



УДК 574.9(575.8)

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.3>

Филогеографическая структура *Anemone baicalensis* (Ranunculaceae) на основе полиморфизма пластидной ДНК (*trnL-trnF*) как подтверждение существования плейстоценовых микрорефугиумов на хр. Хамар-Дабан

М. В. Протопопова^{1,2}, В. В. Павличенко^{1,2}, Д. А. Орлова^{1,2},
В. В. Чепинога^{2,3}

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

³ Институт географии им. В. Б. Сочавы СО РАН, г. Иркутск, Россия

E-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Аннотация. Представлены результаты исследования современной филогеографической структуры неморального реликта *Anemone baicalensis* Turcz. на хр. Хамар-Дабан с использованием пластидного ДНК-маркера *trnL-trnF*. Показана генетическая дифференцированность популяций из западной и восточной частей ареала. Выявленные филогеографические паттерны подтверждают частичную фрагментацию ареала *A. baicalensis* и сохранение популяций в микрорефугиумах на хр. Хамар-Дабан в течение последних плейстоценовых похолоданий. Определена предполагаемая зона вторичного контакта популяций из «восточной» и «западной» филогеографических групп и их возможной гибридизации после наступления благоприятных условий в голоцене. Результаты позволяют предположить, что географическая обособленность популяций *A. baicalensis* на восточном пределе распространения вида вдоль хр. Хамар-Дабан, наблюдаемая в низовьях рек, относительна, а зона их вероятного контакта с основной частью ареала находится в субальпийском и горнотаёжном поясах.

Ключевые слова: неморальный реликт, рефугиум, оледенение, ветреница байкальская *Anemone baicalensis*, молекулярно-генетические маркеры, молекулярно-биологические методы, *trnL-trnF*.

Для цитирования: Филогеографическая структура *Anemone baicalensis* (Ranunculaceae) на основе полиморфизма пластидной ДНК (*trnL-trnF*) как подтверждение существования плейстоценовых микрорефугиумов на хр. Хамар-Дабан / М. В. Протопопова, В. В. Павличенко, Д. А. Орлова, В. В. Чепинога // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2019. Т. 30. С. 3–15. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.3>

Введение

Глобальные климатические изменения являются одним из определяющих факторов формирования и динамики растительного покрова. Так, серия плейстоценовых оледенений в течение последних 2,5 млн лет привела к фрагментации евроазиатского пояса широколиственных (неморальных) лесов на европейский и восточноазиатский участки. Вследствие этого дизъ-

юнкция неморальной зоны в современном растительном покрове Евразии приходится на большую часть Сибири. Поддержание преемственности растительности на территории Южной Сибири оказалось возможным за счёт отсутствия здесь покровного оледенения и наличия рефугиумов, в которых растения смогли пережить неблагоприятные периоды, связанные с изменениями климата [Ивановский, 2006; Положий, Крапивкина, 1985; Реликтовые комплексы растительности ... , 2009]. Одним из важнейших рефугиумов на территории Байкальской Сибири является северный макросклон хр. Хамар-Дабан, протянувшийся вдоль южного и юго-восточного побережья оз. Байкал. Вопрос о масштабах горно-долинного оледенения на хр. Хамар-Дабан и моделях выживания растений в течение неблагоприятных периодов все ещё остаётся открытым [Ивановский, 2006; Cherinoga, Protoporova, Pavlichenko, 2017]. Результаты анализа характера современного распространения неморальных реликтовых видов, проведённого нами ранее, позволили предположить существование плейстоценовых микрорефугиумов на северном макросклоне хр. Хамар-Дабан, приуроченных к поймам крупных рек [Cherinoga, Protoporova, Pavlichenko, 2017]. Очевидно, в периоды похолоданий распространение реликтовых видов было более ограниченным, чем в настоящее время, а популяции из различных микрорефугиумов, вероятно, оставались изолированными друг от друга. В благоприятные периоды растения имели возможность расселяться вдоль макросклона и соединяться с популяциями из соседних микрорефугиумов. Наши последние исследования показали, что ареалы большинства неморальных реликтов на хр. Хамар-Дабан являются относительно непрерывными [Новые данные о ... , 2015; Cherinoga, Protoporova, Pavlichenko, 2017]. Одним из характерных и массовых реликтовых растений Байкальской Сибири с весьма обширным ареалом на хр. Хамар-Дабан является ветреница байкальская (*Anemone baicalensis* Turcz., Ranunculaceae), благодаря чему вид является удобным модельным объектом для изучения динамики популяций неморальных реликтов в пределах рефугиума. Северный макросклон хр. Хамар-Дабан является основным южносибирским участком ареала *A. baicalensis*, из которого он и был описан. Второй участок ареала вида на территории Южной Сибири находится в Западном Саяне [Красная книга Красноярского ... , 2012]. Согласно последней таксономической ревизии рода *Anemone* ветреница байкальская отнесена к роду *Anemonastrum* и переименована в *Anemonastrum baicalense* (Turcz.) Mosyakin [Mosyakin, 2018]. Однако в данной работе мы придерживаемся традиционной таксономической концепции, т. е. рассматриваем вид в рамках рода *Anemone* s.l.

A. baicalensis приурочен к пойменным лесам в низовьях рек, а в низко- и среднегорьях хорошо представлен в тёмнохвойных горнотаёжных лесах, достаточно часто встречается на субальпийских лугах [Новые данные о распространении ... , 2015]. *A. baicalensis* трактуется как южносибирский эндем, неморальный реликт неогенового возраста [Растительность Прибайкалья как ... , 2006] и относится согласно классификации М. М. Ильина [1941] к пацифической группе, представители которой связаны происхождением с

Восточной Азией. На территории российского Дальнего Востока и стран Восточной Азии *A. baicalensis* имеет ряд близкородственных видов (*A. flaccida* F. Schmidt, *A. glabrata* (Maxim.) Juz., *A. rossii* S. Moore, *A. kansuensis* W. T. Wang, *A. saniculiformis* C. Y. Wu ex W. T. Wang), которые рядом авторов принимаются в качестве внутривидовых таксонов *A. baicalensis* s.l. В этом случае *A. baicalensis* трактуется как вид, имеющий широкое южносибирско-восточноазиатское дизъюнктивное распространение.

Ареал *A. baicalensis* на северном макросклоне хр. Хамар-Дабан простирается примерно на 150 км от р. Безымянная на западе и, по меньшей мере, до р. Мантуриха на востоке [Новые данные о ... , 2015]. Также известно изолированное местонахождение в пойме р. Большая Речка [Красная книга Республики ... , 2013], расположенное в 30 км к северо-востоку от Мантурихи. Учитывая низкую морфологическую вариабельность и стабильный уровень плоидности в популяциях [Использование генетических маркеров ... , 2015], без привлечения более чувствительных молекулярно-генетических методов анализа сложно судить как о наличии возможной изоляции между популяциями *A. baicalensis*, так и о степени лимитированности возможного потока генов между ними на протяжении четвертичного периода. Это, в свою очередь, затрудняет формирование концепции распространения и динамики этого вида на хр. Хамар-Дабан. Цель настоящей работы – изучение современной филогеографической структуры *A. baicalensis* на хр. Хамар-Дабан с целью определения особенностей динамики и путей распространения популяций вида на протяжении четвертичного периода.

Материалы и методы

Сбор образцов проводили из популяций в долинах рек, стекающих с северного макросклона хр. Хамар-Дабан (табл.). Свежие неповреждённые листья растений помещали в индивидуальные бумажные пакеты из фильтровальной бумаги (23 г/м²) и высушивали в силикагеле. Обезвоженные образцы перемещали в свежий дегидратированный силикагель и хранили в темноте до момента проведения анализов. Отбирали листья с не менее чем пяти экземпляров растений из каждой популяции.

Суммарную ДНК выделяли из образцов СТАВ-методом [Doyle, Doyle, 1987] с авторскими модификациями [Перспективы использования внутренних ... , 2016; DNA Barcoding ... , 2019]. В качестве молекулярно-генетического маркера использовали последовательность пластидного межгенного спейсера *trnL-trnF*. Амплификацию (ПЦР) проводили в финальном объёме реакционной смеси 20 мкл с использованием ДНК-полимеразы GoTaq Flexi (Promega, США) и универсальных праймеров [Universal primers for ... , 1991] с финальной концентрацией каждого 250 нМ, отжиг которых проводили при 56 °С в течение 30 с. Полученные ампликоны электрофоретически отделяли от компонентов реакции в агарозном геле и очищали с помощью набора GenJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Определение нуклеотидных последовательностей ампликонов проводили по методу Сэнгера с использованием набора реагентов для терминирования

BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США).

Таблица

Характеристики точек сбора образцов *A. baicalensis* на северном макросклоне хр. Хамар-Дабан

Обозначение популяции	Место сбора	Координаты	Абсолютная высота (м над у. м.)
BZ	р. Безымянная	N51.59352°, E103.90825°	482
S1	р. Снежная	N51.37372°, E104.64567°	499
S2	р. Тальцинка (бассейн р. Снежная)	N51.35611°, E104.61691°	922
M1	р. Бол. Мамай, точка 1	N51.43532°, E104.79750°	517
M2	р. Бол. Мамай, точка 2	N51.38947°, E104.85219°	954
V	р. Выдриная	N51.48558°, E104.84890°	458
BR	р. Большая Речка	N51.95788°, E106.35214°	469

Ручную корректировку полученных нуклеотидных последовательностей проводили в SnapGene Viewer v.2.6.2. Маркирование участков генов *trnL* и *trnF* и межгенного спейсера проводили с использованием аннотированной последовательности *A. narcissiflora* L. (GenBank: AB219591.1). В качестве референтной также использовали последовательность *trnL-trnF* близкородственного вида *A. flaccida* (GenBank: LC435034.1). Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма MUSCLE при стандартных настройках и дальнейшей ручной корректировки в MEGA v. 7.0.16 [Kumar, Stecher, Tamura, 2016]. Для дальнейшего анализа использовали фрагмент выравнивания, соответствующий межгенному спейсеру *trnL-trnF* референтного вида *A. narcissiflora* на участке от 33 до 376 п. о. включительно. Таким образом, общая длина выравнивания (с учётом участков инсерций/делеций), используемая для построения филогенетической реконструкции, составила 366 п. о. Делеции/инсерции рассматривались как отдельные эволюционные события, которые для каждой последовательности были закодированы как «1» (наличие делеции) и «0» (отсутствие делеции) и включены в конец нуклеотидного выравнивания. В общей сложности в виде бинарной матрицы были закодированы 12 участков выравнивания (позиции выравнивания: 13, 14, 15, 16, 25, 144–147, 160–163, 178, 197–208, 274–281, 282–291, 292–304). Филогенетическую реконструкцию проводили байесовским методом (Bayesian inference, BI) на основе метода Монте-Карло для марковских цепей с использованием общей реверсионной модели (general time reversible model, GTR) для нуклеотидных последовательностей и модели F81 [Felsenstein, 1981] для бинарных данных (делеции/инсерции) в MrBayes v. 3.2.5 и методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) с использованием 3-параметрической модели Тамуры [Tamura, 1992] в MEGA. Оценку достоверности ML-филогении проводили с использованием bootstrap-метода при 1000 повторений. Байесовскую реконструкцию проводили при 1 000 000 генераций четырёх мар-

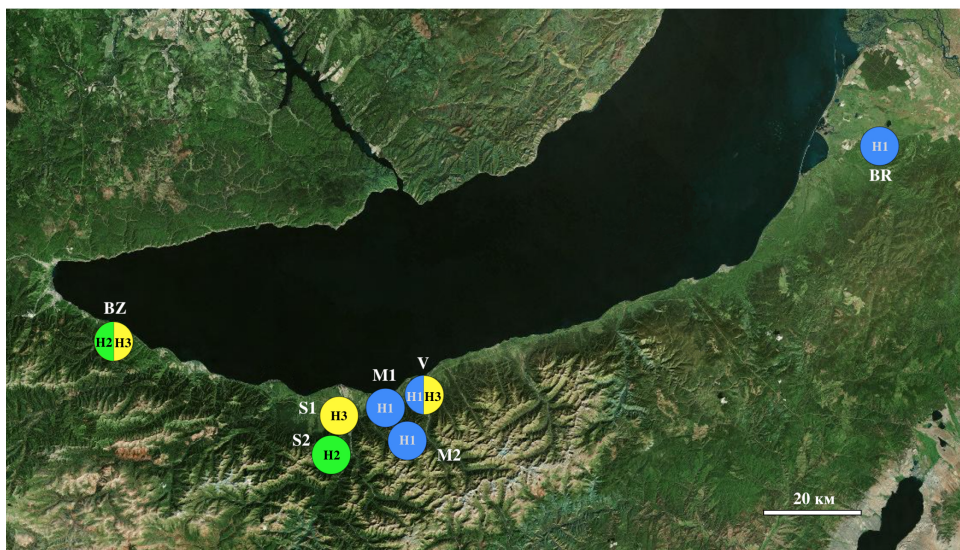
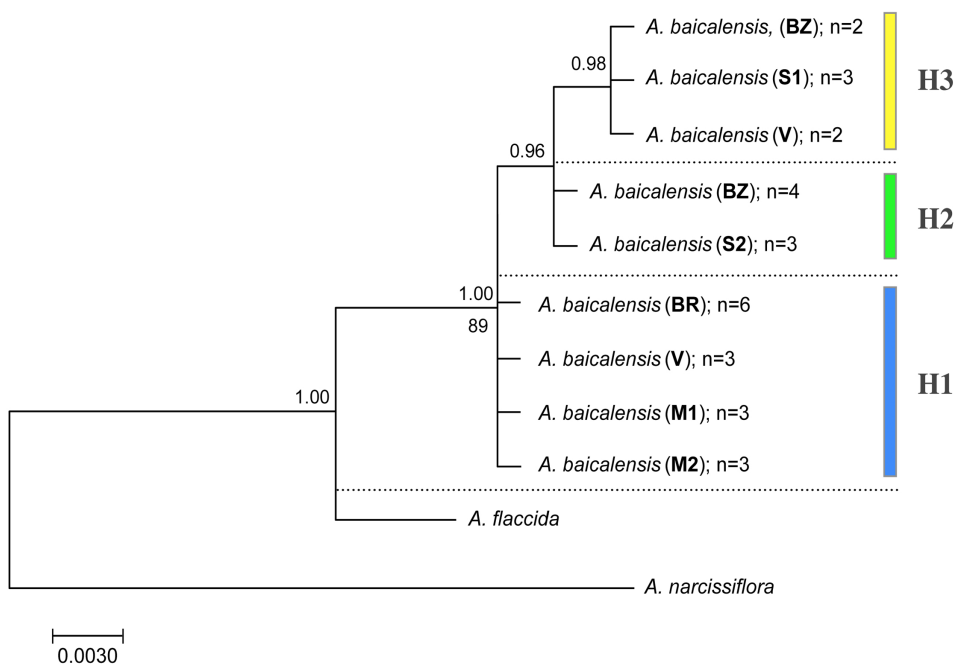


Рис. 2. Разнообразие гаплотипов *trnL-trnF* и их филогенетический анализ у популяции *A. baicalensis* на хр. Хамар-Дабан. *A* – консенсусное (50%) филогенетическое дерево гаплотипов, построенное с использованием байесовского анализа. Длина ветвей приведена в относительных единицах. Значения апостериорной вероятности указаны над ветвями; значения bootstrap-поддержки соответствующих узлов на ML-дереве указаны под ветвями; *B* – географическое распределение гаплотипов вдоль северного макросклона хр. Хамар-Дабан. Обозначения популяций приведены как в таблице: BZ – р. Безымянная; BR – р. Большая Речка; M1 – р. Бол. Мамай, точка 1; M2 – р. Бол. Мамай, точка 2; S1 – р. Снежная; S2 – р. Тальцинка (бассейн р. Снежная); V – р. Выдриная

Зона вторичного контакта и перекрытия ареалов популяций из разных филогеографических групп, образовавшаяся после наступления благоприятных условий, приходится на участок от р. Бол. Мамай до р. Выдриная, на котором встречаются популяции как с восточным (Н1), так и с западным (Н3) вариантами гаплотипов. Однако нельзя исключать, что зона перекрытия в действительности имеет более широкую протяжённость и по меньшей мере на западе может достигать правого берега Снежной. На участке контакта можно также ожидать образование гибридной зоны между разными филогеографическими группами. В то же время, поскольку в работе был использован маркер пластидной ДНК, наследуемый только по материнской линии, на основе имеющихся данных пока сложно установить точную гибридационную картину на этом участке.

Следует также принять во внимание, что большинство проанализированных нами образцов собраны в предгорной шлейфовой полосе, где между популяциями из соседних речных пойм встречаются довольно широкие дизъюнкции на невысоких водоразделах, таким образом они остаются относительно изолированными друг от друга. Перекрытие ареалов популяций наблюдается только в районе выраженного сводового поднятия вплоть до субальпийского пояса, где популяции достаточно часто образуют сплошной пояс на склонах различной экспозиции, прерываясь только на их перегибах (Чепинога, Протопопова, Павличенко, неопубл.). По всей видимости, именно в этой области и имеет место основной поток генов между популяциями.

Таким образом, включение в анализ дополнительных сборов из областей средних и больших высот поможет детализировать картину географического распределения гаплотипов и, возможно, расширить зону контакта между восточной и западной филогеографическими группами. Однако уже сейчас очевидно, что отсутствие общих гаплотипов у особей из дистально расположенных популяций даже в области низких высот указывает на их частичную генетическую изоляцию относительно друг от друга. Разделение популяций на восточную и западную филогеографические группы также согласуется с нашими предварительными результатами о полиморфизме региона ядерной ДНК ITS1-ITS2 [Использование генетических маркеров ... , 2015].

Наличие дифференцированных филогеографических групп *A. baicalensis* свидетельствует о частичной фрагментации ареала вида в периоды критического похолодания и сохранения популяций в микрорефугиумах [Cherpinoga, Protopopova, Pavlichenko, 2017]. Судить о длительности возникшей изоляции между группами на основе имеющихся данных пока не представляется возможным, однако это событие не могло произойти позднее максимума последнего оледенения. Вероятней всего, фрагментация происходила неоднократно и усиливалась в периоды похолоданий. В межледниковье локальные популяции реколонизировали участки дизъюнкций, соединяясь с популяциями из соседних микрорефугиумов. Несмотря на то что в настоящее время ареал *A. baicalensis* вдоль хр. Хамар-Дабан является относительно непрерывным [Новые данные о ... , 2015; Cherpinoga, Protopopova, Pavlichenko, 2017], времени с момента окончания последнего оледенения, очевидно, оказалось недостаточно для генетической гомогенизации популяций.

Наличие общего гаплотипа (H1) и одинакового уровня ploидности [IAPT chromosome ... , 2018; IAPT/IOPV chromosome ... , 2016, 2017] у популяций *A. baicalensis* из крайнего восточного места нахождения (р. Большая Речка) и условно центрального (р. Бол. Мамай – р. Выдриная) участков ареала показывает, что географическая изолированность первых имеет относительный характер. Большая часть известных местонахождений вида на хр. Хамар-Дабан находится в легкодоступных местах в низовьях рек вдоль автодороги Р-258 [Новые данные ... , 2015]. Так, дизъюнкция ареала вида на участке от р. Мантуриха до р. Большая Речка была выявлена только в низовьях, где находится заболоченный предгорный участок, непригодный для произрастания вида. Очевидно, ввиду труднодоступности верховий рек поиски популяций *A. baicalensis* на этом участке ранее не проводились. Отсутствие же генетической изоляции между популяциями *A. baicalensis* с р. Большая Речка и её основным ареалом подтверждает наше предположение, что предгорные фрагменты ареала могут объединяться в единую область обитания в поясе горной тайги и субальпийского пояса [Cherpinoga, Protopopova, Pavlichenko, 2017].

Заключение

Выявлены три гаплотипа *trnL-trnF* пластидной ДНК у популяций *A. baicalensis* с северного макросклона хр. Хамар-Дабан. Первый гаплотип характерен для популяций из восточного участка ареала, два других – из западного. Распределение гаплотипов между популяциями указывает на наличие по меньшей мере двух филогеографических групп *A. baicalensis* на хр. Хамар-Дабан, которые, наиболее вероятно, возникли в результате фрагментации ареала вида в результате плейстоценовых похолоданий. Зона вторичного контакта популяций из разных филогеографических групп, образовавшаяся после наступления благоприятных условий, распространяется на участок от р. Бол. Мамай до р. Выдриная, на котором встречаются популяции как с «восточным», так и с «западным» вариантами гаплотипов. Наличие общего гаплотипа у популяций с восточного предела ареала (р. Большая Речка) и популяций из центрального участка ареала позволяет предположить, что географическая изолированность восточных популяций носит относительный характер и они могут соединяться с основным ареалом в поясе горной тайги и субальпийского пояса.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию; ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН и А. В. Верховину за помощь в сборе образцов с р. Выдриная и предоставленную возможность работы с гербарными образцами. В 2017–2018 гг. исследования выполнялись при частичной поддержке проекта РНФ № 17-74-10074.

Список литературы

- Ивановский Л. Н. Псевдолодниковые формы рельефа в долине р. Выдриной (Южное Прибайкалье) // География и природные ресурсы. 2006. № 4. С. 161–167.
- Ильин М. М. Третичные реликтовые элементы в таежной флоре Сибири и их возможное происхождение // Материалы по истории флоры и растительности СССР. Вып. 1. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1941. С. 257–292.
- Использование генетических маркеров для оценки состояния реликтовых видов растений Байкальской Сибири / М. В. Протопопова, В. В. Павличенко, А. А. Гнутиков, Р. В. Адельшин, В. В. Чепинога // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. 2015. № 4. С. 28–36.
- Красная книга Красноярского края. Т. 2. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений и грибов / Н. В. Степанов [и др.]. Красноярск : Сиб. федер. ун-т., 2012. 576 с.
- Красная книга Республики Бурятия: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов / Р. Ю. Абашеев [и др.]. Улан-Удэ : Изд-во БНЦ СО РАН, 2013. 688 с.
- Новые данные о распространении некоторых неморальных реликтовых растений в предгорьях хребта Хамар-Дабан (Южное Прибайкалье) / В. В. Чепинога, А. В. Мишина, М. В. Протопопова, В. В. Павличенко, С. О. Быстров, М. А. Вилор // Ботан. журн. 2015. Т. 100, № 5. С. 478–489.
- Перспективы использования внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) для идентификации редких видов растений на примере рода *Waldsteinia* (Rosaceae) / М. В. Протопопова, В. В. Павличенко, А. Д. Коновалов, Е. Д. Золотовская, Э. М. Байрамова, В. В. Чепинога // Изв. Иркут. гос. ун-та. Серия «Биология. Экология». 2016. Т. 17. С. 5–11.
- Положий А. В., Крапивкина Э. Д. Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири. Томск : Изд-во Том. гос. ун-та, 1985. 158 с.
- Растительность Прибайкалья как индикатор глобальных и региональных изменений природных условий северной Азии в позднем кайнозое / А. В. Белов, Е. В. Безрукова, Л. П. Соколова, А. А. Абзаева, П. П. Летунова, Е. Э. Фишер, Л. А. Орлова // Геогр. и природ. ресурсы. 2006. № 3. С. 5–18.
- Реликтовые комплексы растительности современных рефугиумов северо-восточной Азии / П. В. Крестов, В. Ю. Баркалов, А. М. Омелько, В. В. Якубов, Ю. Накамура, К. Сато // Комаровские чтения. 2009. Т. 56. С. 5–63.
- Chepinoga V. V., Protopopova M. V., Pavlichenko V. V. Detection of the most probable pleistocene microrefugia on the northern macroslope of the Khamar-Daban Ridge (Southern Prebaikalia) // Contemporary Problems of Ecology. 2017. Vol. 10, N 1. P. 38–42. <https://doi.org/10.1134/S1995425517010036>
- DNA barcoding of *Waldsteinia* Willd. (Rosaceae) species based on ITS and *trnH-psbA* nucleotide sequences / M. Protopopova, V. Pavlichenko, A. Gnutikov, V. Chepinoga // Information Technologies in the Research of Biodiversity. Springer Proceedings in Earth and Environmental Sciences. Cham : Springer Nature Switzerland, 2019. P. 107–115. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11720-7_15
- Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. Vol. 19. P. 11–15.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // J. Mol. Evol. 1981. Vol. 17, N 6. P. 368–376.
- IAPT chromosome data 28 / A. A. Gnutikov, M. V. Protopopova, V. V. Pavlichenko, V. V. Chepinoga // Taxon. 2018. Vol. 67, N 6. P. 1236–1237. <https://doi.org/10.12705/676.39>
- IAPT/IOPB chromosome data 22 / A. A. Gnutikov, M. V. Protopopova, V. V. Pavlichenko, V. V. Chepinoga // Taxon. 2016. Vol. 65, N 5. P. 1200–1207. <http://dx.doi.org/10.12705/655.40>

IAPT/IOPB chromosome data 26 / A. A. Gnutikov, M. V. Protopopova, V. V. Chepinoga, A. D. Kononov, E. D. Zolotovskaya, V. V. Pavlichenko // *Taxon*. 2017. Vol. 66, N 6. P. 1488–1489. <https://doi.org/10.12705/666.30>

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. Vol. 33, N 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Mosyakin S. L. Further new combinations in *Anemonastrum* (Ranunculaceae) for Asian and North American taxa // *Phytoneuron*. 2018. Vol. 55. P. 1–11.

Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content bases // *Mol. Biol. Evol.* 1992. Vol. 9. P. 678–687.

Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // P. Taberlet, L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet // *Plant Mol. Biol.* 1991. Vol. 17, N 5. P. 1105–1109.

Phylogeographic Structure of *Anemone baicalensis* (Ranunculaceae) Based on Plastid DNA Polymorphism (*trnL-trnF*) as an Evidence of Pleistocene Microrefugia Existence on the Khamar-Daban Ridge (Southern Baikal Region)

M. V. Protopopova^{1,2}, V. V. Pavlichenko^{1,2}, D. A. Orlova^{1,2},
V. V. Chepinoga^{2,3}

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

³ V. B. Sochava Institute of Geography SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The study presents the results of the modern phylogeographic structure of *Anemone baicalensis* Turcz. on the Khamar-Daban Ridge using *trnL-trnF* plastid DNA marker. Being one of nemoral relict species with the longest ranges along the Khamar-Daban Ridge, *A. baicalensis* is a convenient model species to study the possible isolation of relict species populations in microrefugia during the last Pleistocene glaciation, followed by their recolonization during subsequent climate change. The complete *trnL-trnF* region was amplified using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) and the universal primers for the flank regions of *trnL* and *trnF* plastid DNA genes. Gel-purified amplicons were sequenced by the Sanger method using 3500 Genetic Analyzer. The multiple alignments of nucleotide sequences were prepared by the MUSCLE algorithm followed by manual editing. The indels were considered as evolutionary events and included as a separate binary data partition to the end of matrix. Phylogenetic reconstructions were performed by both the maximum likelihood and Bayesian inference methods. Three *trnL-trnF* haplotypes were revealed in *A. baicalensis* populations on the Khamar-Daban Ridge. The first haplotype was typical for the populations from the eastern part of the range, two others – for populations from the western part. The haplotypes found in the populations from the western part of the range formed a well-supported haplogroup according Bayesian inference analysis. The described phylogeographic patterns confirm the partial fragmentation of *A. baicalensis* range and preservation of populations in microrefugia on the Khamar-Daban Ridge during the latest Pleistocene cooling. The zone of secondary contact and possible hybridization of the populations from the different phylogeographic groups appeared after the onset of favorable conditions is located on the site between the Bolshoi Mamai and Vydrinaya rivers, where both ‘eastern’ and ‘western’ haplotype variants were revealed. The presence of a common haplotype in populations in the eastern border (the Bolshaya Rechka river) and the central part of the range suggests that the geographical isolation of eastern populations is cur-

rently not absolute and they can contact with the main part of the range in mountain taiga and subalpine zones.

Keywords: nemoral relict, refugium, glaciation, molecular genetic markers, techniques of molecular biology, *trnL-trnF*, *Anemone baicalensis*.

For citation: Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Orlova D.A., Chepinoga V.V. Phylogeographic Structure of *Anemone baicalensis* (Ranunculaceae) Based on Plastid DNA Polymorphism (*trnL-trnF*) as an Evidence of Pleistocene Microrefugia Existence on the Khamar-Daban Ridge (Southern Baikal Region). *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2019, vol. 30, pp. 3-15. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.3> (in Russian)

References

Ivanovsky L.N. Psevdolednikovye formy rel'efa v doline r. Vydrinoi [Pseudo-glacial landforms in the valley of the Vydrina river (Southern Baikal region)]. *Geography and natural resources*, 2006, no. 4, pp. 161-167. (in Russian)

Ilijin M.M. Tretichnye reliktovye elementy v taezhnoi flore Sibiri i ikh vozmozhnoe proiskhozhdenie [The Tertiary relict elements in the Siberian Taiga flora and their possible origin]. *Materialy po istorii flory i rastitel'nosti SSSR* [Materials on the history of the flora and vegetation of the USSR], is. 1. Moscow-St.-Petersb., AS USSR Publ., 1941, pp. 257-292. (in Russian)

Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Gnutikov A.A., Adelshin R.V., Chepinoga V.V. Ispol'zovanie geneticheskikh markerov dlya otsenki sostoyaniya reliktovykh vidov rastenii Baikal'skoi Sibiri [Application of genetic markers for ecological status assessment of the relict plant species of Baikal Siberia]. *Bull. RUDN Univ. Series Ecology and life safety*, 2015, no. 4, pp. 28-36. (in Russian)

Krasnaya kniga Krasnoyarskogo kraja. Redkie i nakhodyashchiesya pod ugrozoi ischeznoventiya vidy dikorastushchikh rastenii i gribov [Red Book of the Krasnoyarsk territory. The Rare and Endangered Species of Wild Plants and Fungi]. Krasnoyarsk, Siberian Fed. Univ. Publ., 2012, 576 p. (in Russian)

Krasnaya kniga Respubliki Buryatiya: redkie i nakhodyashchiesya pod ugrozoi ischeznoventiya vidy zhivotnykh, rastenii i gribov [Red Data Book of Republic of Buryatia: Rare and Endangered Species of Animals, Plants and Fungi]. Ulan-Ude, Buryat SC SB RAS Publ., 2013, 688 p. (in Russian)

Chepinoga V.V., Mishina A.V., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Bystrov S.O., Vilor M.A. Novye dannye o rasprostraneniі nekotorykh nemoral'nykh reliktovykh rastenii v predgor'yakh khrehta Khamar-Daban (Yuzhnoe Pribaikal'e) [New data on distribution of several nemoral relict plant species on the foothills of the Khamar-Daban ridge (Southern Baikal)]. *Botanicheskii Zhurnal*, 2015, vol. 100, no. 5, pp. 478-489. (in Russian)

Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Kononov A.D., Zolotovskaya E.D., Bairamova E.M., Chepinoga V.V. Perspektivy ispol'zovaniya vnutrennikh transkribiruemykh speiserov (ITS1 i ITS2) dlya identifikatsii redkikh vidov rastenii na primere roda *Waldsteinia* (Rosaceae) [Perspectives for the Internal Transcribed Spacer (ITS1 and ITS2) application for the endangered plant species identification with *Waldsteinia* (Rosaceae) as an example]. *Bull. Irkutsk St. Univ. Series Biology. Ecology*, 2016, vol. 17, pp. 5-11. (in Russian)

Polozhii A.V., Krapivkina E.D. *Relikty tretichnykh shirokolistvennykh lesov vo flore Sibiri* [Relicts of Tertiary Broad-Leaved Forests in Siberian Flora]. Tomsk, Tomsk St. Univ. Publ., 1985, 158 p. (in Russian)

Belov A.V., Bezrukova E.V., Sokolova L.P., Abzayeva A.A., Letunova P.P., Fisher E.E., Orlova L.A. Rastitelnost Pribaikal'ya kak indikator global'nykh i regionalnykh izmenenii prirodnykh usloviі severnoi Azii v pozdnem kainozoe [Vegetation of the Baikal region as an indicator of global and regional changes in natural conditions of North Asia in the late Cainozoic]. *Geography and Natural Resources*, 2006, no. 6, pp. 5-18. (in Russian)

Krestov P.V., Barkalov V.Y., Omelko A.M., Yakubov V.V., Nakamura Y., Sato K. Reliktovye komplekсы rastitel'nosti sovremennykh refugiumov severo-vostochnoi Azii [Relic vegetation complexes in the modern refugia of Northeast Asia]. *Komarovskie Chtenia* [V.L. Komarov Memorial Lectures], 2009, vol. 56, pp. 5-63.

Chepinoga V.V., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V. Detection of the most probable pleistocene microrefugia on the northern macroslope of the Khamar-Daban Ridge (Southern Prebaikalia). *Contemporary Problems of Ecology*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 38-42. <https://doi.org/10.1134/S1995425517010036>

Protopopova M., Pavlichenko V., Gnutikov A., Chepinoga V. DNA barcoding of Waldsteinia Willd. (Rosaceae) species based on ITS and trnH-psbA nucleotide sequences. *Information Technologies in the Research of Biodiversity. Springer Proc. Earth Environ. Sci.*, Springer Nature Switzerland, 2019, pp. 107-115. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11720-7_15

Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, vol. 19, pp. 11-15.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 1981, vol. 17, no. 6, pp. 368-376.

Gnutikov A.A., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Chepinoga V.V. IAPT chromosome data 28. *Taxon*, 2018, vol. 67, no. 6, pp. 1236-1237. <https://doi.org/10.12705/676.39>

Gnutikov A.A., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Chepinoga V.V. IAPT/IOPB chromosome data 22. *Taxon*, 2016, vol. 65, no. 5, pp. 1201. <http://dx.doi.org/10.12705/655.40>

Gnutikov A.A., Protopopova M.V., Chepinoga V.V., Konovalov A.D., Zolotovskaya E.D., Pavlichenko V.V. IAPT/IOPB chromosome data 26. *Taxon*, 2017, vol. 66, no. 6, pp. 1488-1489. <https://doi.org/10.12705/666.30>

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Mosyakin S.L. Further new combinations in Anemonastrum (Ranunculaceae) for Asian and North American taxa. *Phytoneuron*, 2018, vol. 55, pp. 1-11.

Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content bases. *Mol. Biol. Evol.*, 1992, vol. 9, pp. 678-687.

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 1991, vol. 17, no. 5, pp. 1105-1109.

Протопопова Марина Владимировна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
доцент
Иркутский государственный университет
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Protopopova Marina Vladimirovna
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
Associate Professor
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Павличенко Василий Валерьевич
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН

Pavlichenko Vasily Valeryevich
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS

*Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
доцент
Иркутский государственный университет
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
e-mail: vpravlichenko@gmail.com*

*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
Associate Professor
Irkutsk State University
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: vpavlichenko@gmail.com*

*Орлова Дарья Алексеевна
студент
Иркутский государственный университет
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
инженер
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132*

*Orlova Daria Alekseevna
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
Engineer
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation*

*Чепинога Виктор Владимирович
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Институт географии им В. Б. Сочавы СО
РАН
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Улан-Баторская, 1
профессор
Иркутский государственный университет
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
e-mail: victor.chepinoga@gmail.com*

*Chepinoga Victor Vladimirovich
Doctor of Sciences (Biology),
Leading Research Scientist
V. B. Sochava Institute of Geography SB
RAS
1, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
Professor
Irkutsk State University
1. K. Marx st., Irkutsk, 664003,
Russian Federation
e-mail: victor.chepinoga@gmail.com*