмечены

для кемеровской CB5 ($P = 47.19\%$; $H_e = 0.1888$; $I_o = 0.2769$) и алтайской CB6 ($P = 53.93\%$; $H_e = 0.1854$; $I_o = 0.2808$) популяций. Коэффициент подразделенности популяций (G_{st}) составляет 0.3758. Таким образом, на долю межпопуляционного разнообразия приходится 37%, а изученные популяции демонстрируют очень высокую степень дифференциации согласно

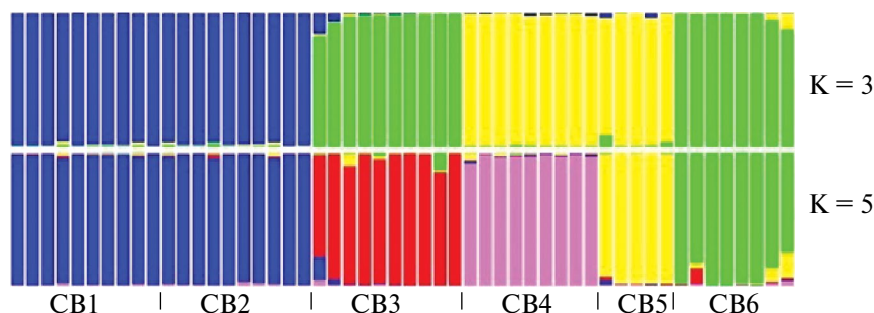


Рис. 4. Апостериорная вероятность отнесения образцов *Corydalis bracteata* s.l. к генетическим кластерам на основе анализа ISSR-PCR.

Fig. 4. Posterior probability of assigning *Corydalis bracteata* s.l. samples to genetic clusters based on ISSR-PCR analysis.

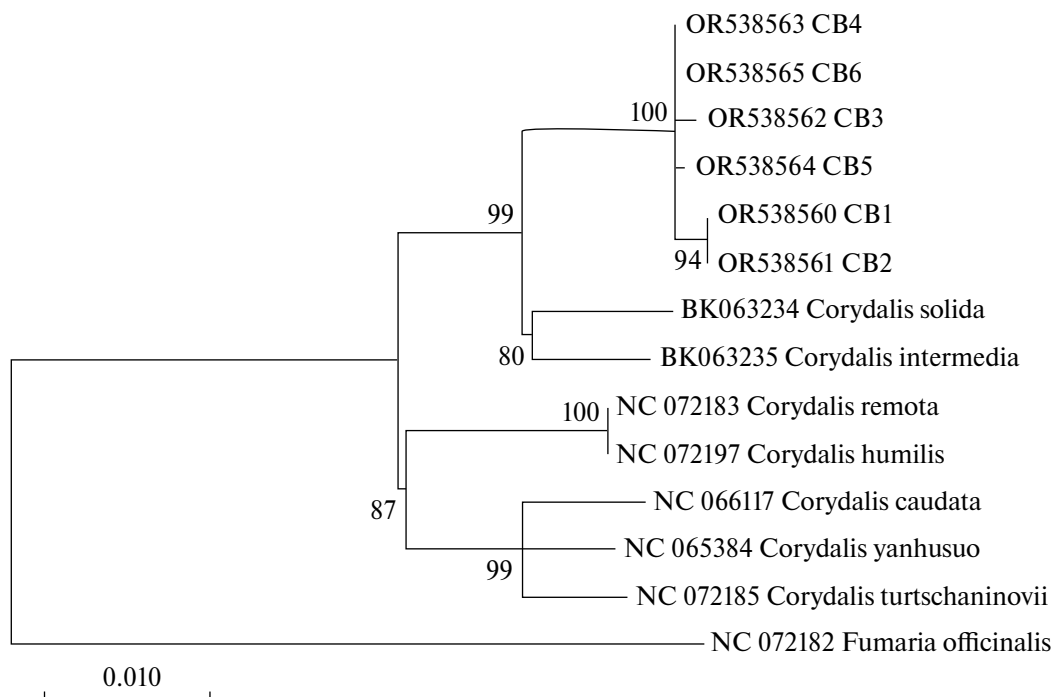


Рис. 5. Филогенетическое древо видов секции *Corydalis*, построенное на последовательностях гена *matK* и межгенного спейсера *rpoB-trnC* хлоропластной ДНК методом максимального правдоподобия (ML). Цифрами обозначены значения бутстрэпа. Длина ветвей пропорциональна количеству замен.

Fig. 5. Phylogenetic tree of the species of the *Corydalis* section, built based on sequences of the *matK* gene and the intergenic spacer *rpoB-trnC* of chloroplast DNA by the maximum likelihood (ML) method. The numbers indicate bootstrap values. The length of the branches is proportional to the number of substitutions.

классификации С. Райта (Wright, 1978), что может указывать на присутствие в исследуемой выборке представителей разных видов.

Наибольшее значение генетических дистанций Нея (Nei, 1972) (D) наблюдается между популяциями СВ2 и СВ5 и составляет 0.2799 (табл. 6). Минимальные генетические различия отмечены между популяциями СВ1 и СВ2 ($D = 0.1428$). Генетическую обособленность от других демонстрирует кемеровская популяция

СВ5 ($D = 0.2098$ – 0.2799). Следует отметить, что алтайская популяция СВ6 обнаруживает генетическое сходство с западносибирской СВ3 ($D = 0.1743$).

Дендрограмма сходства особей популяций, построенная на основе данных ISSR-PCR анализа, представлена на рис. 3. Особи разных популяций формируют обособленные группы. Генетическое сходство демонстрируют

Таблица 5. Полиморфизм межмикросателлитных фрагментов ДНК, амплифицированных ISSR-PCR методом
Table 5. Polymorphism of intermicrosatellite DNA fragments amplified by ISSR-PCR method

ISSR-праймер	Последовательность Sequence (5' → 3')	Общее число фрагментов Total number of fragments		Число полиморфных фрагментов ДНК (%) Number of polymorphic DNA fragments (%)					
		Всего Total	Полиморфных Polymorphic	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6
HB12	(CAC) ₃ GC	19	19	11 (57%)	13 (68%)	13 (68%)	11 (57%)	8 (42%)	11 (57%)
HB14	(CTC) ₃ GC	22	22	13 (59%)	13 (59%)	11 (50%)	11 (50%)	8 (36%)	7 (31%)
ISSR23	(AC) ₈ TA	19	19	6 (32%)	11 (58%)	14 (74%)	11 (58%)	12 (63%)	13 (68%)
ISSR17	(GACA) ₄	29	29	19 (66%)	21 (72%)	17 (59%)	20 (69%)	14 (48%)	17 (59%)
Всего Total		89	89	49 (55%)	58 (65%)	55 (62%)	53 (60%)	42 (47%)	48 (54%)

Таблица 6. Генетические дистанции М. Нея (1972) на основе ISSR-PCR
Table 6. Nei's genetic identity (1972) based on ISSR-PCR

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5
CB2	0.1428				
CB3	0.2072	0.1944			
CB4	0.2068	0.1879	0.1612		
CB5	0.2243	0.2799	0.2314	0.2098	
CB6	0.241	0.2696	0.1743	0.2431	0.2048

популяции CB1 и CB2, имеющие дополнительный клубенок.

Анализ структуры распределения генотипов особей в программе STRUCTURE показывает, что исследуемые образцы максимально можно разделить на пять генетических кластеров (рис. 4). Основываясь на диаграмме вероятностей отнесения каждого образца к пяти кластерам, можно достоверно объединить популяции CB1 и CB2. Образование этой устойчивой группы свидетельствует о давнем относительно других популяций генетическом обособлении. Оставшиеся образцы дифференцируются в соответствии с принадлежностью к популяциям при K = 5.

Для филогенетического анализа нами было отобрано по одному образцу из исследуемых популяций. При анализе последовательностей на участке гена *matK*, длиной 761 п.н.

обнаружена трансверсия в положении 532 – характерный для всех последовательностей хохлаток аденин заменился на цитозин у образцов, выделяемых нами в вид *C. talpina* (CB1 и CB2). Эта миссенс-мутация приводит к замене аминокислоты треонина на пролин в полипептиде матуразы К. У западносибирского образца из CB3 обнаружены другие замены: трансверсия С на А в положении 551, приводящая к замене серина на тирозин и транзиция G на А в положении 813 (синонимичная мутация).

В межгенной области *rpoB-trnC* длиной 732 п.н. у особей популяций CB1 и CB2 найдена двойная замена АС на ТА (положения 643–644), а кемеровский образец CB5 отличается от представителей других популяций однонуклеотидной заменой цитозина на тимин в положении 63.

При построении филогенетических деревьев на основе анализа последовательностей ДНК

гена *matK* и спейсера *rpoB-trnC* выявлена сходная топология. На рис. 5 приведено консенсусное дерево, построенное на основе анализа этих двух участков хлоропластной ДНК. Представители сибирских популяций *C. bracteata* с высокой степенью вероятности формируют отдельную кладу, занимающую терминальное положение. Причем особи из популяций СВ1 и СВ2 наиболее обособлены. Сестринскую с ними кладу образуют европейские виды *Corydalis intermedia* и *Corydalis solida* (L.) Clairv., имеющие фиолетово-розовые цветки. Отдельные кладу образуют азиатские (дальневосточные, китайские, корейские) виды хохлаток, отличающиеся друг от друга цветом и размерами венчика, формой плодов и строением нектарника. Согласно классификации М. Лидена, все приведенные виды хохлаток относятся к секции *Corydalis* (Liden, Zetterlund, 1997).

Следует отметить, что последовательно-сти видов, формирующих обособленные кладу, имеют от 0 до 16 вариабельных сайтов для участка *matK* и от 0 до 13 — для *rpoB-trnC*. Таким образом, между отдельными и хорошо различающимися видами, такими как *Corydalis remota* Fisch. и *Corydalis humilis* B.U. Oh et Y.S. Kim, могут отсутствовать различия в изучаемых последовательностях ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе морфологического анализа *Corydalis bracteata* s.l. на территории Южной Сибири было выявлено разделение изученных популяций на две группы. Особи красноярской (СВ1) и западносибирской (СВ2) популяций характеризуются длинными стеблями, крупными прицветниками и цветками. Однако основным отличием, сближающим представителей данных популяций с недавно описанным видом *C. talpina* (хохлаткой кротовой), является наличие крупного вытянутого клубенька в пазухе прикорневого листа. Подобное явление наблюдается и у других видов рода. Так, Т.А. Безделева (Bezdeleva, 2010) приводит две жизненные формы для вида *C. remota*: клубневой геофит без клубенька в пазухе прикорневого листа с коротким столоном и столонно-клубневой геофит с длинным ортотропным столоном и образующимся дочерним клубнем.

Однако результаты, полученные в ходе молекулярно-генетических исследований, также показывают различие красноярской и западносибирской популяций от остальной совокупности. В частности, при проведении ISSR-PCR анализа выявлено наличие в общей выборке особей, которые должны быть отнесены к разным видам, о чем свидетельствуют высокие значения коэффициента подразделенности популяций ($G_{st} = 0.3758$). Анализ последовательностей ДНК также обнаружил отличие в виде трех нуклеотидных замен у особей красноярской (СВ1) и западносибирской (СВ2) популяций не только по сравнению с представителями изучаемых популяций, но и с другими клубневыми хохлатками, последовательности ДНК которых размещены в базе данных GenBank. Таким образом, проведенный морфологический и генетический анализы указывают на генетическую обособленность хохлаток из популяций СВ1 и СВ2, которые, как мы полагаем, следует относить к виду *C. talpina*. Полученные нами в ходе филогенетического анализа дендрограммы не противоречат работам по филогении семейства Fumariaceae.

Следует отметить, что секвенирование участков хлоропластной ДНК (ген *matK*, спейсер *rpoB-trnC*) *C. bracteata* было проведено нами впервые. Наряду с данными последовательностями для филогении рода *Corydalis* другими авторами используются гены *rbcL*, *trnG* и межгенные спейсеры: *trnL-trnF*, *psbA-trnH* (Ren et al., 2019; Peng et al., 2023). Несмотря на то что участок ITS во многих исследованиях является эталонным маркером и зачастую используется для уточнения классификации семенных растений, для рода *Corydalis* он формирует противоречивую филогению ввиду своей мультикопийности (Jiang et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе морфологического анализа 6 популяций *Corydalis bracteata* s.l. выявлена высокая внутривидовая изменчивость признаков длины цветоноса и количества цветков, а также низкая изменчивость генеративных признаков. Диагностическими признаками, позволяющими разделить хохлатки на группы, являются: количество цветков, количество зубчиков прицветника и его размеры, длина шпорца

цветка, наличие клубенька в пазухе прикорневого листа.

В ходе ISSR-PCR анализа популяций хохлаток было показано высокое значение коэффициента подразделенности популяций ($G_{st} = 0.3758$). Уровень внутривидового генетического разнообразия — средний (47.19–65.17%). Показатели генетического полиморфизма максимальны для западносибирских популяций, минимальные значения отмечены для кемеровской и алтайской популяций.

Наибольшие значения генетических дистанций Нея (1972) наблюдаются между популяциями СВ2 и СВ5, СВ2 и СВ6 и составляют $D = 0.2799$ и $D = 0.2696$ соответственно. Эти результаты согласуются с морфологическим анализом популяций. Наибольшие морфологические различия также выявлены между этими парами популяций. Минимальные генетические и морфологические различия отмечены между красноярской СВ1 и западносибирской СВ2 популяциями ($D = 0.1428$), особи которых образуют дочерний клубенек.

В ходе анализа последовательностей хлоропластного гена матуразы К (*matK*) и межгенного спейсера *rpoB-trnC* обнаружены 3 нуклеотидные замены, отличающие особей из СВ1 и СВ2 от других популяций *C. bracteata*, причем одна из них приводит к замене аминокислоты. Перечисленные мутации отсутствуют как в последовательностях других видов, так и у особей близкородственных популяций. Также обнаружены две мутации в последовательности гена матуразы К у западносибирского образца СВ3 (синонимичная и миссенс-мутация), а кемеровский образец СВ5 отличается однонуклеотидной заменой в последовательности межгенного спейсера.

Филогенетические деревья, построенные на основе анализа участков *matK* и *rpoB-trnC*, обладают сходной топологией, а представители изучаемых нами популяций формируют хорошо обособленную кладу.

Таким образом, согласованные результаты морфологического и генетического анализов свидетельствуют о дифференциации популяций желтоцветковых хохлаток из Южной Сибири, изначально относимых к виду *Corydalis bracteata*

и указывают на морфологическую и генетическую обособленность *Corydalis talpina*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Bezdeleva] Безделева Т.А. 2010. Структурное разнообразие травянистых растений флоры Дальнего Востока России. — Бюл. БСИ ДВО РАН. 5: 4–20.
- Chambers J.M., Freeny A.E., Heiberger R.M. 1992. Statistical Models in S. Wadsworth & Brooks Cole, Pacific Grove, California. 624 p.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. — Nucleic Acids Res. 32 (5): 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- [Flora ...] Флора Сибири. 1994. Новосибирск. Т. 7. С. 32–42.
- GENBANK DataBase. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (Accessed 01.10.2023).
- Jiang L., Li M., Zhao F., Chu S., Zha L., Xu T., Peng H., Zhang W. 2018. Molecular Identification and Taxonomic Implication of Herbal Species in Genus *Corydalis* (Papaveraceae). — Molecules. 23 (6): 1393. <https://doi.org/10.3390/molecules23061393>
- Kaiser H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. — Educational and Psychological Measurement. 20 (1): 141–151. <https://doi.org/10.1177/001316446002000116>
- Kassambara F., Mundt F. 2020. Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.
- Kim K.-J. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. — Bot. J. Linn. Soc. 164: 1–9. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Ledebour C.F. 1842. *Corydalis gracilis* Ledeb. — In: Flora Rossica. Vol. 1. Stuttgartiae. P. 97–106.
- Liden M., Zetterlund H. 1997. *Corydalis* a gardener's guide and a monograph of the tuberous species. — A G S Publications Limited. 140 p.
- [Malyshev] Малышев Л.И. 2012. Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения. Новосибирск. 640 с.
- [Мамаев] Мамаев С.А. 1972. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М. 284 с.
- Mansour A., Ismail H.M., Ramadan M.F., Gyulai G. 2009. Variations in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars grown under heat stress. — Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 4: 118–127. <https://doi.org/10.1007/s00003-009-0474-5>

- 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.
https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00551.x
- [Mikhailova] Михайлова М.А. 2015. Основные направления эволюции в роде *Corydalis* (Fumariaceae). — Бот. журн. 100 (1): 3–14.
https://doi.org/10.1134/S0006813615010019
- Miller R.G. 1981. Simultaneous Statistical Inference. — Springer Series in Statistics. 311 p.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. — Am. Nat. 106: 283–292.
- Paterson I.D., Downie D.A., Hill M.P. 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. — Biol. Control. 48 (1): 84–91. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.09.012
- Peng H.W., Xiang K.L., Erst A.S., Erst T.V., Jabbour F., Ortiz R.D.C., Wang W. 2023. The synergy of abiotic and biotic factors correlated with diversification of *Fumarioideae* (Papaveraceae) in the Cenozoic. — Mol. Phylogenet. Evol. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107868
- [Peshkova] Пешкова Г.А. 1984. Растительность Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск. 145 с.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. — Genetics. 155: 945–959.
https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945
- R Core Team. 2013. Stats: The R stats package. R package version 3.6. 2.
- Ren F.M., Wang Y.W., Xu Z.C., Li Y., Xin T.Y., Zhou J.G., Qi Y.D., Wei X.P., Yao H., Song J.Y. 2019. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. — Ecol. Evol. 9 (4): 1934–1945. https://doi.org/10.1002/ece3.4886
- Shapiro S.S., Wilk M.B., Chen H.J. 1968. A comparative study of various tests of normality. — Journal of the American Statistical Association. 63: 1343–1372.
- [Shmidt] Шмидт В.М. 1984. Математические методы в ботанике. Л. 288 с.
- [Stepanov] Степанов Н.В. 2015. Новые данные о желтоцветковых хохлатках (*Corydalis* DC. — Fumariaceae) секции *Corydalis* Красноярского края. — Вестник КрасГАУ. 6: 175–182.
- [Stepanov] Степанов Н.В. 2016. Сосудистые растения Приенисейских Саян. Красноярск. 252 с.
- Suzuki R., Shimodaira H. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics. 22: 1540–1542.
- WFO (2023): World Flora Online. Published on the Internet. http://www.worldfloraonline.org/ (Accessed: 01.03.2023).
- Wright S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations. — University of Chicago Press. 590 p.
- Xu X., Li X., Wang D. 2022. New Insights Into the Backbone Phylogeny and Character Evolution of *Corydalis* (Papaveraceae) Based on Plastome Data. — Front Plant Sci. 13: 926574.
https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926574
- Yandell B.S. 1997. Practical data analysis for designed experiments. — Madras: Chapman and Hall. 312 p.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. 1999. Popgene, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. — Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. P. 1–29.
- Zhang M.L., Su Z.Y., Lidén M. 2008. *Corydalis* DC. — Flora of China. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 7: 295–428.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. — Genomics. 20: 76–183.

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND GENETIC ANALYSIS OF *CORYDALIS BRACTEATA* SENSU LATO (PAPAVERACEAE) POPULATIONS FROM SOUTHERN SIBERIA

K. K. Ryabova^{a,b,#}, I. E. Yamskikh^{a,##}, N. V. Stepanov^{a,###}, M. G. Kutsev^{a,c,####}

^aSiberian Federal University

Svobodnyy Ave., 79, Krasnoyarsk, 660049, Russia

^bFederal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of RAS"

Akademgorodok Str., 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

^cAltai State University

Lenin Ave., 61, Barnaul, 656049, Russia

[#]e-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru

^{##}e-mail: iyamskikh@mail.ru

^{##}e-mail: stepanov-nik@mail.ru

^{####}e-mail: m_kucev@mail.ru

This article presents the results of the first study of the morphological and genetic diversity of 6 populations of *Corydalis bracteata* Pers. s. l., growing in plant communities of the Krasnoyarsk forest-steppe, Western Sayan, Kuznetsk Alatau, Altai. The morphological analysis shows the division of the populations into two groups. A large elongated tuber near basal scales, large bracts and flowers, a large height of the plants unites the from the Krasnoyarsk and Western Sayan populations with a recently described species *C. talpina* Stepanov. These results are also confirmed by the ISSR-PCR analysis of the genetic variability of *Corydalis* populations. A high subdivision coefficient ($G_{st} = 37.58\%$) indicates the presence of different species in the total sample. The division into two groups is also demonstrated when clustering the genotypes using the Bayesian approach implemented in the STRUCTURE 2.3.4 software. Phylogenetic analysis based on comparison of the nucleotide polymorphism of the *matK* chloroplast gene sequences and the *rpoB-trnC* intergenic spacer also has revealed differences in three nucleotides in the plant with an additional tuber. These substitutions are absent in the sequenced plants without nodules and in sequences of other species with tufts of tubers published in GenBank. Similar results of morphological and genetic analyzes prove the differentiation of populations of yellow-flowered *Corydalis* in South Siberia, originally assigned to the species *C. bracteata*, and indicate the morphological and genetic isolation of *C. talpina*.

Keywords: morphological diversity, genetic diversity, *Corydalis bracteata* Pers., *Corydalis talpina* Stepanov, ISSR-PCR markers, phylogenetic analysis, Papaveraceae, Fumarioidae

REFERENCES

- Bezdeleva T.A. 2010. Strukturalnoye raznoobrazie travyanistykh rasteniy flory Dal'nego Vostoka Rossii [Structural diversity of herbar plants flora Far East of Russia]. – Byul. BSI DVO RAN. 5: 4–20 (In Russ.).
- Chambers J.M., Freney A.E., Heiberger R.M. 1992. Statistical Models in S. Wadsworth & Brooks Cole, Pacific Grove, California. 624 p.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. – Nucleic Acids Res. 32 (5): 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Flora Sibiri [Flora of Siberia]. 1994. Novosibirsk. Vol. 7. P. 32–42 (In Russ.).
- GENBANK DataBase.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (Accessed 01.10.2023).
- Jiang L., Li M., Zhao F., Chu S., Zha L., Xu T., Peng H., Zhang W. 2018. Molecular Identification and Taxonomic Implication of Herbal Species in Genus *Corydalis* (Papaveraceae). – Molecules. 23 (6): 1393.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061393>
- Kaiser H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. – Educational and Psychological Measurement. 20 (1): 141–151.
<https://doi.org/10.1177/001316446002000116>
- Kassambara F., Mundt F. 2020. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.

- Kim K.-J. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. — Bot. J. Linn. Soc. 164: 1–9. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Ledebour C.F. 1842. *Corydalis gracilis* Ledeb. — In: Flora Rossica. Vol. 1. Stuttgartiae. P. 97–106.
- Liden M., Zetterlund H. 1997. *Corydalis* a gardener's guide and a monograph of the tuberous species. — A G S Publications Limited. 140 p.
- Malyshev L.I. 2012. Conspectus florae Rossiae Asiaticae: Plantae vasculares. Novosibirsk. 640 p. (In Russ.).
- Mamaev S.A. 1972. Formy vnutrividovoy izmenchivosti drevesnykh rasteniy. [Forms of intraspecific variation in woody plants]. Moscow. 284 p. (In Russ.).
- Mansour A., Ismail H.M., Ramadan M.F., Gyulai G. 2009. Variations in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars grown under heat stress. — Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 4: 118–127. <https://doi.org/10.1007/s00003-009-0474-5>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00551.x>
- Mikhailova M.A. 2015. The main evolution trends in the genus *Corydalis* (Fumariaceae). — Bot. Zhurn. 100 (1): 3–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0006813615010019>
- Miller R.G. 1981. Simultaneous Statistical Inference. — Springer Series in Statistics. 311 p.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. — American Naturalist. 106: 283–292.
- Paterson I.D., Downie D.A., Hill M.P. 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. — Biol. Control. 48 (1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.09.012>
- Peng H.W., Xiang K.L., Erst A.S., Erst T.V., Jabbour F., Ortiz R.D.C., Wang W. 2023. The synergy of abiotic and biotic factors correlated with diversification of Fumarioideae (Papaveraceae) in the Cenozoic. — Mol. Phylogenet. Evol. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107868>
- Peshkova G.A. 1984. Rastitel'nost' Sibiri [Vegetation of Siberia]. Novosibirsk. 145 p. (In Russ.).
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. — Genetics. 155: 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- R Core Team. 2013. Stats: The R stats package. R package version 3.6.2.
- Ren F.M., Wang Y.W., Xu Z.C., Li Y., Xin T.Y., Zhou J.G., Qi Y.D., Wei X.P., Yao H., Song J.Y. 2019. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. — Ecol. Evol. 9 (4): 1934–1945. <https://doi.org/10.1002/ece3.4886>
- Shapiro S.S., Wilk M.B., Chen H.J. 1968. A comparative study of various tests of normality. — Journal of the American Statistical Association. 63: 1343–1372.
- Shmidt V.M. 1984. Matematicheskie metody v botanike [Mathematical methods in botany]. Leningrad. 288 p. (In Russ.).
- Stepanov N.V. 2015. New data about yellow-flowered *Corydalis* (Fumariaceae) of section *Corydalis* in Krasnoyarsk region. — Vestnik KrasGAU. 6: 175–182.
- Stepanov N.V. 2016. Sosudistye rasteniya Priyeniseiskikh Sayan [Vascular plants of the Yenisei Sayans]. Krasnoyarsk. 252 p. (In Russ.).
- Suzuki, R., Shimodaira, H. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics 22: 1540–1542.
- WFO (2023): World Flora Online. Published on the Internet. <http://www.worldfloraonline.org/> (Accessed 01.03.2023).
- Wright S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations. — University of Chicago Press. 590 p.
- Xu X., Li X., Wang D. 2022. New Insights Into the Backbone Phylogeny and Character Evolution of *Corydalis* (Papaveraceae) Based on Plastome Data. — Front Plant Sci. 13: 926574. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926574>
- Yandell B.S. 1997. Practical data analysis for designed experiments. — Madras: Chapman and Hall. 312 p.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. 1999. Popgene, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. — Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. P. 1–29.
- Zhang M.L., Su Z.Y., Lidén M. 2008. *Corydalis* DC. — Flora of China. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 7: 295–428.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. — Genomics. 20: 76–183.