



© Н. Н. Рыжова<sup>1</sup>,  
М. О. Бурляева<sup>2</sup>,  
Е. А. Кочиева<sup>1</sup>,  
М. А. Вишнякова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Центр «Биоинженерия»  
РАН РФ, Москва;

<sup>2</sup> Государственный научный  
центр РФ Всероссийский  
научно-исследовательский  
институт растениеводства  
им. Н. И. Вавилова РАСХН,  
Санкт-Петербург

✿ Проведен анализ нуклеотидного полиморфизма ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей представителей трибы *Vicieae* из коллекции ВИР. Выявлены нуклеотидные замены и индели различной длины в ITS1-5.8S-ITS2 районе, характеризующие как отдельные виды, так и группы видов *Lathyrus* и *Vicia*. Получен целый ряд данных, подтверждающий видовой/родовой статус образцов, имеющих спорное таксономическое положение.

✿ **Ключевые слова:** триба *Vicieae*, таксономия, нуклеотидный полиморфизм, ITS-последовательности

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ITS-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ *VICIEAE* (ADANS.) BRONN СЕМ. *FABACEAE* LINDL.

### ВВЕДЕНИЕ

Триба виковых — *Vicieae* сем. *Fabaceae* объединяет ряд экономически важных родов, представители которых используются как зерновые, кормовые, овощные, декоративные, технические, лекарственные и сидерационные культуры. По оценкам большинства современных авторов триба включает 5 родов — *Lathyrus* L. (чина), *Vicia* L. (вика), *Pisum* L. (горох), *Lens* Mill. (чечевица), *Vavilovia* An. Fed. (вавилония), объединяющих 300–400 видов [7, 26, 27, 13].

Представители трибы распространены в Евразии, северной Африке, Северной и Южной Америке, немногие виды найдены во флоре тропической восточной Африки [3, 24]. Центрами наибольшего разнообразия виковых считаются Средиземноморье и Ирано-Туранская флористическая провинция. Однако до настоящего времени вопрос о месте зарождения трибы остается нерешенным. Существует несколько гипотез о ди- или полифилетическом, либо парафилитическом происхождении виковых.

С точки зрения морфобиологических дескрипторов триба *Vicieae* считается одной из наиболее сложных. Выделяемые в настоящее время роды трибы характеризуются генетической однородностью и существованием слабо дифференцированных видов [14, 21, 27, 32]. Морфологическая гомоплазия *Vicieae*, параллелизм, прогрессивная эволюция и редукция признаков сильно затрудняют классификацию и служат причиной множества мнений о числе реальных родов в трибе и их видовом составе.

Существует несколько точек зрения как на структуру трибы, так и на систему родов *Vicia* и *Lathyrus*, их объем и внутривидовую классификацию [26, 27, 3]. Согласно одной из последних классификаций [27] выделяются 13 секций *Lathyrus*: *Orobus* (L.) Gren. et Godr., *Lathyrystylis* (Griseb.) Bässler, *Pratensis* Bässler, *Neurolobus* Bässler, *Orobon* Tamamsch, *Orobastrum* Boiss., *Viciopsis* Kupicha, *Linearicarpus* Kupicha, *Lathyrus* L., *Aphaca* (Miller) Dumort, *Nissolia* (Miller) Dumort, *Clymenum* (Adans.) DC., *Notolathyrus* Kupicha.

Однако целый ряд исследователей некоторым секциям рода *Lathyrus* присваивают ранг самостоятельных родов — *Orobus* L., *Ochrus* L. [17], *Nissolia*, *Aphaca* [8], *Clymenum* Mill. [6, 3]. Не менее проблематична ситуация и с родом *Vicia*. Так, выделяемые Ф. К. Купича (1983) виды *V. narbonensis* L., *V. faba* L., *V. hirsuta* (L.) Gray., *V. ervilia* (L.) Willd., согласно классификации А. К. Станкевич (1999) наравне с *Lens* приобретают статус отдельных родовых категорий *Bona* Medik., *Faba* Mill., *Ervum* L., и *Ervilia* (L.) Link. Усложняют классификацию видов в трибе *Vicieae*, выделяемые еще со времен Линнея, так называемые, виковые оробиды: *O. lathyroides* L. (= *V. unijuga* A. Br.), *O. venosus* Willd., *V. oroboides*

Wulfen, *V. dumetorum* L., *L. atropatanus* (Grossh.) Sirj., *V. pseudoorobus* Fisch. (= *V. nipponica* Matsum. = *O. fischerianus* Stankev.), сочетающие в себе признаки *Vicia* и *Lathyrus*.

В настоящее время для оценки межвидовой и внутривидовой вариабельности у представителей многих родов растений наиболее часто используется область спейсера ITS1-5.8S-ITS2 рибосомного оперона. Последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров генов рРНК считаются весьма эффективными для установления таксономической структуры многих семейств и родов, уточнения филогенетических связей и идентификации образцов, в особенности на видовом уровне [12]. Последовательность спейсера ITS1-5.8S-ITS2 использовалась в таксономических и филогенетических исследованиях и у бобовых, как, например, у *Lupinus* L. [9], *Lotus* L. [11], *Lens* [28], комплекса *Phaseolus-Vigna* [20].

Для исследования таксономических вопросов, связанных с трибой *Viciae*, с использованием последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1, ITS2) генов рибосомной РНК, в данную работу были отобраны образцы *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum* и *Vicia* генобанка ГНУ ГНЦ РФ ВИР. Ключевыми задачами исследования стали: 1) анализ нуклеотидной вариабельности ITS1-5.8S-ITS2-последовательности у представителей трибы *Viciae*; 2) оценка возможности молекулярного обоснования состава трибы и секционного деления *Lathyrus* и *Vicia*; 3) молекулярная характеристика коллекции *Lathyrus* генобанка ГНУ ГНЦ РФ ВИР и определение таксономического статуса спорных образцов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работу были отобраны 35 образцов, представляющих 29 основных видов трибы *Viciae* из коллекции чины ГНУ ГНЦ РФ ВИР.

Выделение растительной ДНК производили на основании протокола, предложенного К. Edwards с сотрудниками (1991). Количество выделенной ДНК определяли на спектрофотометре ВЕСКМАН К-100. В дальнейший PCR анализ бралась ДНК с OD 260/280 > 1,5.

Для полимеразной цепной реакции использовали наборы реактивов производства «Диалат ЛТД». Область ITS1-5.8S-ITS2 амплифицировалась с использованием праймеров ITS5 (5'-TCGTAACAAGGTTCCCGTAGGTG-3'), комплиментарного 3'-концу гена 18S и ITS4 (5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3'), комплиментарного 5'-концу гена 26S рРНК, предложенные Т. J. White и др. (1990).

Амплификацию фрагмента проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 1х буфер из соответствующего набора, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>,

160 мкМ каждого dNTP; 0,3 мкМ каждого праймера; 0,3 единиц Taq полимеразы и 100 нг геномной ДНК в термодиске GeneAmp PCR System2700 (Applied Biosystems, США) в режиме: денатурация — 30 с. при 94 °С; отжиг праймера — 45 с. при 59 °С; синтез ДНК — 1 мин при 72 °С с числом циклов — 36 и предварительной денатурацией — 5 мин (94 °С). Заключительную элонгацию PCR-фрагментов проводили 10 мин при 72 °С.

Продукты реакции амплификации разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле в 1х TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотодокументировали. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали 1kb DNA ladder ("Gibco BRL").

Нуклеотидные последовательности ITS1-5.8S-ITS2-области были получены с помощью системы Big-dye (Applied Biosystems), с использованием как ITS4, так и ITS5 праймеров на ABI 310 capillary DNA Analyzer. Выравнивание последовательностей, анализ и реконструкция филогении проводилась с помощью программы MEGA 3.0 [25]. Расчет матриц расстояний строился на использовании двухпараметрической модели Кимуры. Инсерции-делеции рассматривались как потенциально филогенетически-информативные сайты и включались в анализ. Бутстреп тест филогении проводился с использованием алгоритма ближайшего соседа NJ [30] при числе реплик равном 1000. Для сравнительного анализа и получения корректной филогенетической информации в кладистический анализ были включены уже известные последовательности ITS района представителей отдельных видов трибы, полученные Кенайсер с сотрудниками [24]. В качестве внешней группы использовались последовательности *Cicer arietinum* L., *Trifolium hybridum* L. из базы данных NCBI.

Чтобы избежать возможных технических ошибок, возникающих при секвенировании околопраймерных областей последовательности концевых участков ITS фрагментов (~ 40 нуклеотидов 5'-конца и ~ 20 нуклеотидов 3'-конца полноразмерной области ITS1-5.8S-ITS2) были исключены из анализа.

Дополнительно для сравнительного анализа полученных сиквенсов использовались последовательности из базы данных NCBI, принадлежащих различным видам исследуемой трибы (табл.1) и близкой к ней трибы *Trifolieae* (Bronn) Benth. (*Trifolium hybridum* L.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ нуклеотидных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2-области представителей трибы *Viciae*

В работу были отобраны 35 образцов 29 видов трибы *Viciae* коллекции ГНУ ГНЦ РФ ВИР, относящихся к 4 родам *Lathyrus* L., *Pisum* L., *Vicia* L., *Lens* Mill. (табл. 1).

ITS1-5.8S-ITS2-области взятых в анализ представителей *Viciaeae* были амплифицированы с использованием праймеров ITS4 и ITS5, гомологичных последовательностям генов 18S и 26S рРНК. В результате амплификации для каждого образца были получены фрагменты длиной около 700 п. н., включавшие полно-размерный регион ITS1-5.8S-ITS2. С использованием тех же праймерных последовательностей эти фрагменты были секвенированы впрямую как с 3'-, так и

5'- концов. Полученные сиквенсы были выровнены и проанализированы с помощью программы MEGA 3.

Протяженность выровненных и используемых для анализа последовательностей ITS- района представитель трибы *Viciaeae* составила 568 п. н. При этом длины этого фрагмента, исключая индели, варьировали от вида к виду от 520 до 556 пн. В целом при практически равной длине проанализированных участков спейсерных последовательностей, ITS1 характеризовался почти в 2 раза

Таблица 1

Образцы видов трибы *Viciaeae* (Adans.) Вропп, взятые для анализа ITS-последовательностей ядерной ДНК и их таксономический статус в соответствии с классификациями А. К. Станкевич (1999) и Ф. К. Куріча (1976, 1983)

	Номер	Название вида (по Ф. К. Куріча), происхождение	Род / подрод / секция по системе А. К. Станкевич (1999)	Род / подрод / секция по системам Ф. К. Куріча (1976, 1983)
1	22	<i>Lathyrus sativus</i> L., Индия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
2	13	<i>Lathyrus sativus</i> L., Иран	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
3	407	<i>Lathyrus sativus</i> L., Кипр	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
4	356	<i>Lathyrus cicera</i> L., Сирия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
5	1709	<i>Lathyrus hirsutus</i> L., Франция	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
6	1757	<i>Lathyrus tingitanus</i> L., Австралия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
7	1790	<i>Lathyrus annuus</i> L., ГДР	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
8	И-604554	<i>Lathyrus odoratus</i> L., США	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
9	1356	<i>Lathyrus tuberosus</i> L., Краснодарский кр.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
10	И-308541	<i>Lathyrus sylvestris</i> L., Франция	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
11	И-310163	<i>Lathyrus latifolius</i> L., Италия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
12	1293	<i>Lathyrus aphaca</i> L., Индия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Aphaca</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Aphaca</i>
13	1436	<i>Lathyrus nissolia</i> L., Венгрия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Nissolia</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Nissolia</i>
14	380	<i>Lathyrus ochrus</i> (L.) DC., Турция	<i>Clymenum</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Clymenum</i>
15	1768	<i>Lathyrus ochrus</i> (L.) DC., Греция	<i>Clymenum</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Clymenum</i>
16	1370	<i>Lathyrus clymenum</i> L., Болгария	<i>Clymenum</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Clymenum</i>
17	1329	<i>Lathyrus inconspicuus</i> L., Грузия	<i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Linearcarpus</i>

Таблица 1 (продолжение)

Образцы видов трибы *Vicieae* (Adans.) Вронп, взятые для анализа ITS-последовательностей ядерной ДНК и их таксономический статус в соответствии с классификациями А. К. Станкевич (1999) и Ф. К. Куріча (1976, 1983)

	Номер	Название вида (по Ф. К. Куріча), происхождение	Род / подрод / секция по системе А. К. Станкевич (1999)	Род / подрод / секция по системам Ф. К. Куріча (1976, 1983)
18	И-0139312	<i>Lathyrus pratensis</i> L., Карелия	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Pratensis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Pratensis</i>
19	И-0138125	<i>Lathyrus gmelinii</i> Fritsch, Алтай	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Lathyrostylis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Orobus</i>
20	И-0139316	<i>Lathyrus palustris</i> L., Карелия	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Lathyrostylis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Orobus</i>
21	И-0139208	<i>Lathyrus maritimus</i> (L.) Bigel., Карелия	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Lathyrostylis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Orobus</i>
22	224	<i>Lens culinaris</i> Medik., Воронежская обл.	<i>Lens</i>	<i>Lens</i>
23	517	<i>Vicia ervilia</i> Willd., Украина	<i>Ervilia</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Ervilia</i>
24	32547	<i>Vicia bithynica</i> L., Украина	<i>Ervum</i> / subgen. <i>Ervum</i> / sect. <i>Ara-</i> <i>chus</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Faba</i>
25	35828	<i>Vicia unijuga</i> A. Br., Новосибирская обл.	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Viciostyles</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Vicilla</i>
26	36653	<i>Vicia sativa</i> L., Московская обл.	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Vicia</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Vicia</i>
27	36771	<i>Vicia peregrina</i> L., Азербайджан	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Hypochusa</i> / sect. <i>Peregrinae</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Peregrinae</i>
28	37026	<i>Vicia villosa</i> Roth, Тамбовская обл.	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Cracca</i> / sect. <i>Longitubulateae</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Cracca</i>
29	36787	<i>Vicia narbonensis</i> L., Алжир	<i>Bona</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Faba</i>
30	36792	<i>Vicia hirsuta</i> (L.) Gray, Португалия	<i>Ervum</i> / subgen. <i>Ervum</i> / sect. <i>Len-</i> <i>ticulae</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Cracca</i>
31	1628	<i>Vicia faba</i> L., Украина	<i>Faba</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Faba</i>
32	5	<i>Pisum sativum</i> L., Памир	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
33	23	<i>Pisum sativum</i> L., Африка	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
34	Сорт Тройка	<i>Pisum sativum</i> L., Россия	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
35	AY839337	<i>Vicia unijuga</i> A. Br.	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Viciostyles</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Vicilla</i>
36	AY839338	<i>Vicia nipponica</i> Matsum = <i>V. pseudoorobus</i> Fisch.	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Viciostyles</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Vicilla</i>

Таблица 1 (окончание)

Образцы видов трибы *Viciae* (Adans.) Вропп, взятые для анализа ITS-последовательностей ядерной ДНК и их таксономический статус в соответствии с классификациями А. К. Станкевич (1999) и Ф. К. Курича (1976, 1983)

	Номер	Название вида (по Ф. К. Курича), происхождение	Род / подрод / секция по системе А. К. Станкевич (1999)	Род / подрод / секция по системам Ф. К. Курича (1976, 1983)
37	AY839339	<i>Vicia cracca</i> L.	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Cracca</i> / sect. <i>Cracca</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Cracca</i>
38	AY839344	<i>Lathyrus annuus</i> L.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
39	AY839345	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Aphaca</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Aphaca</i>
40	AY839348	<i>Lathyrus cicera</i> L.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
41	AY839349	<i>Lathyrus clymenum</i> L.	<i>Clymenum</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Clymenum</i>
42	AY839361	<i>Lathyrus japonicus</i> Willd.	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Lathyrstylis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Orobus</i>
43	AY839372	<i>Lathyrus nervosus</i> Lam.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Notolathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Notolathyrus</i>
44	AY839375	<i>Lathyrus nissolia</i> L.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Nissolia</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Nissolia</i>
45	AY839376	<i>Lathyrus ochrus</i> (L.) DC	<i>Clymenum</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Clymenum</i>
46	AY839379	<i>Lathyrus palustris</i> L.	<i>Orobus</i> / subgen. <i>Lathyrstylis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Orobus</i>
47	AY839384	<i>Lathyrus pratensis</i> L.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Pratensis</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Pratensis</i>
48	AY839385	<i>Lathyrus pubescens</i> Hook. and Arn.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Notolathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Notolathyrus</i>
49	AY839393	<i>Lathyrus sphaericus</i> Retz.	<i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Linearcarpus</i>
50	AY839394	<i>Lathyrus sphaericus</i> Retz.	<i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Linearcarpus</i>
51	AY839399	<i>Lathyrus tingitanus</i> L.	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Cicerula</i>	<i>Lathyrus</i> / sect. <i>Lathyrus</i>
52	AY143447,	<i>Pisum fulvum</i> Sibth. Et Smith	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
53	AY143456	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>abyssinicum</i> (A. Br.) Berger	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
54	AY143455	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (Bieb.) Schmalh.	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
55	AY143465	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>speciosum</i> subvar. <i>arvense</i> (Alef.) Makash.	<i>Pisum</i>	<i>Pisum</i>
56	AF228072	<i>Lens nigricans</i> (M. B.) Godr.	<i>Lens</i>	<i>Lens</i>
57	AJ130831	<i>Vicia bithynica</i> L.	<i>Ervum</i> / subgen. <i>Ervum</i> / sect. <i>Arachus</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Faba</i>
58	X17535	<i>Vicia faba</i> L.	<i>Faba</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Faba</i>
59	DQ351827	<i>Vicia hirsuta</i> (L.) Gray	<i>Ervum</i> / subgen. <i>Ervum</i> / sect. <i>Lenticulae</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicilla</i> / sect. <i>Cracca</i>
60	AJ130833	<i>Vicia narborensis</i> L.	<i>Bona</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Faba</i>
61	AJ566206	<i>Vicia peregrina</i> L.	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Hypechusa</i> / sect. <i>Peregrinae</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Peregrinae</i>
62	AJ010804	<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Vicia</i>	<i>Vicia</i> / subgen. <i>Vicia</i> / sect. <i>Vicia</i>
63	#AY594660	<i>Cicer arietinum</i> L.		<i>Cicer</i> L.
64	#AF053159	<i>Trifolium hybridum</i> L.		

большим числом как вариабельных, так и парсимони-информативных сайтов, чем спейсер ITS2 (табл. 2). Как и следовало ожидать, область гена 5.8S рРНК была весьма консервативна, и у исследованных образцов выявлено всего 5 вариабельных сайтов.

При анализе полученных последовательностей были детектированы как индели, так и нуклеотидные замены. Протяженные делеции обнаружены в ITS-последовательностях видов *L. nissolia* (делеция 12 пн), *V. villosa* и *V. cracca* (одинаковая делеция 14 пн), *V. sativa* (делеция 16 пн), *L. sphaericus* (две делеции 8 и 25 пн), *L. inconspicuous* (15 пн). При этом делеции локализовались, как правило, в 5'-области ITS2 и только у вида *V. sativa* делеция была расположена в 5'-области ITS1-района.

Анализ нуклеотидного полиморфизма ITS-района для большинства видов *Lathyrus* и *Vicia* исследуемого набора образцов также выявил свои видоспецифические нуклеотидные замены.

Среди *Lathyrus*, виды *L. sphaericus* (8 замен), *L. nissolia* (8 замен), *L. inconspicuous* (4 замены) характеризовались наибольшим числом видоспецифических (аутопоморфных) замен. Число аутопоморфных замен в ITS1-5.8S-ITS2 у остальных видов *Lathyrus* не превышало 3. Для каждого вида вик, за исключением *V. nipponica*, также были идентифицированы видоспецифические замены. Наибольшее число аутопоморфных замен было детектировано у *V. hirsuta* (6 замен), *V. ervilia* (6 замен), *V. faba* (6 замен), *V. narbonensis* (5 замен). Остальные виды *V. sativa*, *V. bithynica*, *V. villosa*, *V. peregrina* характеризовались меньшим числом замен.

Помимо видоспецифических замен были детектированы замены для отдельных групп видов как среди представителей *Vicia*, так и *Lathyrus*.

Особый интерес представлял проблематичный вид *V. unijuga*, сочетающий морфологические признаки и *Vicia*, и *Lathyrus*. Проведенный анализ ITS-области вида *V. unijuga* показал наличие в его последовательности всех родоспецифических замен, характерных для анализируемых видов *Vicia*. Этот факт объединяет вид *V. unijuga* с другими представителями *Vicia*.

Последовательность *V. unijuga* оказалась практически идентична ITS-последовательности *V. nipponica* за исключением одной нуклеотидной замены, обнаруженной в положении 436\* пн (Т-А). При этом было идентифицировано шесть специфических замен, характерных для ITS-областей этих двух видов и, таким образом, отличающих виды *V. unijuga* и *V. nipponica* от остальных анализируемых видов вик.

В свою очередь, виды *V. cracca* и *V. villosa* характеризовались присутствием протяженной 14 нуклеотидной делеции в 5'- области ITS2 и четырьмя общими заменами. Вместе с тем последовательности обоих видов имели также и свои видоспецифические замены, отличающие их друг от друга.

Среди последовательностей представителей *Lathyrus* наибольшее число синапоморфных замен было детектировано для пар видов *L. nervosus* — *L. pubescens* (4 замены и 1 мононуклеотидная инсерция) и *L. japonicus* — *L. maritimus* (L.) Bigelow (3 замены).

В целом число вариабельных сайтов проанализированной области ITS1-5.8S-ITS2 у чин составило 20,3 %. Для представителей вик этот показатель составил 15,3 %. Для сравнения, дополнительный анализ последовательностей видов рода *Pisum* (2 вида: *P. fulvum* и 3 подвида *P. sativum*) и рода *Lens* (6 видов: *L. tomentosus*, *L. lamottei*, *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans*, 2 подвида *L. culinaris*), представленных в своем полном составе, выявил лишь около 3 % вариабельных сайтов от общей длины выровненного аналогичного участка ITS1-5.8S-ITS2.

#### Кладистический анализ представителей трибы *Vicieae*

Выявленный нуклеотидный полиморфизм ITS-области был использован для расчета генетических расстояний (двупараметрическая модель Кимуры) и построения NJ-дендрограммы (рис. 1).

На дендрограмме все представители трибы *Vicieae* формировали единый кластер (индекс бутстрепа (ИБ) 72 %). Виды *Cicer arietinum* и *Trifolium hybridum*, взятые в анализ в качестве внешних групп, как и ожидалось, формировали отдельные сестринские ветви по отношению к этому кластеру. Внутри кластера три-

\* — здесь и далее по тексту: порядковый номер нуклеотидов от начала ITS1-последовательности *T. hybridum* AF053159, взятой в анализ в качестве внешней группы.

#### Характеристики ITS1-5.8S-ITS2-района у 35 представителей трибы *Vicieae* (Adans.) Bronn

Таблица 2

	ITS1	5.8S	ITS2	Общая
Выровненная длина пн.	201	164	202	568
Длина без пробелов пн.	176–196	164	164–192	520–556
GC состав, %	54,2 %	50,5 %	48,7 %	51 %
Число константных сайтов	99	159	136	394
Число вариабельных сайтов	100	5	62	167
Число парсимони-информативных сайтов	79 (39,3 %)	4 (2,4 %)	41 (20,3 %)	124 (21,8 %)

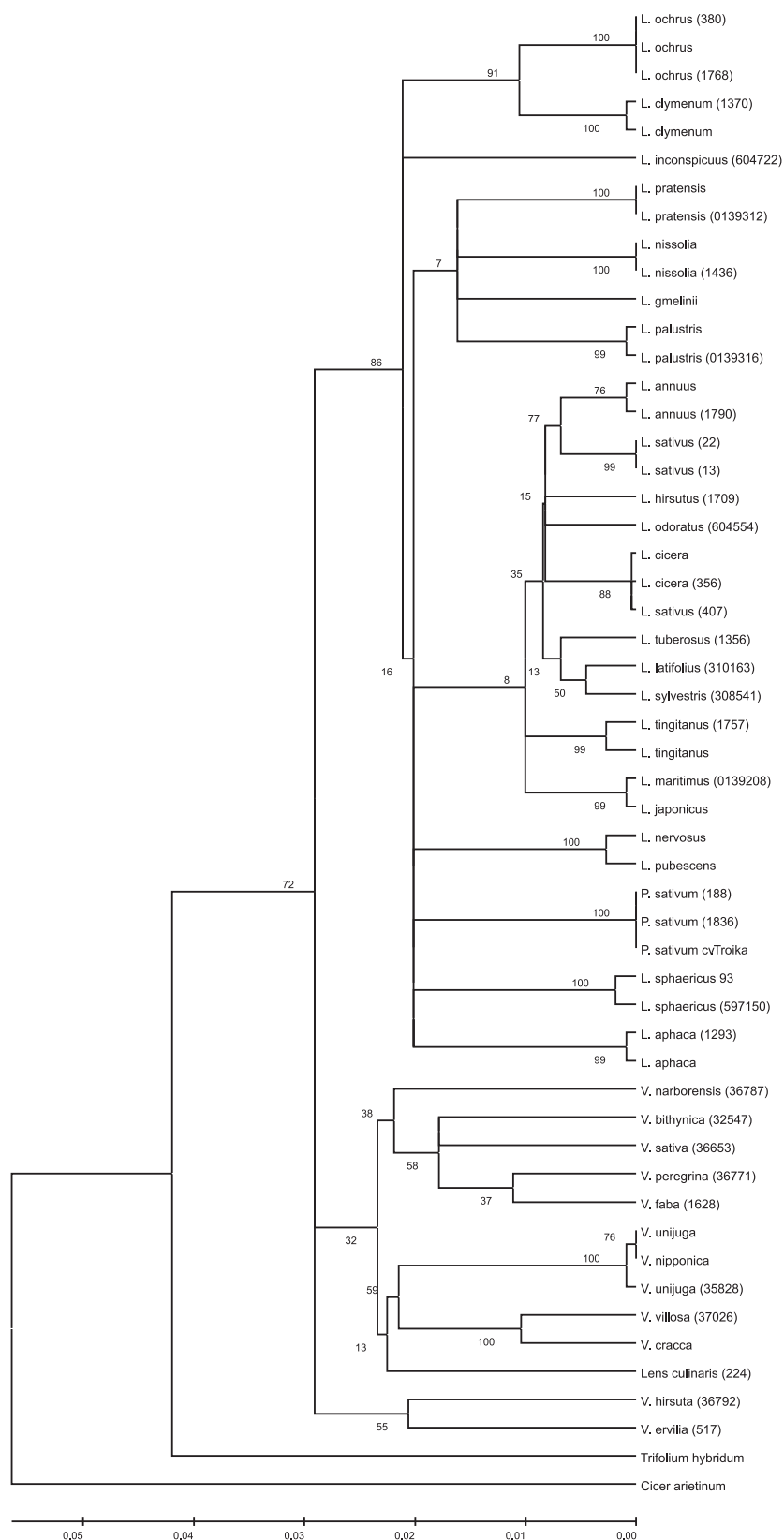


Рис. 1. Дендрограмма генетических различий исследованных представителей трибы *Viciae* (Adans.) Вронп, построенная с использованием методов Neighbor Joining на основе данных нуклеотидного полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) генов рРНК

бы *Viciaeae* также с высокими значениями ИБ (86 %) выделяется обширный подкластер, включающий всех исследованных представителей рода *Lathyrus*, а также представителей рода *Pisum*. Внутренняя дифференциация этого подкластера помимо внутривидовых группировок выявила несколько групп, объединяющих разные виды, как, например *L. clymenum* — *L. ochrus* (ИБ — 91%), *L. maritimus* — *L. japonicus* (ИБ — 99%), *L. sativus* — *L. cicera* (ИБ — 88%), *L. sativus* — *L. annuus* (ИБ — 79%).

Как уже упоминалось, одним из основных вопросов, связанных с систематикой трибы *Viciaeae*, считается вопрос таксономического положения представителей секции *Orobus*. Эта весьма разнообразная секция включает по оценкам разных систематиков от 25 до 54 видов. Некоторые авторы выделяют их представителей в отдельный древний род *Orobus*, предположительно давший начало остальным видам трибы [3, 10, 16 и др.]. В данное исследование были включены последовательности 4 видов секции *Orobus* — *L. palustris*, *L. japonicus*, *L. gmelinii*, *L. maritimus*, а также *V. unijuga*, *V. nipponica*, выделяемых А. К. Станкевич вместе с видами *L. linifolius*, *L. pisiformis*, *L. vernus* в отдельный род. Однако по результатам проведенного анализа представители этих видов не формировали общей родовой группы в трибе, а фактически распределились политомичными ветвями среди остальных представителей *Lathyrus*, что говорит о высокой дивергентности всех видов этой группы. Единственным исключением по данным анализа нуклеотидной вариабельности ITS-региона стало высокое сходство образцов *L. maritimus* с *L. japonicus*. Эти две последовательности отличались единственной заменой в положении 361 (A-G). Действительно многие ботанические классификации рода *Lathyrus* рассматривают *L. maritimus* и *L. japonicus* как один вид [6, 27 и др.]. На построенной по данным молекулярного анализа дендрограмме *L. maritimus* и *L. japonicus* образуют общую группу (ИБ — 99%), одновременно не проявляя значительного сходства с другими представителями *Orobus*, подтверждая синонимичность данных видовых таксонов.

Высокий уровень полиморфизма видов, относящихся к *Orobus*, также был показан и в работе Keniger с сотрудниками (2005). Клада, содержащая европейские, североамериканские образцы, а также голарктические виды, характеризовалась политомичным строением. Стоит отметить, что определение филогенетических отношений у видов этой секции вызывало большие затруднения и у других авторов [5, 15].

Что касается, так называемых виковых оробиодов *V. unijuga* и *V. nipponica*, как это упоминалось выше, все выявленные в анализе особенности ITS-области этих видов показывают их родство с *Vicia*. По всей видимости, выделение *V. unijuga*, *V. nipponica*, а также видов *L. palustris*, *L. japonicus*, *L. gmelinii*, *L. maritimus*, *L. linifolius*, *L. pisiformis*, *L. vernus* в отдельный родо-

вой таксон не может быть поддержано полученными данными.

Представители другой проблематичной группы видов рода *Lathyrus*: *L. clymenum*-*L. ochrus*, выделяемых некоторыми систематиками в отдельный род *Clymenum* [6, 3], согласно полученным молекулярным данным, включаются в общий кластер с другими видами *Lathyrus*. Положение этой группы на дендрограмме, а также наличие всего лишь одной синапоморфной замены, объединяющей виды *L. clymenum* и *L. ochrus*, сохраняет секционный статус группы *Clymenum* в составе рода *Lathyrus*, предложенного Ф. К. Курича (1983). Для сравнения такой «типичный род», как *Pisum* (виды *P. fulvum*, *P. sativum* и подвиды *P. sativum* ssp. *abyssinicum*, *P. sativum* ssp. *elatius*, *P. sativum* var. *arvense*), также вошедший в состав кластера *Lathyrus*, характеризовался наличием восьми синапоморфий.

Что касается остальных группировок кластера *Lathyrus*, то бутстреп-поддержка в большинстве случаев была невелика. Таким образом, в целом никаких групп, соответствующих внутриродовым секциям *Lathyrus*, обнаружено не было. Представители отдельных видов, как правило, формировали политомичные ветви в кластере *Lathyrus*, не выдерживая секционного деления. Это может быть связано как с недостаточной разрешающей способностью ITS-последовательности для *Viciaeae*, так и возможной искусственностью такого рода секционного деления трибы. Аналогичные трудности при использовании этого классического ITS-метода для решения филогенетических и таксономических аспектов отдельных таксонов отмечались также у представителей рода *Lens* [28].

В отличие от *Lathyrus* представители рода *Vicia* не отличались целостностью своего кластера. Два вида *V. hirsuta* и *V. ervilia* формировали отдельную кладу (ИБ — 55%), наравне с *Lathyrus* и другими *Vicia*. Клада *Vicia* включала остальные виды вик, в котором по существу можно выделить следующие две группы: группу *V. peregrina*, *V. faba*, *V. sativa*, *V. bithynica* (ИБ — 58%) и группу *V. cracca*, *V. villosa*, *V. unijuga*, *V. nipponica* (ИБ — 59%). Положение *V. hirsuta* и *V. ervilia* на дендрограмме и значительное число аутопоморфных замен может характеризовать эти виды (*V. hirsuta*, *V. ervilia*), как весьма дивергентные относительно остальных *Vicia*, и поддерживать возможность выделения этих видов в отдельный род/роды (*Ervum* L. и *Ervilia* (L.) Link.) наравне с *Lens*, как это предлагается в систематике А. К. Станкевич (1999).

Согласно данным проведенного молекулярного анализа, подтвердить родовой статус *V. narbonensis*, равно как и выделить вместе с *V. hirsuta* в отдельный род *Ervum* вид *V. bithynica*, согласно системе А. К. Станкевич, (1999) не представляется возможным. Виды *V. bithynica* и *V. hirsuta* жестко разделяются на дендрограмме, попадая в разные кластеры. Интересно отметить, что кластер, включивший *V. bithynica*, *V. peregrina*, *V. sativa*, *V. faba*, а также в качестве наиболее дистанцированного его чле-



на *V. narbonensis*, главным образом состоит из представителей секции *Faba* подрода *Vicia* (классификация Ф. К. Курича, 1976). В то время как другой кластер, также поддерживая систему Ф. К. Курича (1976), на дендрограмме был представлен *V. crassa*, *V. nipponica*, *V. unijuga*. Образованные внутри этого кластера группы *V. villosa* — *V. crassa* и *V. nipponica* — *V. unijuga*, соответствуют секциям *Cracca* и *Vicilla* подрода *Vicilla* [6].

В целом, однако, невысокий уровень бутстреп-поддержки клад *Vicia*, а также отсутствие специфичных синапоморфных замен для групп видов, не позволяет сделать окончательный вывод относительно состава этого рода и отдельных таксономических групп в нем. Согласно полученным данным, этот род включает генетически разнородные виды, вопрос о родстве которых должен решаться с привлечением дополнительных образцов, а также вероятно анализом других последовательностей генома.

Таким образом, в результате проведенного анализа нуклеотидного полиморфизма ITS1-5.8S-ITS2-последовательностей представителей трибы *Vicieae* был выявлен целый ряд молекулярных признаков (замен и инделей), характеризующих как отдельные виды, так и группы видов *Lathyrus* и *Vicia*. При этом показана в 2 раза большая нуклеотидная вариабельность спейсера ITS1 по сравнению с ITS2.

Предложенное А. К. Станкевич (1999) выделение видов *L. clymenum*, *L. ochrus* из состава *Lathyrus* в отдельный род *Clymenum*, а также видов *L. palustris*, *L. japonicus*, *L. gmelinii*, *L. maritimus*, *L. linifolius*, *L. pisiformis*, *L. vernus*, *V. unijuga*, *V. nipponica* в отдельный род *Orobis*, не поддерживается данными вариабельности ITS-региона. Полученные данные скорее подтверждают видовой состав рода *Lathyrus*, предложенный в последней классификации Ф. К. Курича (1983), не выявляя при этом секционной дифференциации этого рода.

Молекулярное исследование таксономического положения *V. unijuga* и *V. nipponica*, имеющих морфологические признаки как вик, так и чин, показало высокую степень сходства их ITS-последовательностей и генетическую близость к представителям рода *Vicia*.

Виды, включаемые в род *Vicia*, действительно составляют генетически разнородную группу, вероятно требующую выделения нескольких родовых таксонов. Такие виды как *V. hirsuta*, *V. ervilia* образуют дивергентные ветви в кластере *Vicia* и вероятно наравне с *L. culinaris* могли бы представлять отдельные рода (*Ervum* и *Ervilia*), как это предложено в классификации А. К. Станкевич (1999). Состав собственно рода *Vicia* и положение остальных таксонов внутри него остаются неоднозначными, что требует дополнительных исследований с привлечением других молекулярных методов и анализа других районов генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-48869-а и частично гранта РФФИ 07-04-01123-а.

## Литература

1. Крашенинников И. М. Из истории развития ландшафтов Южного Урала / Крашенинников И. М. // Ред. Сукачев В. Н. — М.: Географические работы. — 1954. — С. 103–128.
2. Попов М. Г. Род *Cicer* и его виды. К проблеме происхождения средиземноморской флоры (Опыт морфологической и географической монографии) / Попов М. Г. // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. — 1929. — Т. 21, Вып. 1. — 239 с.
3. Станкевич А. К. Вика. Культурная флора / Станкевич А. К., Репьев С. И. // Ред. Репьев С. И. — СПб.: ГНЦ-ВИР, 1999. — Т. 4. — 491 с.
4. Федченко Б. А. *Lathyrus* L. / Федченко Б. А. // Ред. Комаров В. Л. — М.-Л.: Флора СССР, 1948. — Т. 13. — С. 479–520.
5. Чефранова З. В. Конспект системы рода *Lathyrus* L. / Чефранова З. В. // Новости сист. высш. раст. — 1971. — Т. 8. — С. 191–201.
6. Чефранова З. В. Род *Lathyrus* L. / Чефранова З. В. // Ред. Федорова А. А. — Л.: Флора Европейской части СССР, 1987. — Т. 6. — С. 147–172.
7. Яковлев Г. П. Бобовые земного шара / Яковлев Г. П. // Ред. Меницкий Ю. Л. — Л.: Наука, 1991. — 141 с.
8. Adanson M. Familles des plantes / Adanson M. // Paris, 1763. — N 2. — P. 331–332.
9. Ainouche A.-K. Phylogenetic relationships in *Lupinus* (*Fabaceae*: *Papilionoideae*) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA / Ainouche A.-K., R. J. Bayer. // American Journal of Botany — 1999. — V. 86. — P. 590–607.
10. Alefeld. F. Genus *Vicia* L. / Alefeld. F. // Bonpandia. — 1861. — Vol. 9. — P. 66–199.
11. Allan G. J. Tribal delimitation, phylogenetic relationships of Loteae, Coronilleae (*Faboideae*: *Fabaceae*) with special reference to Lotus: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences / Allan G. J., Porter J. M. // American Journal of Botany — 2000. — Vol. 87. — P. 1871–1881.
12. Alvarez I. A. Ribosomal ITS sequences, plant phylogenetic inference / Alvarez I. A., Wendel J. F. // Molec. Phyl. Evol. — 2003. — Vol. 29. N 3. — P. 417–434.
13. Asmussen C. B. Chloroplast DNA characters, phylogeny and classification of *Lathyrus* (*Fabaceae*) / Asmussen C. B., Liston A. // Am. J. Bot. — 1998. — Vol. 85. — P. 387–401.
14. Barneby R. C. A new species of *Lathyrus* (*Fabaceae*) from the Death Valley region of California, Nevada. / Barneby R. C., Reveal J. L. // Aliso. — 1971. — Vol. 7. — P. 361–364.
15. Bassler M. Revision der eurasiatischen Arten von *Lathyrus* L. sect. *Orobis* (L.) Gren. et Godr. /

- Bassler M. // Feddes Repertorium. — 1973. — Bd. 84. — Hf. 5–6. — P. 329–447.
16. Boissier E. *Vicia* L., *Lathyrus* L. / Boissier E. // Flora Orientalis. Geneve, 1872. — Vol. 2. — P. 565–622.
17. Bronn H. G. De formis plantarum Leguminosarum primitivis et derivatis / Bronn H. G. // Heidelbergae. — 1822. — P. 1–76.
18. Byoung-Hee Choi. Phylogenetic significance of stylar features in genus *Vicia* (Leguminosae): an analysis with molecular phylogeny / Byoung-Hee Choi, Dong-Im Seok, Yasuhiko Endo, Hiroyoshi Ohashi // Journal of Plant Research. — 2006. — Vol. 119, N 5. — P. 513–523.
19. Godron D. A. *Lathyrus* L. / Grenier J. C. M., Godron D. A. // Flore de France. I. — Paris et Besanson, 1848. — P. 478–492.
20. Goel S. Molecular evolution, phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the Phaseolus-Vigna complex / Goel S., Raina S. N., Ogiyama Y. // Mol. Phylogenet. Evol. — 2002. — Vol. 22, N 1. — P. 1–19.
21. Gunn C. R. Androecium and pistil characters for the tribe *Vicieae* (Fabaceae) / Gunn C. R., Kluge J. // Taxon. — 1976. — Vol. 25. — P. 563–575.
22. Edwards S. K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses / Edwards S. K., Johnston C., Thompson C. // Nucleic Acids Res. — 1991. — Vol. 19, N 6. — P. 1349.
23. Engler A. *Lathyrus* L. / Engler A., Prantl K. // Die Natürlichen Pflanzen Familien. Leipzig. — 1894. — S. 70–388.
24. Kenicer G. J. Systematics, biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer, cpDNA sequence data / Kenicer G. J., Kajita T., Pennington R. T., Murata J. // American Journal of Botany. — 2005. — Vol. 92. — P. 1199–1209.
25. Kumar S. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment / Kumar S., Tamura K., Nei M. // Briefings in Bioinformatics. — 2004. — Vol. 5. — P. 150–163.
26. Kupicha F. K. The infrageneric structure of *Vicia*. / Kupicha F. K. // Notes from the Royal Botanic Garden. — Edinburgh. — 1976. — Vol. 34, N 3. — P. 287–326.
27. Kupicha F. K. The infrageneric structure of *Lathyrus* L. / Kupicha F. K. // Notes from the Royal Botanic Garden. — Edinburgh. — 1983. — Vol. 41, N 2. — P. 209–244.
28. Mayer M. S. The phylogeny of *Lens* (Leguminosae): new insight from ITS sequence analysis / Mayer M. S., Bagga S. K. // Plant Systematics, Evolution. — 2002. — Vol. 232. — P. 145–154.
29. Nuclear DNA contents, rDNAs, karyotype evolution in *Vicia* subgenus *Vicia*: II. Section Peregrinae / Frediani M., Caputo P., Venora G. [et al.] // Protoplasma. — 2005. — Vol. 226, N 3–4. — P. 181–190.
30. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / Saitou N., Nei M. // Mol Biol Evol. — 1987. — V. 4. — N 4. — P. 6–25.
31. Simola L. K. Comparative studies on number of leaflets, venation and epidermal structure in the genus *Lathyrus* / Simola L. K. // Canad. J. Bot. — 1968. — Vol. 46. — P. 71–84.
32. Steele K. P. Phylogenetic analyses of tribes Trifoleae, *Vicieae* based on sequences of the plastid gene matK (Papilionoideae: Leguminosae) / Steele K. P., Wojciechowski M. F. B.; eds. B. Klitgaard, A. Bruneau. — Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK: Advances in legume systematics, 2003. — Part 10. — P. 355–370.
33. Thompson J. D. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools / Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F. [et al.] // Nucleic Acids Res. — 1997. — Vol. 24. — P. 4876–4882.
34. White T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / White T. J., Bruns T., Lee S. [et al.] // In: Innis M. A., Gelfand D. H., Shinsky J. J., White T. J. (editors). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego. — 1990. — P. 315–322.

**Using of ITS sequences for the evaluation of taxonomic relations of the representatives of tribe *Vicieae* (Adans.)  
Bronn cem. *Fabaceae* Lindl**

*N. N. Ryzhova, M. O. Burlyayeva, E. Z. Kochieva,  
M. A. Vishnyakova*

✿ **SUMMARY:** ITS1-5.8S-ITS2 nucleotide polymorphism analysis of *Vicieae* species that represent accessions of Russian genebank (VIR) collection have been performed. Nucleotide substitutions in ITS1-5.8S-ITS2-sequences and indels of different length that were species-specific or specific for *Lathyrus* and *Vicia* species groups have been revealed. New data proving taxonomic status of accessions with uncertain taxonomic position have been obtained.

✿ **KEY WORDS:** tribe *Vicieae*, taxonomy, nucleotide polymorphism, ITS-sequences