

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ РОДА *Astragalus* L.
СЕКЦИИ *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) В АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ
ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ *trnL–trnF* ХЛОРОПЛАСТНОЙ
ДНК И ИЗОФЕРМЕНТНЫХ МАРКЕРОВ

© 2022 г. О. С. Корчагина¹, *, Д. А. Кривенко², **, А. Ю. Беляев³

¹Сахалинский филиал ботанического сада-института Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Южно-Сахалинск, 693023 Россия

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения
Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

³Институт экологии растений и животных Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

*e-mail: dymshakova@rambler.ru

**e-mail: krivenko.irk@gmail.com

Поступила в редакцию 24.03.2021 г.

После доработки 14.07.2021 г.

Принята к публикации 09.08.2021 г.

Изучено генетическое разнообразие и филогенетические связи четырех видов рода *Astragalus* секции *Cenantrum*: *A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus* в азиатской части России по данным изменчивости *trnL–trnF* хпДНК и изоферментных маркеров. Для каждого вида выявлены специфичные наборы хлоропластных гаплотипов, аллелей и частот изоферментов. По данным хпДНК изученные популяции характеризуются низким гаплотипическим (h изменяется от 0.095 до 0.333) и нуклеотидным (π изменяется от 0.00019 до 0.00378) разнообразием. Большинство популяций (20 из 27) были мономорфными. По данным аллозимного анализа показатели полиморфизма для трех видов (исключение составляет мономорфная популяция *A. penduliflorus*) имеют довольно высокие значения. Для вида в среднем полиморфность (P_{95}) варьирует от 55.5 до 85.5%, число аллелей на локус (A) — от 1.8 до 2.7, наблюдаемая гетерозиготность (H_o) — от 0.134 до 0.215. Географическая приуроченность гаплотипов и полиморфные популяции *A. frigidus* и *A. mongholicus* выявлены на Алтае и в Байкальской Сибири. Эти местонахождения располагаются, вероятно, на месте пересечения миграционных путей или рефугиумов.

Ключевые слова: *Astragalus*, *Cenantrum*, хпДНК, изоферментный анализ, полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675822010052

Род *Astragalus* L. — крупнейший не только в семействе Fabaceae, но и среди покрытосеменных растений, насчитывает около 2900 видов, из которых в Старом Свете встречаются более 2400 видов, в Новом Свете — около 500 видов [1, 2]. В системе рода выделяют два подрода: *Astragalus* — растения, опушенные простыми волосками, и *Cercidothrix* Bunge — в опушении растений присутствуют как простые, так и двуконечные (мальпигиевые) волоски [3], и примерно 200 секций [1].

Секция *Cenantrum* Bunge относится к типовому подроду *Astragalus*. Она характеризуется примитивностью морфологических признаков: многолетние поликарпические растения с ассимилирующими (листовыми) прилистниками, парноперистыми черешковыми листьями, многоцветковыми кистевидными соцветиями, желтыми цветками и одно-

гнездными бобами, — занимая, таким образом, базальное положение в системе рода [3, 4]. Эта секция объединяет в своем составе около 40 видов, обитающих преимущественно в Азии, с центром биоразнообразия в восточной ее части (Корейский полуостров, Японские острова, восточная часть Китая). На территории России, в том числе ее азиатской части, известно восемь видов секции *Cenantrum* [5, 6].

В настоящее исследование включены четыре вида: *A. frigidus* (L.) A. Gray — европейско-североазиатский вид, *A. mongholicus* Bunge — вид с ареалом на юге Сибири и Дальнего Востока (Россия, Китай, Япония), северной части Центральной Азии (Казахстан, Монголия), *A. penduliflorus* Lam. — северо- и центральноевропейский вид с единственным местонахождением на Среднем Урале и

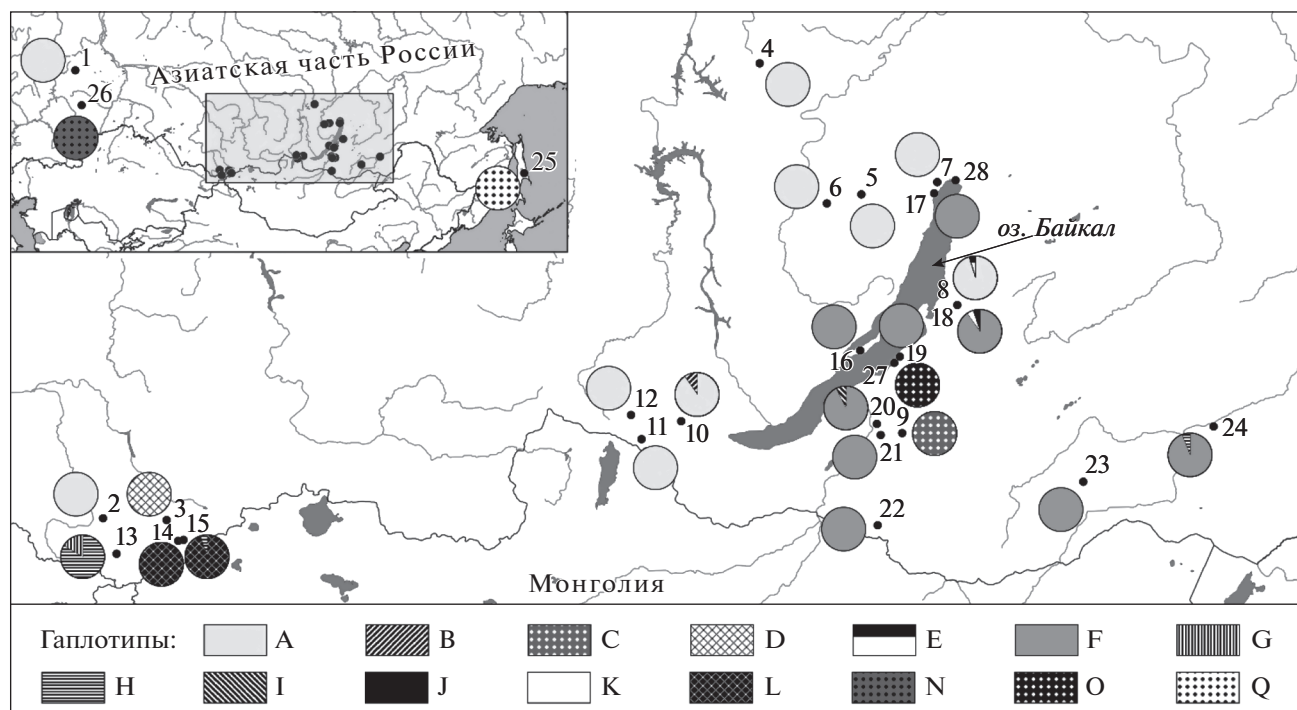


Рис. 1. Географическое распределение выявленных 15 гаплотипов хпДНК для 27 исследованных популяций четырех видов *Astragalus* секции *Cenantrum*.

A. sericeocanus Gontsch. — эндемик побережий оз. Байкал, внесен в Красную книгу Республики Бурятия, с присвоением третьей (NT) категории статуса редкости — редкий вид [7]. Трактовка видов и объем секции *Cenantrum* приняты нами в соответствии с последней монографической обработкой рода *Astragalus* Старого Света [5].

С точки зрения современной систематики, в частности для рода *Astragalus*, необходимо привлекать молекулярно-генетические исследования (полиморфизм изоферментов и хлоропластной ДНК (хпДНК)), также они необходимы для познания эволюционной истории, организации охраны генофонда редких и эндемичных видов, идентификации сырья лекарственных растений [8–11].

Цель настоящего исследования — охарактеризовать генетическое разнообразие, структуру популяций и степень генетического родства четырех видов рода *Astragalus* секции *Cenantrum* (*A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus*) азиатской части России по данным анализов изменчивости изоферментов и хпДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для изучения изменчивости хпДНК были 437 растений, для изоферментного анализа — 291. Географическое положение исследованных популяций видов рода *Astragalus* секции *Cenantrum* представлено на рис. 1 и в табл. 1.

Геномная ДНК экстрагирована СТАВ-методом [12] из проростков или высушенных в силикагеле листьев. Для амплификации и секвенирования фрагмента *trnL–trnF* хпДНК использованы праймеры “с” и “d” [13]. Реакцию ПЦР проводили согласно протоколу, описанному в работе Е.В. Хантемировой с соавт. [14]. Секвенирование ПЦР-продукта проведено в обоих направлениях при условиях, описанных J. Shaw et al. [15], с использованием набора BigDye v 3.1 на генетическом анализаторе 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности отредактировали в программе BioEdit v 7.0.5.3 [16].

Для анализа популяционной изменчивости был проведен рестриктивный анализ с ферментом *TaqI*, согласно протоколу производителя. При наличии делеций разной длины, а также точечных замен, при которых появлялся/исчезал сайт рестрикции, на электрофореграмме присутствовали фрагменты разной длины или отсутствовали совсем. Для визуализации рестриктивных продуктов использовали электрофорез в вертикальной камере S2 (Life Technologies) в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле и серебряное окрашивание [17]. По совокупности фрагментов разной длины нуклеотидные последовательности относили к тому или иному гаплотипу.

Для выявления генеалогических связей между гаплотипами был использован метод Median-Joining (MJ, программа Network 5.0.1.1 [18]) как

Таблица 1. Генетический полиморфизм у видов *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным хлДНК

Популяция	Координаты		№ ваучера	<i>nH</i>	<i>h</i>	π
	с.ш.	в.д.				
<i>A. frigidus</i>						
1. Ивдель	60°46'	60°15'	IRK36800	27 A	—	—
2. Белый Бом	50°18'	86°58'	IRK36495	14 A	—	—
3. Саратам	50°16'	88°41'	IRK45181	7 D	—	—
4. Игирма	57°30'	104°33'	IRK24685	17 A	—	—
5. Харахикта	55°33'	107°16'	IRK55549	26 A	—	—
6. Орлингга	55°25'	106°20'	IRK46601	20 A	—	—
7. Тья	55°45'	109°18'	IRK45554	17 A	—	—
8. Улюн-1	53°50'	109°50'	IRK45537	20 A, 1 E	0.095 (0.084)	0.00034
9. Челутай	51°45'	108°21'	IRK55479	3 C	—	—
10. Охор-Шибирь	51°56'	102°26'	IRK32809	9 A, 1 B	0.200 (0.154)	—
11. Мойготы	51°39'	101°23'	IRK29595	15 A	—	—
12. Китой	52°03'	101°06'	IRK16611	16 A	—	—
Общие показатели для вида				181 A, 1 B, 3 C, 7 D, 1 E	0.120 (0.032)	0.00022
<i>A. mongholicus</i>						
13. Джазатор	49°41'	87°20'	IRK39812	1 G, 5 H	0.333 (0.215)	0.00060
14. Кокоря	49°54'	88°59'	IRK39813	12 L	—	—
15. Чуйская степь	49°55'	89°08'	IRK32832	18 L, 1 H	0.105 (0.092)	0.00019
16. Шара-Нур	53°06'	107°14'	IRK28971	24 F	—	—
17. Северобайкальск	55°34'	109°13'	IRK23043	10 F	—	—
18. Улюн-2	53°50'	109°50'	IRK55583	16 F, 1 J, 1 K	0.216 (0.124)	0.00378
19. Горячинск	53°00'	108°18'	IRK32252	24 F	—	—
20. Улан-Удэ	51°54'	107°41'	IRK41767	25 F, 2 I	0.143 (0.086)	0.00077
21. Николаевский	51°43'	107°47'	IRK32253	16 F	—	—
22. Малая Кудара	50°11'	107°42'	IRK39814	5 F	—	—
23. Ара-Иля	50°55'	113°12'	IRK16604	20 F	—	—
24. Калиновка	51°51'	116°41'	IRK23897	15 F, 1 H	0.125 (0.106)	0.00023
25. Известковый	49°57'	143°22'	VLA197661	6 Q	—	—
Общие показатели для вида				155 F, 1 G, 7 H, 2 I, 1 J, 1 K, 30 L, 6 Q	0.395 (0.040)	0.00102
<i>A. penduliflorus</i>						
26. Голендухино	57°27'	61°25'	IRK32794	20 N	—	—
<i>A. sericeocanus</i>						
27. Турка	52°54'	108°09'	IRK 23490	21 O	—	—

Примечание. *nH* – число гаплотипов в популяции; *h* – гаплотипическое разнообразие, в скобках – стандартное отклонение; π – нуклеотидное разнообразие.

наиболее подходящий для исследований на внутривидовом уровне и в группах близкородственных видов. Каждую делецию, вставку или замену кодировали как единичное мутационное событие, обозначая 1/0 как присутствующие/отсутствующие соответственно.

Популяционно-генетический анализ выполнен в программах Arlequin v 3.5 [19] и DnaSP v 6.12.03 [20]. Были рассчитаны следующие параметры: число гаплотипов (*nH*), гаплотипическое разнообразие (*h*), нуклеотидное разнообразие (π), генный поток (N_m) и дивергенция нуклеотидных по-

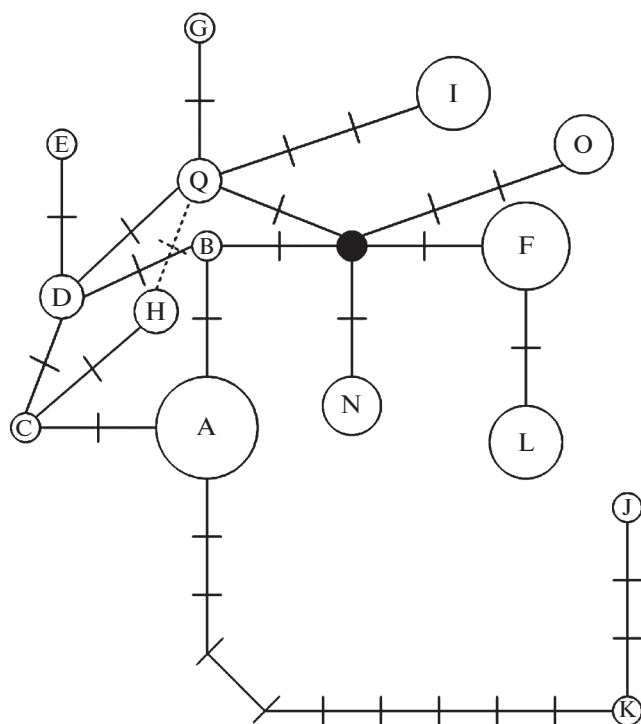


Рис. 2. Филогенетическая сеть гаплотипов хпДНК. Размер кружка соответствует частоте встречаемости гаплотипа, поперечные штрихи на связывающих линиях соответствуют количеству мутационных событий. Черный кружок – предполагаемый промежуточный гаплотип.

следовательностей (D_{xy}). С помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA, Arlequin v 3.5) оценивали распределение генетической изменчивости между популяциями и между видами.

Для определения филогенетической структуры сравнивали индексы N_{ST} и G_{ST} в программе Permut v 2.0 [21], где показатель G_{ST} отражает только частоту гаплотипов в популяции, тогда как N_{ST} учитывает родство гаплотипов, а филогенетическая структура определяется при N_{ST} значимо ($p < 0.05$) больше, чем G_{ST} [22].

Для реконструкции демографической истории исследуемых популяций использовали показатели отклонения от стандартной нейтральной модели эволюции: тесты F. Tajima (D) [23] и Y.-X. Fu (F_s) [24]. Для выявления популяционно-генетических изменений во времени применяли анализ распределения парных различий (Arlequin v 3.5), связывающий число различий между гаплотипами с их частотой, используя значения суммы квадратов отклонений (SSD) между наблюдаемым и ожидаемым значениями распределения и индекс r как тест на уровень значимости. Доверительный 95%-ный интервал демографических параметров оценивали при 1000 повторях.

Протокол для исследования изменчивости изоферментов представлен в нашей ранней работе [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ изменчивости хпДНК

Для 437 образцов четырех видов рода *Astragalus* получены нуклеотидные последовательности части фрагмента некодирующей области *trnL-trnF* (554–563 пн). В сиквенсах этого региона выявлены 24 полиморфных сайта, из них 11 информативны согласно методу максимальной экономии. На основе полученных данных выявлено 15 гаплотипов (A–Q), последовательности которых депонированы в GenBank под номерами доступа MW594292–MW594306.

Для каждого вида характерен специфичный набор гаплотипов (рис. 1, табл. 1), а их генеалогические связи представлены на рис. 2. Наиболее часто встречающийся гаплотип для *A. frigidus* – A (выявлен у 93.8% образцов), гаплотипы C и D обнаружены у 1.6 и 3.6% растений соответственно, гаплотипы B и E – единичные (менее 1%). Часто встречающийся гаплотип для *A. mongholicus* – F (обнаружен у 76.4% образцов), алтайский гаплотип L выявлен у 14.8% растений, гаплотипы H и Q обнаружены у 3.5 и 3.0% образцов соответственно, остальные гаплотипы – менее 1%. Для *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus* характерны специфичные гаплотипы N и O соответственно. На популяционном уровне показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия были низкими, для *A. mongholicus* показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия выше, чем для *A. frigidus* (табл. 1). Генетические взаимоотношения гаплотипов остались неясными из-за наличия в медианной сети альтернативных связей, свидетельствующих о гомоплазии (рис. 2).

Согласно результатам AMOVA, у *A. frigidus* и *A. mongholicus* основная доля всей генетической изменчивости приходится на межвидовые различия – 84.17% ($p < 0.01$), между популяциями внутри видов и внутри популяций доля генетической изменчивости составляет 9.82 и 6.01% соответственно ($p < 0.01$).

Дивергенция нуклеотидных последовательностей (D_{xy} , среднее число нуклеотидных замен на один сайт) между популяциями *A. frigidus* составила 0.0002 – между “Улюн-1” и остальными популяциями, 0.0018 – между парами, образованными каждой из популяций “Саратам” и “Челутай” с остальными популяциями. Между остальными популяциями *A. frigidus* D_{xy} отсутствует. Между популяциями *A. mongholicus* показатель D_{xy} варьировал от 0.0000 до 0.0024 (между “Улюн-2” и “Улан Удэ”). В табл. 2 приведены значения дивергенции нуклеотидных последовательностей

Таблица 2. Нуклеотидная дивергенция (среднее число нуклеотидных замен на один сайт) между видами *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным хпДНК

Вид	<i>A. frigidus</i>	<i>A. mongholicus</i>	<i>A. penduliflorus</i>	<i>A. sericeocanus</i>
<i>A. frigidus</i>	—	0.00359	0.00193	0.00550
<i>A. mongholicus</i>		—	0.00201	0.00555
<i>A. penduliflorus</i>			—	0.00361
<i>A. sericeocanus</i>				—

Таблица 3. Значения тестов на нейтральность и анализов несоответствия распределения в популяциях видов *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным хпДНК

Вид, популяции	Тест на нейтральность		Анализ несоответствия распределения				
	<i>D</i>	<i>F_S</i>	τ (CI)	Θ_0 (CI)	Θ_1 (CI)	<i>SSD</i>	<i>r</i>
<i>A. frigidus</i>	-0.960	-3.614*	3.000 (0.445–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.103 (0.000–∞)	0.006	0.709
8. Улюн-1	-1.727*	0.494	3.000 (0.496–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.055 (0.000–∞)	0.013*	0.837
10. Охор-Шибирь	-1.112	-0.339	2.930 (0.000–87.930)	0.900 (0.000–8.387)	3.600 (0.136–∞)	0.331	0.400
<i>A. mongholicus</i>	-1.392*	-0.398	3.439 (0.000–5.918)	0.004 (0.000–0.030)	1.607 (0.190–∞)	0.021	0.098
13. Джазатор	-1.132	0.952	2.982 (0.000–87.982)	0.900 (0.00–6.589)	3.600 (0.292–∞)	0.260	0.667
15. Чуйская степь	-1.861*	1.055	3.000 (0.449–3.000)	0.000 (0.000–0.002)	0.061 (0.000–∞)	0.016	0.823
18. Улюн-2	-1.244	3.547	3.000 (0.467–3.000)	0.000 (0.000–0.005)	0.149 (0.000–∞)	0.042*	0.659
20. Улан-Удэ	-1.192	1.842	3.000 (0.463–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.087 (0.000–∞)	0.030*	0.776
24. Калиновка	-1.696*	0.769	3.000 (0.611–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.076 (0.000–∞)	0.022*	0.797

Примечание. *D* – тест Tajima, *F_S* – тест Fu, τ – время экспансии популяции, Θ_0 и Θ_1 – начальное и конечное значение размера популяции соответственно, *SSD* – сумма квадратов отклонений между наблюдаемым и ожидаемым значениями распределения, *r* – индекс несоответствия, * *p* < 0.05, CI – 95%-ный интервал значимости.

между исследуемыми видами. Наибольшие значения *D_{xy}* определены между парами, образованными каждым из видов *A. frigidus* и *A. mongholicus* с *A. sericeocanus*, наименьшее – между *A. frigidus* и *A. penduliflorus*.

Показатели генетической дифференциации популяций высоки (*G_{ST}* = 0.942; *N_{ST}* = 0.922), значения *N_{ST}* < *G_{ST}*, что указывает на отсутствие филогенетической структуры [21, 22].

Результаты тестов на нейтральность и анализов несоответствия представлены в табл. 3. Значения теста *D* для всех популяций были отрицательными, для *A. frigidus* “Улюн-1”, *A. mongholicus* “Чуйская степь” и “Калиновка” показатели статистически значимы (*p* < 0.05). Показатели теста *F_S*, кроме *A. frigidus* “Охор-Шибирь”, – положительные (*p* > 0.05). Анализ демографических параметров выявил, что все полиморфные популяции находятся в стабильном состоянии (интервалы Θ_0 и Θ_1 перекрываются).

Анализ изменчивости изоферментных маркеров

Значения основных показателей генетического полиморфизма в исследованных популяциях

приведены в табл. 4. Популяция *A. penduliflorus* “Голендухино” является мономорфной. Среднее число аллелей на locus для полиморфных популяций варьирует от 1.3 до 3.0, эффективное число аллелей – от 1.04 до 1.49. Доля полиморфных locusов (*P₉₅*) изменяется от 22.2 до 88.9%. Средняя наблюдаемая гетерозиготность (*H_o*) находится в диапазоне от 0.107 до 0.261 и почти во всех популяциях ниже, чем значения ожидаемой гетерозиготности (*H_e*), варьирующей от 0.115 до 0.331. Отличие значений *H_o* и *H_e* значимое (*p* < 0.05), за исключением четырех популяций *A. frigidus* (“Игирма”, “Орлинг”, “Тыя”, “Харахикта”) и одной популяции *A. mongholicus* (“Николаевский”).

Анализ генетической структуры, выполненный с помощью индексов фиксации Райта, для трех популяций *A. mongholicus* показал, что каждая особь обнаруживает 25.1%-ный дефицит гетерозигот относительно популяции и 29.0%-ный относительно вида в целом. У *A. mongholicus* на межпопуляционную изменчивость приходится 5.2% от выявленной генетической изменчивости и 94.8% – на внутривидовую. Этот же анализ для семи популяций *A. frigidus* показал, что

Таблица 4. Значения показателей генетического полиморфизма в популяциях видов *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным аллозимного анализа

Популяция	N_i	N_j	A	N_e	$P_{95}, \%$	H_o	H_e
<i>A. frigidus</i>							
1. Ивдель	19	19.0 (0.0)	1.3 (0.2)	1.13	22.2	0.111 (0.083)	0.115 (0.080)
2. Игирма	30	30.0 (0.0)	2.2 (0.3)	1.30	77.8	0.200 (0.072)	0.232 (0.071)
5. Харахикта	25	24.0 (1.0)	1.7 (0.3)	1.20	44.4	0.136 (0.065)	0.166 (0.068)
6. Орлинга	16	15.6 (0.3)	1.9 (0.3)	1.21	66.7	0.140 (0.040)	0.175 (0.050)
7. Тья	13	12.4 (0.6)	1.4 (0.2)	1.04	33.3	0.026 (0.018)	0.042 (0.022)
10 Охор-Шибирь	9	8.9 (0.1)	1.9 (0.3)	1.23	55.6	0.123 (0.054)	0.186 (0.069)
11. Мойготы	30	29.3 (0.2)	2.2 (0.2)	1.25	88.9	0.202 (0.072)	0.201 (0.057)
Среднее	20.3	19.9 (0.3)	1.8 (0.3)	1.09	55.5	0.134 (0.058)	0.160 (0.060)
<i>A. mongholicus</i>							
16. Шара-Нур	38	33.2 (0.8)	2.8 (0.4)	1.32	88.9	0.166 (0.043)	0.244 (0.067)
19. Горячинск	20	20.0 (0.0)	3.0 (0.4)	1.49	88.9	0.217 (0.040)	0.331 (0.078)
21. Николаевский	17	16.9 (0.1)	2.3 (0.3)	1.40	77.8	0.261 (0.073)	0.284 (0.077)
Среднее	24.7	23.4 (0.3)	2.7 (0.4)	1.40	85.2	0.215 (0.052)	0.286 (0.074)
<i>A. penduliflorus</i>							
26. Голендухино	18	18.0 (0.0)	1.0 (0.0)	1.00	0.0	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
<i>A. sericeocanus</i>							
27. Турка	37	31.1 (1.2)	2.7 (0.4)	1.38	80.0	0.213 (0.069)	0.274 (0.071)
28. Ярки	26	26.0 (0.0)	2.0 (0.4)	1.20	44.4	0.107 (0.054)	0.169 (0.086)
Среднее	31.5	28.6 (0.6)	2.4 (0.4)	1.29	62.2	0.160 (0.062)	0.222 (0.079)

Примечание. N_i – число исследованных растений, N_j – средний размер выборки на локус, A – среднее число аллелей на локус, N_e – эффективное число аллелей, P_{95} – полиморфизм с учетом 95%-ного критерия, H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность, H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность. В скобках даны значения стандартной ошибки среднего.

каждая особь обнаруживает 10.0%-ный дефицит гетерозигот относительно популяции и 37.0%-ный относительно вида в целом. У *A. frigidus* на межпопуляционную изменчивость приходится 30% от выявленной генетической изменчивости и 70% – на внутривидовую.

Выявлена большая генетическая дистанция ($D_N = 1.08$) между *A. frigidus* и остальными изученными видами (рис. 3). Внутри клады *A. frigidus* выявлены две субклады ($D_N = 0.15$): предбайкальская, объединяющая популяции “Игирма” и “Мойготы”, расположенные на значительном удалении от оз. Байкал, и прибайкальская, объединяющая наиболее приближенные к озеру популяции “Орлинга”, “Тья”, “Харахикта” и “Охор-Шибирь”, а также включающая краевую уральскую популяцию “Ивдель” ($D_N = 0.11$). Внутри субклад значения D_N варьируют от 0.01 до 0.03. Внутри клады *A. mongholicus*–*A. penduliflorus*–*A. sericeocanus* также выявлены две субклады ($D_N = 0.42$): первая объединяет популяции *A. mongholicus* и эндемичный вид *A. sericeocanus*, вторая представлена популяцией *A. penduliflorus*. Следует отметить, что *A. sericeocanus* не образует самостоятельной ветви –

$D_N = 0.07$ между популяцией “Ярки” и популяциями *A. mongholicus*, $D_N = 0.12$ между популяцией “Турка” и остальными популяциями субклады.

ОБСУЖДЕНИЕ

Секция *Cenantrum* – монофилетичная группа, для которой, как и для рода *Astragalus* в целом, интрогрессия и межвидовая гибридизация считаются крайне редкими событиями [9]. Однако, несмотря на это, ее представители характеризуются морфологическим полиморфизмом, имеют обширные ареалы и разнообразный спектр экологических условий обитания.

По результатам анализа изменчивости хпДНК для *A. frigidus* выявлена однородность исследуемых популяций, большая часть которых мономорфна. Полиморфные популяции “Улюн-1” и “Охор-Шибирь” обнаружены в области, близкой к центральной части ареала вида – в Прибайкалье. Анализ показателей демографических данных указывает на то, что они находятся в стабильном состоянии, для последней возможен популяционный рост. Показатели теста на нейтральность для по-

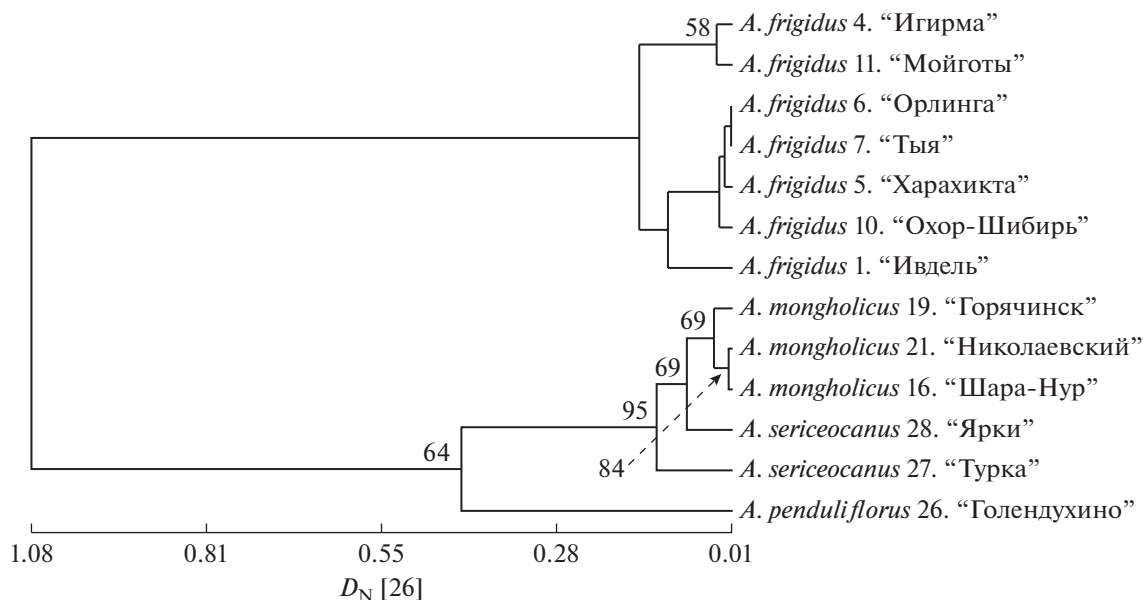


Рис. 3. Дендрограмма сходства популяций видов *Astragalus* секции *Cenanthrum*, построенная на основе генетических дистанций D_N [26]. Цифры в узлах ветвления — значения бутстрепа.

пуляции “Улюн-1” свидетельствуют о наличии распространенных гаплотипов и относительно недавнем прохождении популяции через “бутылочное горлышко”. В пользу последнего свидетельствует ее местонахождение в поврежденном лесу среди валунов на берегу горной реки. Вероятно, она произошла от единичных особей, сохранившихся после природного разрушительного события. Показатели нуклеотидной дивергенции между популяциями *A. frigidus* низкие (до 0.00180), хотя такие же низкие значения (0.00193) выявлены между *A. frigidus* и *A. penduliflorus*. Показатели генного потока $N_m = 0.081, 0.030$ и 0.010 между *A. frigidus* и *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus* соответственно, указывая на отсутствие заметного обмена генами между ними в настоящее время [27].

Анализ изоферментных данных выявил генетическую дистанцию между *A. frigidus* и остальными видами секции — 1.08, которая, согласно шкале генетических дистанций, разработанной для растений, соответствует видам разных подсекций (0.12–1.2) [28].

Разнообразные по морфологическим признакам особи *A. mongholicus* имеются как в генетически мономорфных, так и в полиморфных по хпДНК популяциях. По показателям тестов на нейтральность полиморфные популяции *A. mongholicus* содержат редкие гаплотипы при равновесии “мутация–дрейф”. Показатели $N_m = 0.130$ и 0.040 между *A. mongholicus* и *A. penduliflorus*, *A. sericeocanus* соответственно. Для популяций “Чуйская степь” и “Калиновка” вероятно иххождение через “бутылочное горлышко”. Первая

представляет собой локальную популяцию в небольшом понижении рельефа среди степи, вероятно возникшую здесь от единичных особей. Вторая находится близ населенного пункта на опушке леса у автомобильной дороги и вероятно в прошлом подвергалась чрезмерному антропогенному воздействию [29].

Показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия для видов *A. frigidus* и *A. mongholicus* ниже, чем, например, для *A. onobrychus* [30], что возможно связано с использованием только одного и относительно короткого фрагмента хпДНК. Напротив, показатели изменчивости аллелизм *A. frigidus* и *A. mongholicus* выше по сравнению с другими видами рода *Astragalus*, как и для травянистых бобовых в целом, что уже отмечалось нами ранее [25]. Вероятно, это объясняется их нахождением вблизи центров ареалов видов и небольшим количеством исследуемых локусов. Наиболее низкие значения показателей генетического полиморфизма по изоферментным маркерам получены для популяции *A. frigidus* “Ивдель”, что обычно характерно для краевых популяций, как правило находящихся под влиянием дрейфа генов и изоляции в течение длительного времени [31].

Эндемик побережий оз. Байкал *A. sericeocanus* резко отличается от *A. mongholicus* и *A. penduliflorus* по морфологическим, экологическим и, как было установлено, генетическим признакам. Растения этого вида имеют характерное серебристо-мохнатое опушение, местообитания приурочены к перевиваемым пескам. Для вида выявлены видоспецифичные признаки: набор изоферментных ал-

лелей и их частот, а также гаплотип О. Значения нуклеотидной дивергенции между *A. sericeocanus* и остальными видами самые высокие: от 0.00361 до 0.00555. Значения изоферментного полиморфизма высокие для популяции “Турка” и значительно меньше для популяции “Ярки”, что ожидаемо для островной популяции. При этом интересно отметить, что величины показателей полиморфизма даже в этой популяции сопоставимы с таковыми для ряда популяций широкоареального *A. frigidus*, а в среднем для вида показатели полиморфизма узколокального эндемика *A. sericeocanus* выше, чем у *A. frigidus* (табл. 4). Полученные на основе изоферментных маркеров значения генетических дистанций между популяциями *A. mongholicus* и *A. sericeocanus* соответствуют значениям для видов одной подсекции (0.032–0.652) [28].

По морфологическим признакам и генетическим показателям *A. penduliflorus* отличается от других исследованных видов. Для него выявлены специфичный гаплотип N и мономорфность по показателям изменчивости изоферментов и хпДНК. По изоферментным маркерам значение генетической дистанции 0.42 является самой большой для видов клады *A. mongholicus*–*A. penduliflorus*–*A. sericeocanus*, но также соответствует величине дистанции между близкородственными видами одной подсекции [28]. Генетические показатели этой популяции характерны для краевых частей ареала вида. В настоящее время ареал вида разорван [6], его основная часть находится в европейских горных системах (Альпы, Карпаты и Пиренеи) и в Центральной Швеции [5]. Можно предположить, что ранее существовала обширная предковая европейская популяция *A. penduliflorus*, а сейчас популяция “Голендухино” представляет собой лишь ее фрагмент и является реликтовой.

Обнаружена корреляция между гаплотипами и их географическим положением. Так, для *A. mongholicus* гаплотип F отмечен только в байкальских популяциях, а гаплотипы G, H и L – в алтайских, гаплотип Q выявлен только на о-ве Сахалин. Для *A. frigidus* гаплотипы B, C и E характерны для байкальских популяций, а D – для алтайских. Подобная корреляция с использованием ITS, ITS2 и *psbA-trnH* была выявлена для *A. mongholicus* в Китае [32]. Вероятно, в прошлом типичные местообитания этих видов неоднократно подвергались изменению, сокращаясь и вновь расширяясь из-за климатических циклов в плейстоцене. Было показано, что такие климатические циклы могли способствовать диверсификации видов растений за счет многократного деления популяций, что привело к аллопатрическому видообразованию [33, 34]. Вероятно, таким же образом в ходе эволюционной дивергенции *A. sericeocanus* обособился в условиях специфической среды песчаных арен Прибайкалья.

Ранее было показано [35], что для большинства видов покрытосеменных растений присутствие нескольких гаплотипов в популяциях указывает на их расположение в зонах контакта разных материнских линий. Это позволяет проследить пути миграции этих видов и число рефугиумов, а иногда и их предполагаемые местонахождения. Анализируя полученные нами данные, можно предположить, что такие зоны путей миграции и контакта находились к востоку и юго-западу от оз. Байкал и на Алтае.

Выражаем благодарность коллегам А.В. Верхожиной, Е.В. Жмудь, М.А. Полежаевой, Д.В. Санданову, Д.Г. Чимитову и Е.Г. Филиппову за помощь в сборе материала для исследований и при анализе полученных данных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zarre Sh., Azani N. Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus* (Fabaceae): a review // Prog. Biol. Sci. 2013. V. 3. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.22059/PBS.2013.32086>
2. Frodin D.G. History and concepts of big plant genera // Taxon. 2004. V. 53. № 3. P. 753–776. <https://doi.org/10.2307/4135449>
3. Podlech D. Revision von *Astragalus* L. sect. *Caprini* DC. (Leguminosae) // Mitt. Bot. Staatssamml. München. 1988. V. 25. P. 1–924.
4. Сытин А.К. Астрагалы (*Astragalus* L., Fabaceae) Восточной Европы и Кавказа: систематика, география, эволюция: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2009. 48 с.
5. Podlech D., Zarre Sh. A Taxonomic Revision of the Genus *Astragalus* L. (Leguminosae) in the Old World. Vienna: Naturhistorisches Museum Wien, 2013. V. 1. 822 p.
6. Беляев А.Ю., Дышякова О.С., Зимницкая С.А., Князев М.С. Уникальная природная популяция астрагала (*Astragalus penduliflorus* Lam. s.l.) на Среднем Урале // Проблемы популяционной биологии: Матер. XII Всеросс. популяционного семинара памяти Николая Васильевича Глотова (1939–2016). Йошкар-Ола: ООО ИПФ “СТРИНГ”, 2017. С. 41–43.
7. Санданов Д.В., Кривенко Д.А. Астрагал шелковисто-седой – *Astragalus sericeocanus* Gontsch. // Красная книга Республики Бурятия: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2013. С. 518–519.
8. Karron J.D., Linhart Y.B., Chaulk C.A., Robertson C.A. Genetic structure of populations of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae) //

- Amer. J. Bot. 1988. V. 75. № 8. P. 1114–1119.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb08823.x>
9. *Kazempour Osaloo S., Maassoumi A.A., Murakami N.* Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences // *Plant Syst. Evol.* 2003. V. 242. № 1–4. P. 1–32.
<https://doi.org/10.1007/s00606-003-0014-1>
 10. *Riahi M., Zarre Sh., Maassoumi A.A. et al.* Towards a phylogeny for *Astragalus* section *Carpini* (Fabaceae) and its allies based on nuclear and plastid DNA sequences // *Plant Syst. Evol.* 2011. V. 293. № 1–4. P. 119–133.
<https://doi.org/10.1007/s00606-011-0417-3>
 11. *Choi I.-S., Kim S.-Y., Choi B.-H.* Taxonomic position and genetic differentiation of Korean *Astragalus mongholicus* Bunge // *Korean J. Pl. Taxon.* 2013. V. 43. № 1. P. 12–21.
<https://doi.org/10.11110/kjpt.2013.43.1.12>
 12. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theoret. Appl. Genetics.* 1996. V. 92. № 6. P. 673–679.
<https://doi.org/10.1007/BF00226088>
 13. *Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Mol. Biol.* 1991. V. 17. № 5. P. 1105–1109.
<https://doi.org/10.1007/BF00037152>
 14. *Хантемирова Е.В., Пименова Е.А., Корчагина О.С.* Полиморфизм хлоропластной ДНК и филогеография ольхи зеленой (*Alnus alnobetula* (Enhr.) K. Koch. s.l.) в Азиатской России // *Генетика.* 2018. Т. 54. № 1. С. 75–86.
<https://doi.org/10.7868/S0016675818010058>
 15. *Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T. et al.* The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // *Am. J. Bot.* 2005. V. 92. № 1. P. 142–166.
<https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>
 16. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
 17. *Bassam B.J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M.* Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1991. V. 196. № 1. P. 80–83.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90120-I](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90120-I)
 18. *Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.* Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
 19. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetic data analysis // *Evol. Bioinform. Online.* 2005. V. 1. P. 47–50.
 20. *Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // *Bioinform.* 2003. V. 19. № 18. P. 2496–2497.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
 21. *Petit R.J., Duminil J., Fineschi S. et al.* Comparative organization chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 3. P. 689–701.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02410.x>
 22. *Pons O., Petit R.J.* Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles // *Genetics.* 1996. V. 144. № 3. P. 1237–1245.
 23. *Tajima F.* The effect of change in population size on DNA polymorphism // *Genetics.* 1989. V. 123. № 3. P. 597–601.
 24. *Fu Y.-X.* Statistical tests of neutrality of mutation against population growth hitchhiking and background selection // *Genetics.* 1997. V. 147. № 2. P. 915–925.
 25. *Дымышкова О.С., Кривенко Д.А., Беляев А.Ю., Верховина А.В.* Генетическая дифференциация трех видов рода *Astragalus* L. секции *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 8. С. 887–894.
<https://doi.org/10.7868/S0016675815080020>
 26. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics.* 1978. V. 89. № 3. P. 583–590.
 27. *Wright S.* Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4: Variability within and among Natural Populations. Chicago: Univ. Chicago Press, 1978. 580 p.
 28. *Шурхал А.В., Подогаз А.В., Животовский Л.А.* Уровни генетической дифференциации жестких сосен род *Pinus*, подрод *Pinus*, по данным аллозимной изменчивости // *Генетика.* 1993. Т. 29. № 1. С. 77–90.
 29. *Forman R.T.T., Alexander L.E.* Roads and their major ecological effect // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1998. V. 29. P. 207–231.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.207>
 30. *Plenk K., Willner W., Deminaet O.N. et al.* Phylogeographic evidence for long-term persistence of the Eurasian steppe plant *Astragalus onobrychis* in the Pannonian region (eastern Central Europe) // *Flora.* 2020. V. 264. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151555>
 31. *Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глозов Н.В.* Очерк учения о популяции. М.: Наука, 1973. 277 с.
 32. *Li L., Zheng S., Brinckmann J. et al.* Chemical and genetic diversity of *Astragalus mongholicus* grown in different eco-climatic region // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 9. e0184791.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184791>
 33. *Bargheri A., Maassoumi A.A., Rahiminejad M.R. et al.* Molecular phylogeny and divergence time of *Astragalus* section *Hymenostegis*: An analysis of rapidly diversifying species group in Fabaceae // *Scientific Reports.* 2017. V. 7. 14033.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14614-3>
 34. *Абрамсон Н.И.* Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // *Информ. вестник ВОГиС.* 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
 35. *Soltis D.E., Soltis P.S., Ranker T.A., Ness B.D.* Chloroplast DNA variation in a wild plant, *Tolmiea menziesii* // *Genetics.* 1989. V. 121. № 4. P. 819–826.

Genetic Diversity of Four Species of the Genus *Astragalus* L. Section *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) in the Asian Part of Russia according to the Data of *trnL-trnF* Chloroplast DNA Variability and Isoenzyme Markers

O. S. Korchagina^{a, *}, D. A. Krivenko^{b, **}, and A. Yu. Belyaev^c

^a Sakhalin Branch of the Botanical Garden-Institute, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Yuzhno-Sakhalinsk, 693023 Russia

^b Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

^c Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia

*e-mail: dymshakova@rambler.ru

**e-mail: krivenko.irk@gmail.com

The genetic diversity and phylogenetic relationships of four species of the genus *Astragalus* of the section *Cenantrum*: *A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus*, and *A. sericeocanus* from the Asian part of Russia, were studied according to the variability of *trnL-trnF* cpDNA and isozyme markers. For each species specific sets of chloroplast haplotypes, alleles, and isozyme frequencies were identified. According to cpDNA data, the studied populations are characterized by low haplotype (h varies from 0.095 to 0.333) and nucleotide (π varies from 0.00019 to 0.00378) diversity. Most of the populations (20 out of 27) were monomorphic. According to the data of isozyme analysis, the indicators of polymorphism for three species (the exception is the monomorphic population of *A. penduliflorus*) have rather high values. For a species, on average, polymorphism (P_{95}) varies from 55.5 to 85.5%, the number of alleles per locus (A) is from 1.8 to 2.7, and the observed heterozygosity (H_o) is from 0.134 to 0.215. The geographic confinement of haplotypes and polymorphic populations of *A. frigidus* and *A. mongholicus* were revealed in Altai and Baikal Siberia. These localities are probably located at the intersection of migration routes or refugia.

Keywords: *Astragalus*, *Cenantrum*, cpDNA, isozyme analysis, polymorphism.