



УДК 582.623.2:575.22+57.063.7(470.40/.43)

Salix fursaevii Mavrodiev (Salicaceae): палеоэндемик долины Волги или экотип *S. triandra* L.?

И. А. Шанцер^{1,5*}, А. В. Федорова^{1,6}, О. И. Кузнецова^{1,7}, И. В. Беляева^{2,3,8}, О. В. Разумова^{1,4,9}

¹Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, ул. Ботаническая, д. 4, г. Москва, 127276, Россия

²Королевские ботанические сады Кью, г. Ричмонд, TW9 3AE, Великобритания

³Ботанический сад, Уральское отделение, 8 Марта 202А, Екатеринбург, 620144, Россия

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН, ул. Тимирязевская, д. 42, г. Москва, 127550, Россия

⁵E-mail: ischanzer@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4216-9923>

⁶ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7362-2124>

⁷ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5513-1329>

⁸ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1368-4806>

⁹ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5157-0087>

* Автор для переписки

Ключевые слова: вид, генетика популяций, систематика, *atpB-rbcL*, ITS, Salicaceae, *Salix fursaevii*, *Salix triandra*.

Аннотация. В 2012 г. Е. В. Мавродиев с соавторами опубликовали в «Бюллетене МОИП (отд. биол.)» статью, в которой описали новый для науки вид *Salix fursaevii*, эндемичный для поймы р. Волги и отличающийся от близкого широко распространенного вида *S. triandra* немногими количественными морфологическими признаками и, главным образом, существенно более поздними сроками цветения. Описанные ими позднелетние ивы были известны и исследованы ранее в качестве экотипа *S. triandra*. Проведенное нами исследование на большой выборке образцов *S. triandra* s. l. показало, что 1) *S. triandra* s. str. и *S. fursaevii* не могут быть четко различены между собой по морфологическим признакам и времени цветения; 2) образцы, морфологически соответствующие *S. fursaevii*, за единственным исключением, встречаются только в пойме р. Волги; 3) популяции *S. triandra* и *S. fursaevii* не различаются по последовательностям ядерных ITS; 4) популяции *S. triandra* и *S. fursaevii* слабо дифференцированы по хлоропластным последовательностям *atpB-rbcL*; 5) представители обоих таксонов оказались тетраплоидами $2n = 4x = 76$. Слабая дифференциация по хлоропластным последовательностям указывает на внутривидовой характер изменчивости, а особенности их географического распространения – на вероятность того, что территория долины Волги служила рефугиумом во время последнего оледенения и явилась одним из источников послеледникового расселения *S. triandra*.

Is *Salix fursaevii* Mavrodiev (Salicaceae) a palaeoendemic of the Volga River valley or an ecotype of *S. triandra* L.?

I. A. Schanzer^{1*}, A. V. Fedorova¹, O. I. Kuznetsova¹, I. V. Belyaeva^{2,3}, O. V. Razumova^{1,4}

¹Tsitsin Main Botanical Garden RAS, Botanicheskaya St., 4, Moscow, 127276, Russian Federation

²Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, TW9 3AE, UK

³Botanical Garden, Ural Branch of RAS, 8 Marta str. 202A, Yekaterinburg, 620144, Russia

⁴All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology RAS, Timiryazevskaya St., 42, Moscow, 127550, Russian Federation

*Corresponding author

Keywords: *atpB-rbcL*, ITS, population genetics, Salicaceae, *Salix fursaevii*, *Salix triandra*, species, taxonomy.

Summary. *Salix fursaevii*, a species endemic to the Volga River flood plain, was described by E. Mavrodiev and co-authors in Byull. Moskovsk. Obshch. Isp. Prir. in 2012. It differs from the closely related and widespread *S. triandra* by a few quantitative morphological characters and, most of all by its much later flowering time. This late-flowering willow was known and studied before as an ecotype of *S. triandra*. Our study of a large sample of *S. triandra* s. l. revealed that 1) *S. triandra* s. str. and *S. fursaevii* could not be clearly distinguished using several morphological characters and the time of flowering; 2) specimens morphologically corresponding to *S. fursaevii* are with a single exception strictly confined to the Volga River flood plain; 3) the populations of *S. triandra* and *S. fursaevii* do not differ by nrITS sequences; 4) the populations of *S. triandra* and *S. fursaevii* are poorly differentiated by chloroplast *atpB-rbcL* sequences; 5) representatives of both taxa are tetraploids $2n = 4x = 76$. Poor differentiation of populations by chloroplast sequences is indicative of the intraspecific variability, the geographic pattern of which suggests that the Volga River valley was a probable glacial refugium and a source of post glacial spread of *S. triandra*.

В 2012 г. Е. В. Мавродиев с соавт. (Mavrodiev et al., 2012) опубликовали статью, в которой описали новый вид – иву Фурсаева (*Salix fursaevii* Mavrodiev), растущую в пойме р. Волги. В качестве отличительных морфологических признаков нового вида от родственной, широко распространенной ивы трехтычинковой (*S. triandra* L.) Мавродиев с соавт. указали наличие большего числа листьев (5–8 в отличие от 3–5 у *S. triandra*) на генеративном женском побеге, а также более поздние сроки цветения *S. fursaevii*: конец мая – июль – начало августа, а не апрель – середина мая, как у *S. triandra* (Mavrodiev et al., 2012: 63). Для обоснования признания этих позднецветущих ив в качестве самостоятельного вида Мавродиев с соавт. реанимировали идеи саратовского ботаника А. Д. Фурсаева о быстром видообразовании в поймах крупных рек, вызванном задержкой цветения у многих видов растений из-за весенних паводков (Fursaev, 1937, 1940). Эти представления авторы назвали «теоремой Фурсаева» (Laktionov et al., 2012; Mavrodiev et al., 2012), для «доказательства» которой они и использовали описанный ими вид ивы. Позднецветущие пойменные формы у ивы трехтычинковой и ряда других видов ив известны давно и были достаточно детально изучены и описаны в качестве экотипов (Sukachev, 1935; Skvortsov, 1980). Однако Мавродиев с соавт. (Mavrodiev et al., 2012) не согласились с подобной трактовкой и в качестве аргумента, подтверждающего видовой ранг описанной ими ивы Фурсаева, провели небольшое молекулярно-генетическое исследование, в которое были включены три образца *S. fursaevii* (в т. ч. голотип и один из паратипов) и один образец *S. triandra*. Все включенные в анализ образцы были собраны в окрест-

г. Волгограда. Кроме них, при анализе различных маркеров был использован также ряд последовательностей *S. triandra*, взятых из GenBank NCBI, из которых авторами в приложении приведена лишь одна. В качестве внешней группы для укоренения деревьев были использованы последовательности нескольких видов ив, также взятые из Генбанка. Для анализа Мавродиев с соавт. использовали четыре маркера: хлоропластные ген *rbcL*, межгенные спейсеры *trnD-trnT* и *atpB-rbcL*, внутренние транскрибируемые спейсеры рибосомального ядерного оперона (ITS1 и ITS2). Анализ полученных деревьев показывает, что маркер *trnD-trnT* не выявил никаких отличий между *S. fursaevii* и *S. triandra*. По остальным маркерам они образовали сестринские группы, однако насколько полученный результат надежен, утверждать затруднительно, в связи с тем, что изучено очень малое число образцов, а по некоторым маркерам в анализ включены (в каждом случае разные) последовательности *S. triandra* из Генбанка. При этом результаты проведенного анализа убедили Мавродиева с соавт. признать *S. fursaevii* в качестве самостоятельного вида. Они также утверждают, что «из топологии деревьев следует», что *S. fursaevii* представляет собой палеоэндемичный таксон, способность которого к позднему цветению рассматривается ими как «адаптация к специфическому гидро-режиму древних ландшафтов» (Mavrodiev et al., 2012: 66). Целью нашего исследования, проводимого в рамках работ по изучению критических таксонов нижеволжской флоры, была проверка вывода о видовом ранге *S. fursaevii* на большей по объему выборке ив родства *S. triandra* с использованием популяционно-генетического подхода.

Материалы и методы

Сбор и идентификация материала

Материал для исследования был собран в ходе экспедиционных поездок по территории Рязанской, Ульяновской, Самарской, Саратовской, Волгоградской, Астраханской, Оренбургской областей и Республики Башкортостан в 2019–2020 гг. (табл. 1, рис. 1). Собранные гербарные образцы были определены известным специалистом по систематике рода *Salix* И. В. Беляевой. В качестве внешней группы (ВГ) во всех

анализах были использованы образцы других видов ив, собранных с той же территории, что и образцы исследуемой группы (ИГ), включавшей только *S. triandra* и *S. fursaevii*. Все ваучерные гербарные образцы хранятся в Гербарии Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина РАН (МНА) (табл. 1). Образцы, определенные как *S. triandra*, повторно определяли по ключу в статье Мавродиёва с соавт. (Mavrodiev et al., 2012) для того, чтобы выявить те из них, которые соответствовали по своим признакам *S. fursaevii*.

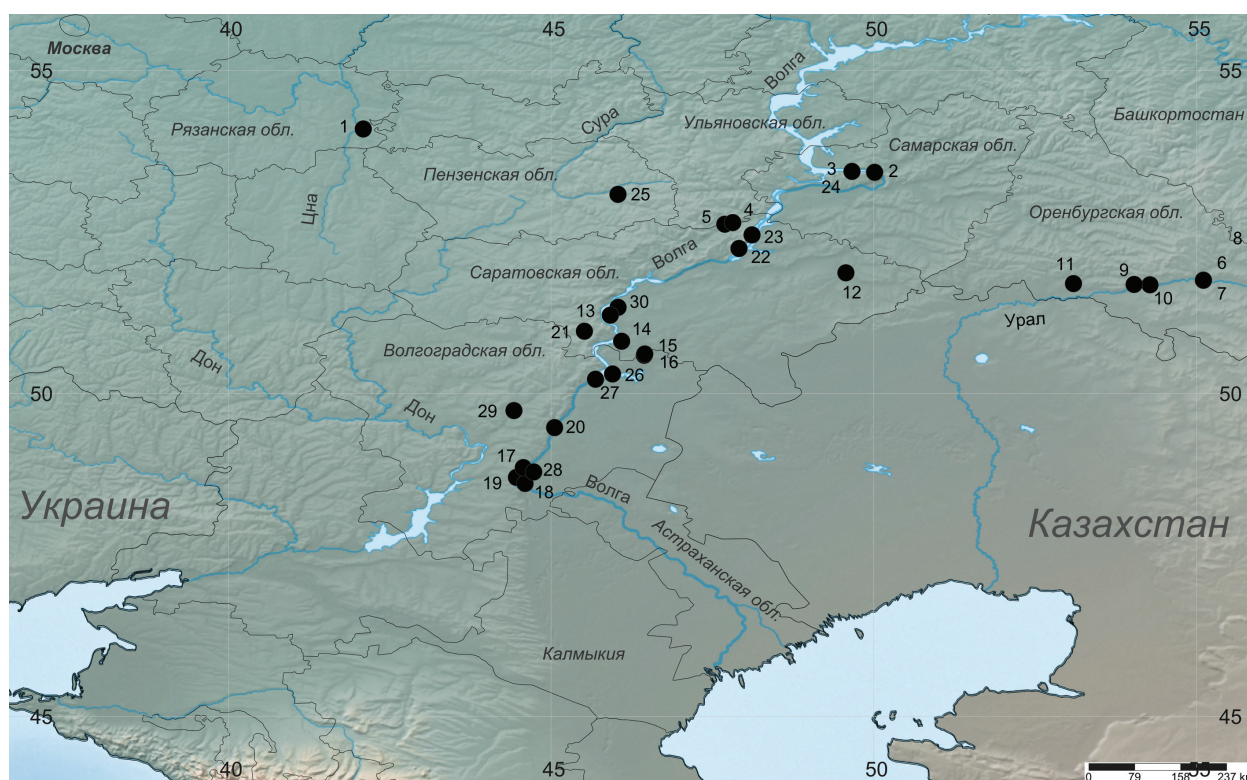


Рис. 1. Географическое положение исследованных популяций *Salix triandra*. Номера популяций соответствуют номерам в табл. 1.

Таблица 1

Исследованные популяции *Salix triandra* (t) и *S. fursaevii* (f) и номера последовательностей ДНК, депонированных в GenBank NCBI, с указанием гаплотипа для последовательностей *atpB-rbcL*

№ п/п	Местонахождение	Число образцов, вид	ITS	<i>atpB-rbcL</i> , гаплотип
1	Рязанская обл., Шацкий р-н, 1 км ЮЗ дер. Лесная Слобода, низкий левый берег р. Цна. Куст ок. 2 м выс. 54.095359°N, 42.089878°E. 17 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, Н. Степанова, М. Носова	3t	–	ON081380– ON081382 A, B
2	Самарская обл., Жигули, близ села Ширияево, по берегу Волги от Ширияево до пристани. 53.424588°N, 50.013076°E. 18 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, Н. Степанова, М. Носова	1t	ON074619	ON081383 B

Таблица 1 (продолжение)

№ п/п	Местонахождение	Число образцов, вид	ITS	<i>atpB-rbcL</i> , гаплотип
3	Самарская обл., Жигулёвский государственный природный заповедник имени И.И. Спрыгина, близ с. Бахилова Поляна, берег Волги. 53.438378°N, 49.662175°E. 19 V 2019. Шанцер, А. Фёдорова, Н. Степанова, М. Носова	3t	ON074620– ON074621	ON081384– ON081386 B, E
4	Саратовская обл., Хвалынский р-н, между с. Поповка и грядой Пиче-Панда, берег р. Лебежайка. 52.646050°N, 47.814533°E. 21 V 2019. Шанцер, А. Фёдорова, Н. Степанова, М. Носова	2t	ON074622	ON081387– ON081388 B
5	Ульяновская обл., Старокулаткинский р-н, близ с. Усть-Кулатка, в 1 км к С от холма «Золотая Гора», в котловине заброшенного сухого искусственного водного резервуара. 52.620907°N, 47.691714°E. 21 V 2019. Шанцер, А. Фёдорова, Н. Степанова, М. Носова	2t	–	ON081389 B
6	г. Оренбург, правый берег р. Урал выше пешеходного моста. 51.754115°N, 55.108341°E. 25 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова	3t	–	ON081390– ON081392 B
7	г. Оренбург, левый берег р. Урал ниже пешеходного моста. На песчаном берегу на краю парка. 51.752554°N, 55.106528°E. 25 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова	1t	–	ON081393 B
8	Оренбургская обл., Саракташский р-н, 1 км к С от дер. Новоселки. Вдоль русла ручья. 51.977803°N, 56.432109°E. 26 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова	2t	–	ON081394– ON081395 B
9	Оренбургская обл., Переволоцкий р-н, 4,7 км к СЗ от деревни Чесноковка, балка в истоке р. Ялга юго-восточнее Чесноковских Белых гор. 51.688255°N, 54.033634°E. 31 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова	2t	–	ON081396– ON081397 B
10	Оренбургская обл., Переволоцкий р-н, высокий правый берег р. Урал в 2 км З села Татищево, луг у перелеска. 51.682922°N, 54.279308°E. 31 V 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова	1t	ON074623	ON081398 B
11	Оренбургская обл., у шоссе Илек-Ташла на З окраине пос. Алексеевка, у коровьего пруда. 51.701409°N, 53.094224°E. 02 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	3t	ON074624	ON081399– ON081401 B
12	Саратовская обл., Пугачёвский р-н, 1,4 км к С от пос. Максютново, выпасаемая пойма р. Камелик, коровий водопой. 51.868429°N, 49.568198°E. 03 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	3t	ON074625	ON081402– ON081404 B
13	Саратовская обл., Энгельсский р-н, 0,1 км к С от пос. Красноармейское, левый берег р. Волги, низкая часть поймы, у полосы тростников. 51.212621°N, 45.917275°E. 05 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	2t, 1f	–	ON081405– ON081407 B
14	Саратовская обл., Ровенский р-н, 3 км к С от пос. Ровное, левый берег р. Волги, низкий песчаный берег р. Волги. В полосе тростников. 50.808969°N, 46.093000°E. 05 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	5t	ON074626– ON074630	ON081408– ON081412 B
15	Саратовская обл., Ровенский р-н, 1 км к ЮЮЗ от пос. Луговское, плоская балка, впадающая в р. Еруслан, в полевой степи на песках. 50.611782°N, 46.451691°E. 05 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	1t	ON074631	ON081413 B

Таблица 1 (продолжение)

№ п/п	Местонахождение	Число образцов, вид	ITS	<i>atpB-rbcL</i> , гаплотип
16	Саратовская обл., Ровенский р-н, 4,5 км к ЮЮЗ от пос. Луговское, правый берег р. Еруслан, у воды. 50.591671°N, 46.443686°E. 05 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	1t	ON074632	ON081414 B
17	г. Волгоград, правый берег р. Волги 0.8 км ниже по течению от Волгоградской ГЭС близ устья р. Мечетки, парк на песчаном берегу. 48.823203°N, 44.647207°E. 08 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	8f	ON074633– ON074637	ON081415– ON081422 B
18	Волгоградская обл., Среднеахтубинский р-н, левый берег р. Волги 0.3-0.5 км ЮВ пос. Тумак. Полоса ивняков вдоль берега на песке. 48.614539°N, 44.631210°E. 08 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	10f	ON074638– ON074643	ON081423– ON081432 B, C
19	г. Волгоград, Красноармейский р-н, Сарепта, С край пересохшего Сарептского затона, заболоченный луг. 48.540945°N, 44.499081°E. 09 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	4f	ON074644	ON081433– ON081436 B
20	Волгоградская обл., Дубовский р-н, 2 км Ю ст. Суводская, в балке правого берега р. Волги, заросли кустарников вокруг пруда. 49.472056°N, 45.054838°E. 11 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	1t	–	ON081437 B
21	Саратовская обл., Красноармейский р-н, 5.5 км ЮЗ Красноармейска, пойма левого берега р. Грязный Карамыш. 50.980010°N, 45.609663°E. 11 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	3t	ON074618	ON081353, ON081356 B
22	Саратовская обл., Хвалынский р-н, 1.5 км ЮВ дер. Победа, берег пруда в балке Меровской. 52.244969°N, 47.911483°E. 12 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	4t	ON074646	ON081440– ON081443 B
23	Саратовская обл., Хвалынский р-н, ок. 1.2 км к Ю от Хвалынска, правый берег р. Волги, заросли кустарников. 52.455373°N, 48.113355°E. 13 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	1f	–	ON081444 C
24	Самарская обл., Жигулёвский государственный природный заповедник имени И. И. Спрыгина, пос. Бахилова Поляна, правый берег р. Волги, бичева: под высоким берегом Бахиловой Горы ниже поселка. 53.439323°N, 49.681670°E. 14 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	3f	ON074647– ON074648	ON081446– ON081448 C
25	Пензенская обл., В окраина пос. Нижняя Елюзань, пойма р. Кадады у шоссе М5. 53.083269°N, 46.036760°E. 15 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	1t, 2f	ON074649– ON074650	ON081449– ON081451 B
26	Волгоградская обл., Старополтавский р-н, левый берег Волги в устье р. Еруслан по правому берегу, среди зарослей тростника. 50°18'07.48"N, 45°57'08.41"E. 14 VI 2020. И. Шанцер, А. Кашин, А. Пархоменко	6f	ON074653– ON074655	ON081458– ON081462 B, C, D
27	Волгоградская обл., Николаевский р-н, 1,8 км СЗ с. Политотдельское, под обрывом левого берега Волги, кусты 2–3 м выс. 50°13'13.94"N, 45°41'18.59"E. 15 VI 2020. И. Шанцер, А. Кашин, А. Пархоменко	2t, 1f	ON074656	ON081463– ON081464 B, C

Таблица 1 (окончание)

№ п/п	Местонахождение	Число образцов, вид	ITS	<i>atpB-rbcL</i> , гаплотип
28	Волгоградская обл., Среднеахтубинский р-н, левый берег Волги, о. Крит, 0,5 км к С от хут. Бобры, песчаный пляж. Кусты 2–3 м выс. 48°43'52.9"N, 44°33'58.9"E. 16 VI 2020. И. Шанцер, А. Кашин, А. Пархоменко	2t	ON074658	ON081470 V
29	Волгоградская обл., Ольховский р-н, 4 км ССВ с. Захаровка, пойма правого берега р. Иловли, белотопольный пойменный лес. 49.745343°N, 44.398206°E. 10 VI 2019. И. Шанцер, А. Фёдорова, О. Кузнецова	1t	ON074645	–
30	Саратовская обл., левый берег Волги, 12,5 км на Ю от Энгельса вдоль шоссе Р226, у моста через балку ручья, текущего в Волгу от сероводородного источника, одиночный куст на краю сплошной заросли ивняка <i>Salix cinerea</i> . 51° 20'00.50"N, 46°02'16.79"E. 14 VI 2020. И. Шанцер, А. Кашин, А. Пархоменко	1t	–	–
31	Россия, Якутия, окр. г. Якутска, зеленый луг, высокая пойма, придорожные заросли ив, разнотравно-злаковые. 20 VI 2019 г. А. Ефимова	2t	ON074659	ON081471– ON081472 B

Морфологический анализ

Анализ различий образцов по морфологическим признакам проводили в программе PAST v. 4.10 (Hammer et al., 2001) методом неметрического многомерного шкалирования (NMDS). В анализ включались и количественные, и счетные признаки, в связи с чем использовалась дистанция Говера. Для проверки определений, сделанных с использованием ключа и экспертной оценки, мы добавили в анализ несколько дополнительных признаков: длина генеративного побега, ширина самого крупного листа на генеративном побеге, число листьев на генеративном побеге и отношение дня сбора к фенотипу. Последний показатель кодировался следующим образом: 17 мая кодировалось как первый день сбора, а 15 июня – как 30-й; цветущие серёжки кодировались как 1, незрелые плоды / отцветающие мужские серёжки как 2, засохшие вскрывшиеся плоды / засохшие мужские серёжки как 3. Несмотря на условность этого показателя, он позволил включить в анализ различия по времени цветения, что улучшило разделение образцов *S. triandra* и *S. fursaevii* при анализе методом NMDS. В этой же программе строились диаграммы различий образцов *S. triandra* и *S. fursaevii* по потенциально диагностическим морфологическим признакам и проводились статистические тесты (тесты на нормальность распределения и многомерные непараметриче-

ские тесты ANOSIM (ANalysis Of SIMilarities) и PerMANOVA). Анализ был проведен отдельно для мужских и женских растений. Географическое распространение растений, определенных как *S. triandra* и *S. fursaevii*, с которых были собраны образцы, показано на рис. 4. Карты распространения популяций и гаплотипов строились в программе SimpleMappr (Shorthouse, 2010).

Молекулярно-филогенетический анализ

Параллельно со сбором гербарных образцов в поле отбирался материал для молекулярных исследований и высушивался в силикагеле.

Тотальная ДНК была выделена из высушенных в силикагеле листьев с применением стандартного СТАВ-метода (Doyle J. J., Doyle J. L., 1987). Оценка качества выделенной ДНК проводилась в 1%-м агарозном геле с окрашиванием бромидом этидия. Для амплификации были выбраны два участка, оказавшихся наиболее информативными в работе Мавродиёва с соавт. (Mavrodiev et al., 2012): ядерные внутренние транскрибируемые спейсеры 1 и 2 (ITS1, ITS2), включая последовательность 5,8S рибосомальной ДНК, а также пластидный межгенный спейсер *atpB-rbcL*. Для амплификации и последующего секвенирования использовались праймеры: NNC-18S10 (AGGAGAAGTCGTAACAA) и C26A (GTTTCTTTTCCTCCGCT)

(Wen, Zimmer, 1996) для ITS1, 2 и *atpB* (GACTCGCACTTGATTTCTGTTGC) и *rbcl* (CGGGGTGTAGTAAGTCAATTTATA) (Shaw et al., 2007) для участка *atpB-rbcl*. Праймеры были синтезированы и очищены в ПААГ компанией Синтол (Москва). Объем одной реакции ПЦР составил 20 мкл: 1,5–2 нг ДНК, 5 пМ каждого праймера, 4 мкл готового Master MIX, содержащего Hotstart SmarTaq ДНК полимеразу (Диалат, Россия), а также 13 мкл деионизированной воды. ПЦР проводилась в автоматическом амплификаторе MJ Research PTC220 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США) по следующим протоколам: для ITS1, 2: 94 °C – 3 мин; 94 °C – 20 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 40 с (34 цикла); 72 °C – 3 мин; для *atpB-rbcl*: 95 °C – 3 мин; 95 °C – 30 с, 48 °C – 1 мин, 72 °C – 40 с (28 циклов); 72 °C – 3 мин. Продукты ПЦР разделяли в 1 % агарозном геле в 0,5× TBE (pH = 8,3) буфере содержащем бромид этидия и очищали переосаждением в 0,125 М/л растворе ацетата аммония в 70%-м этаноле (Daniels, 2003). Очищенный ПЦР-продукт был секвенирован в двух направлениях с теми же праймерами на ДНК-анализаторе 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, США) в компании Синтол (Москва, Россия). Нуклеотидные последовательности *atpB-rbcl* были получены для 139 образцов, в том числе для 83 образцов *S. triandra* и *S. fursaei* (ИГ, табл. 1) и 53 образцов ВГ, а именно: 10 образцов *S. alba* L. (ON081372–ON081379, ON081439, ON081445), 4 образцов *S. × fragilis* L. (ON081337–ON081339, ON081438), 1 образца *S. gmelinii* Pall. (ON081359), 1 образца *S. acutifolia* Willd. (ON081348), 9 образцов *S. viminalis* L. (ON081340–ON081341, ON081363, ON081371, ON081452–ON081455, ON081465), 24 образцов *S. vinogradovii* A. K. Skvortsov (ON081343–ON081347, ON081349–ON081352, ON081355, ON081357–ON081358, ON081360–ON081362, ON081364–ON081370, ON081456–ON081457), 2 образцов *S. cinerea* L. (ON081342, ON081354) и 4 образцов *Salix* sp. (ON081466–ON081469), собранных с той же территории. Нуклеотидные последовательности ITS были получены для 42 образцов, в том числе для 38 образцов *S. triandra* и *S. fursaei* (ИГ; табл. 1), а также 2 образцов *S. vinogradovii* (ON074651–ON074652), 1 образца *S. viminalis* (ON074657) и 1 образца *Salix* sp. (ON074658), использованных в качестве ВГ.

Полученные нуклеотидные последовательности выравнивались в программе MAFFT (Katoh et al., 2002; Katoh, Standley, 2013) с параметрами L-INS-i, с последующей оценкой каче-

ства прочтения вручную в программе BioEdit v. 7.0.8.0. (Hall, 1999). Последовательности ядерных ITS содержали неоднозначно прочитанные позиции, на электрофореграммах видимые как двойные пики, вероятно, связанные с присутствием гетерозигот. Поэтому перед анализом мы провели фазирование риботипов с помощью алгоритма PHASE в программе DnaSP v. 6.12.03 (Rozas et al., 2017). В этой же программе были рассчитаны параметры гаплотипического и нуклеотидного разнообразия и дифференциации популяций *S. triandra* s. str. и *S. fursaei* по хлоропластным данным. Анализ выравниваний проводили методами максимального правдоподобия в программе RAxML (Stamatakis, 2014; Kozlov et al., 2019; Edler et al., 2020) и статистической парсимонии в программе TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000). Все секвенированные последовательности были депонированы в базе данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); их номера приведены в табл. 1.

Анализ плоидности

Из черенков, привезенных из экспедиционных поездок в 2019 и 2020 гг., во ВНИИСБ выращивались растения для получения активно делящихся клеток, с целью установить хромосомные числа изучаемых образцов. Часть растений погибла, выжившие были посажены в вегетационные сосуды и круглогодично выращивались в условиях оранжереи, проходя периоды зимнего покоя в слабо отапливаемом помещении с естественным освещением.

Плоидность растений определяли методом проточной цитометрии, на анализаторе плоидности CyFlow Space (Sysmex, Япония), с использованием коммерческого набора для выделения и окрашивания ядер CyStain UV Precise T согласно рекомендации производителя. Всего был исследован 21 образец. Верификацию результатов проточной цитометрии проводили прямым подсчетом хромосом на препаратах, полученных с двух образцов ив под номерами 120 (*S. fursaei*) и 121 (*S. triandra*) из Пензенской области (популяция 25). Препараты хромосом готовили из молодых, активно растущих корней методом SteamDrope (Kirov et al., 2014) с небольшими модификациями. Предфиксационную обработку проводили в 2 мМ растворе 8-гидроксихинолина при комнатной температуре в течение 4 часов. Фиксацию производили уксусным алкоголем (3 части 96 % этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты), зафиксированный материал хранили при –20 °C. Полученные постоянные

препараты анализировали с использованием фазово-контрастного конденсора. Далее наиболее удачные окрашивали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в растворе 2xSSC в течение 10 минут и фотографировали на максимальном увеличении (объектив 100, масляная иммерсия) на флуоресцентном микроскопе Leica DM6 B с камерой DFC 9000 GTC (Leica) с использованием программного обеспечения LAS X.

Результаты

Результаты морфологического анализа

Видовая идентификация образцов по морфологическим признакам позволила с некоторым сомнением выделить несколько групп образцов, определенных как *S. fursaevii*. Среди отличительных признаков этого вида при его описании (Mavrodiev et al., 2012) были указаны только число и ширина листьев на женском генеративном побеге и более позднее время цветения, в связи с чем надежное различие *S. fursaevii* и *S. triandra* s. str. оказалось невозможным из-за перекрывания диапазонов изменчивости этих признаков и отсутствия в описании указаний на различия мужских растений. Тем не менее, используя в

комбинации разные методы, нам все же удалось разделить выборку на две слабо перекрывающиеся группы, по своим признакам соответствующие раннецветущему экотипу *S. triandra* (*S. triandra* в узком смысле) и ее позднецветущему экотипу, т. е. *S. fursaevii*. При этом морфологические различия были обнаружены и у мужских растений, отнесенных к *S. triandra* в узком смысле и *S. fursaevii*. Различия этих групп показаны в табл. 2 и 3 и на рис. 2 и 3. Как видно из табл. 2, женские растения, отнесенные нами к *S. fursaevii*, достоверно отличаются от *S. triandra* по трем морфологическим признакам и времени цветения. Проведенные многомерные статистические тесты также показывают статистическую достоверность различий. Различия мужских растений (табл. 3) не столь выражены, хотя по числу листьев на генеративном побеге и времени цветения они статистически достоверны. Непараметрические многомерные тесты анализа сходств (ANOSIM) и пермутационного многомерного дисперсионного анализа (PerMANOVA) говорят о достоверных различиях между обеими выборками, но результаты многомерного дисперсионного анализа (MANOVA) не достоверны.

Таблица 2

Морфологические различия женских растений *Salix triandra* и *S. fursaevii*

Признак	<i>S. triandra</i> , ♀	<i>S. fursaevii</i> , ♀	результаты статистических тестов
число образцов, N	30	20	
средняя длина генеративного побега, мм	43,9 ± 17,7	64,6 ± 17,1	тест Стьюдента t = 4,1 p = 0,000
средняя ширина самого крупного листа на генеративном побеге, мм	8,1 ± 3,1	11,6 ± 4,2	тест Стьюдента t = 3,3 p = 0,002
среднее число листьев на генеративном побеге	3,6 ± 0,9	5,1 ± 1	тест Стьюдента t = 5,6 p = 0,000
время цветения, усл. ед.	7,1 ± 3,5	14,3 ± 5,1	тест Стьюдента t = 5,9 p = 0,000
Анализ с учетом признака «время цветения»			MANOVA лямбда Уилкса L = 0,39 F = 17,8 p = 0,000 ANOSIM R = 0,53 p = 0,000 PerMANOVA F = 23,8 p = 0,000
Анализ без учета признака «время цветения»			MANOVA лямбда Уилкса L = 0,72 F = 6,0 p = 0,002 ANOSIM R = 0,37 p = 0,000 PerMANOVA F = 22,5 p = 0,000

Таблица 3

Морфологические различия мужских растений *Salix triandra* и *S. fursaeVII*

признак	<i>S. triandra</i> , ♂	<i>S. fursaeVII</i> , ♂	результаты статистических тестов
число образцов, N	17	16	
средняя длина генеративного побега, мм	45,1 ± 21,4	60,5 ± 24,2	тест Стьюдента t = 1,8 p = 0,076
средняя ширина самого крупного листа на генеративном побеге, мм	7,4 ± 3,5	8,8 ± 3,6	тест Стьюдента t = 1,02 p = 0,316
среднее число листьев на генеративном побеге	3,8 ± 0,7	4,6 ± 0,7	тест Стьюдента t = 3,02 p = 0,005
время цветения, усл. ед.	6,8 ± 4,8	24,6 ± 2,6	тест Стьюдента t = 13,2 p = 0,000
Анализ с учетом признака «время цветения»			MANOVA лямбда Уилкса L = 0,13 F = 47,7 p = 0,000 ANOSIM R = 0,74 p = 0,000 PerMANOVA F = 37,7 p = 0,000
Анализ без учета признака «время цветения»			MANOVA лямбда Уилкса L = 0,84 F = 1,8 p = 0,174 ANOSIM R = 0,15 p = 0,008 PerMANOVA F = 5,5 p = 0,003

Результаты молекулярно-филогенетического анализа

Данные пластидного спейсера *atpB-rbcL*

Длина выравнивания после удаления плохо прочитавшихся участков в начале и конце последовательностей составила 624 позиции, из которых 10 были информативными, 7 представляли собой аутопоморфии, а 23 приходились на индели от 1 до 9 позиций длиной. Большая часть инделей встречалась среди образцов ВГ.

Предварительный анализ выравнивания методом максимального правдоподобия в программе RAxML (не показано) отделил ИГ от ВГ, но клада ИГ оказалась обладающей крайне низким разрешением. Один образец *S. triandra* (tri-50) из Рязанской области попал в основание ВГ. Дальнейший анализ выравнивания был проведен методом статистической парсимонии в программе TCS. Программа рассчитала максимальное число мутационных шагов равным 10 и объединила все последовательности ИГ и ВГ в одну сеть, сгруппировав их в 14 гаплотипов (рис. 5), 5 из которых относятся к ИГ, а 9 – к ВГ. При этом последовательность образца tri-50, обозначенная

как гаплотип А, заняла центральное положение в сети, ближайшее к гаплотипам ВГ. Оставшиеся четыре гаплотипа ИГ образовали замкнутую петлю, отношения гаплотипов в которой нельзя было однозначно интерпретировать. Для разрыва петли мы воспользовались правилами, сформулированными в работе Crandall and Templeton (1993), и разорвали ее по связи между гаплотипом D и гипотетическим гаплотипом, отсутствовавшим в выборке. В этом случае гаплотип D стал концевым гаплотипом сети, а гаплотип С – внутренним. Гаплотип E остался концевым гаплотипом, отделенным от гаплотипа В двумя мутационными событиями. Гаплотип В (рис. 6) представлен среди большинства образцов как *S. triandra*, так и *S. fursaeVII* и распространен по всей изученной территории от Рязанской области на западе до Башкирии на востоке, а также по всей изученной части долины р. Волги с севера на юг. Этот же гаплотип был выявлен и у двух исследованных образцов *S. triandra* из Якутии (табл. 1: популяция 31). К производному от него внутреннему гаплотипу С отнесены 8 образцов *S. fursaeVII* из разных локальных популяций по берегам Волги от Волгограда до Самары. Гапλο-

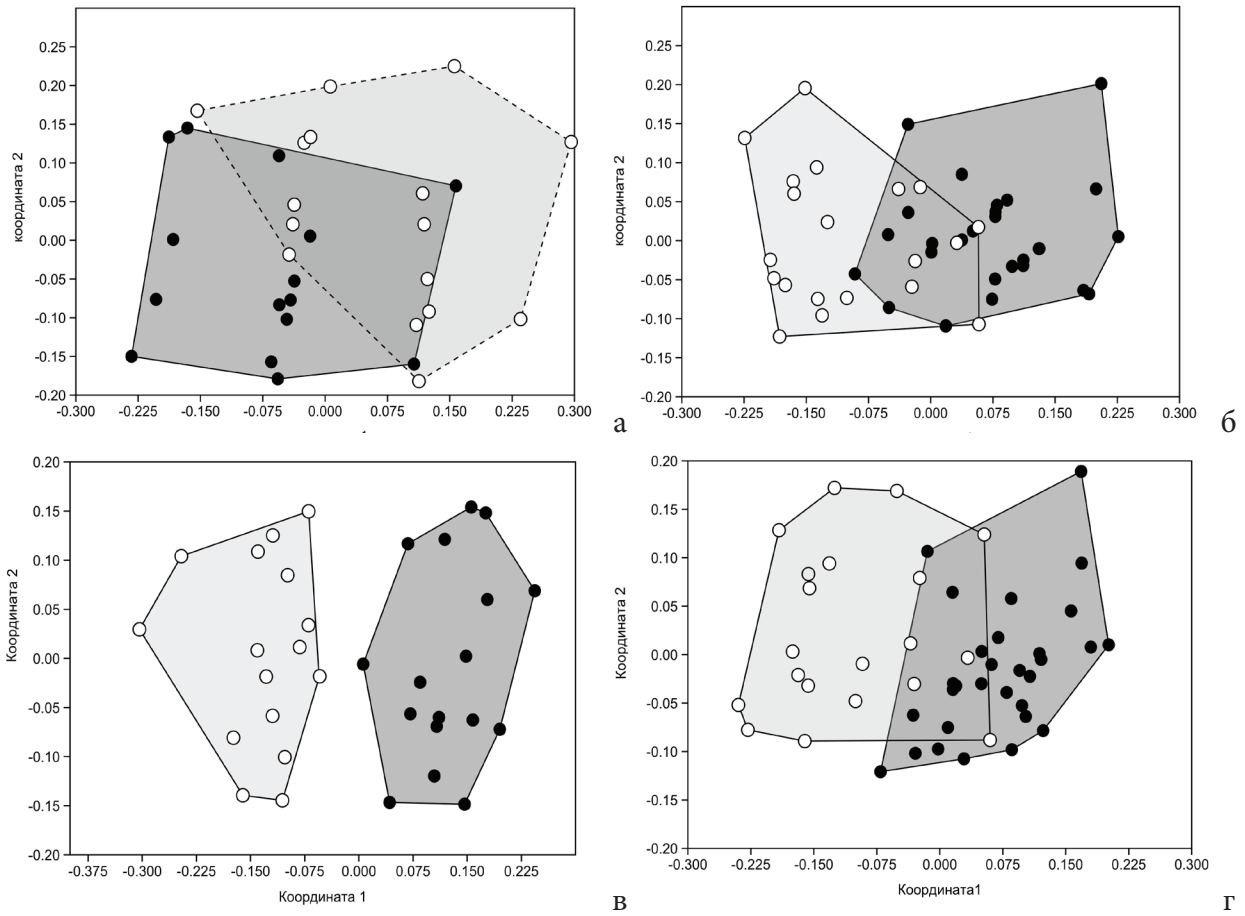


Рис. 2. Анализ морфологических признаков *Salix triandra* методом неметрического многомерного шкалирования: черные кружки – *S. triandra*; белые кружки – *S. fursaevii*; а – мужские растения; б – женские растения; в – мужские растения (с учетом признака времени цветения); г – женские растения (с учетом признака времени цветения).

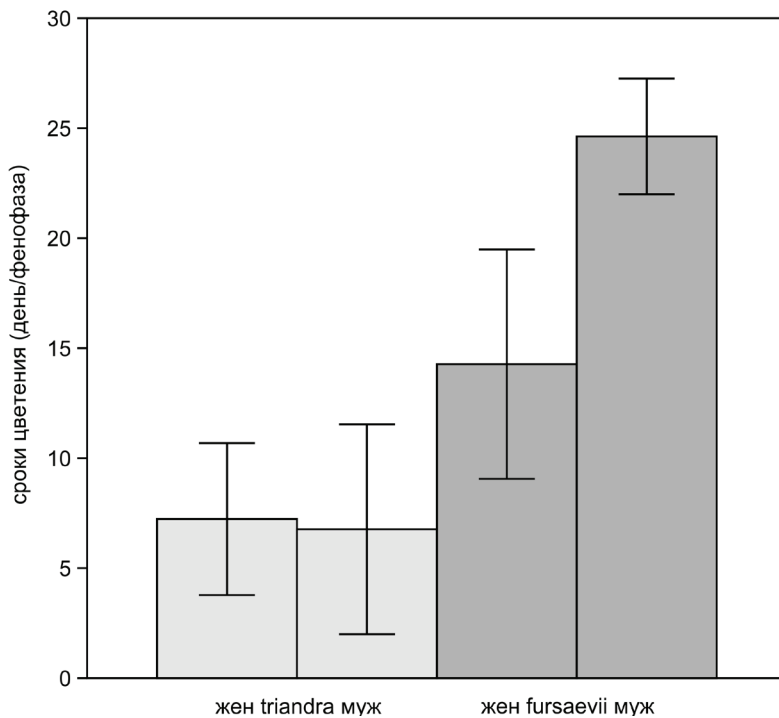


Рис. 3. Различия *Salix triandra* и *S. fursaevii* по срокам цветения. Столбцы соответствуют среднему арифметическому, «усы» – среднему квадратичному отклонению.

типы D и E были отмечены у единичных образцов – первый у образца *S. fursaevii* из местонахождения в устье р. Еруслана, второй – у образца *S. triandra* из Жигулевского заповедника. Гаплотип V, характерный для нескольких видов ВГ, таких как *S. viminalis* и *S. vinogradovii*, был отмечен у единственного образца *S. triandra* с левого берега Волги напротив Волгограда.

Таким образом, географическое распространение гаплотипов оказывается неоднородным (рис. 6). В то время как внутренний гаплотип В широко распространен по всей изученной территории (и вплоть до Якутии), родительский для него гаплотип А отмечен только у одного растения в крайней западной точке района исследований. Гаплотип В был выявлен у подавляющего большинства растений из поймы реки Волги, независимо от того, были ли они определены по морфологическим признакам как *S. triandra* (у 11 из 12) или как *S. fursaevii* (у 24 из 33). Все производные от В гаплотипы были отмечены исключительно в пойме р. Волги, причем гаплотипы С и D были выявлены только у *S. fursaevii*, а гаплотип Е – у одного образца *S. triandra*.

В табл. 4 приведен ряд популяционно-генетических параметров, рассчитанных для популяций *S. triandra* s. str. и *S. fursaevii* в программе

DNAsp. Как видно из табл. 4, *S. fursaevii* характеризуется более высоким гаплотипическим и более низким по сравнению с *S. triandra* s. str. нуклеотидным разнообразием, что связано с меньшим числом нуклеотидных различий между гаплотипами. Степень генетической дифференциации этих популяций также оказалась низкой ($G_{st} = 0,05848$, $N_{st} = 0,11313$) и не превышающей обычно наблюдаемых различий между популяциями одного вида. Значение N_{st} оказалось в два раза выше из-за того, что эта мера дифференциации популяций учитывает не только частоту гаплотипов, но и степень их сходства (Pons, Petit, 1996). Оценка числа мигрантов на поколение также весьма высока: $N_m = 4,03$ исходя из G_{st} , или $N_m = 1,96$ исходя из N_{st} . Результаты D-теста Таджимы (табл. 4) оказались статистически достоверными только для популяции *S. triandra*. Небольшое отрицательное значение теста свидетельствует об увеличении численности популяции после прохождения «бутылочного горлышка», вероятно, во время последнего оледенения. Не исключено, что долина р. Волги, сохранившая большое число гаплотипов, могла служить рефугиумом для *S. triandra* s. l. в ледниковое время.

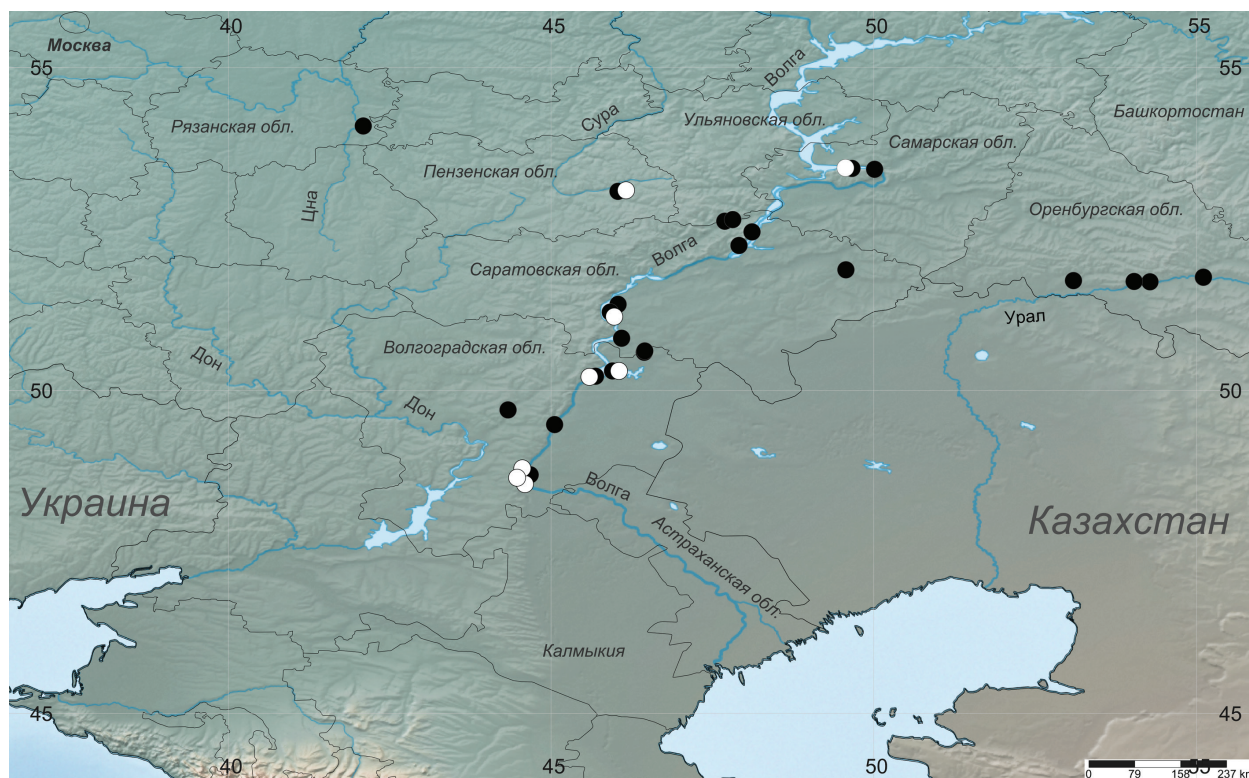


Рис. 4. Географическое распространение *Salix triandra* и *S. fursaevii*: черные кружки – *S. triandra*; белые кружки – *S. fursaevii*.

Таблица 4

Популяционно-генетические параметры *Salix triandra* и *S. fursaevii*

Популяция	no	S	h	Hd	π	k	D
<i>S. triandra</i>	45	7	4	0,171 ± 0,075	0,00099	0,606	-1,86247*
<i>S. fursaevii</i>	35	2	3	0,407 ± 0,081	0,00074	0,450	-0,14206

Примеч.: no – число последовательностей; S – число полиморфных сайтов; h – число гаплотипов; Hd – среднее гаплотипическое разнообразие ± стандартное отклонение; π – нуклеотидное разнообразие; k – среднее число нуклеотидных различий между гаплотипами; D – D-тест Таджимы, * – $p < 0,05$.

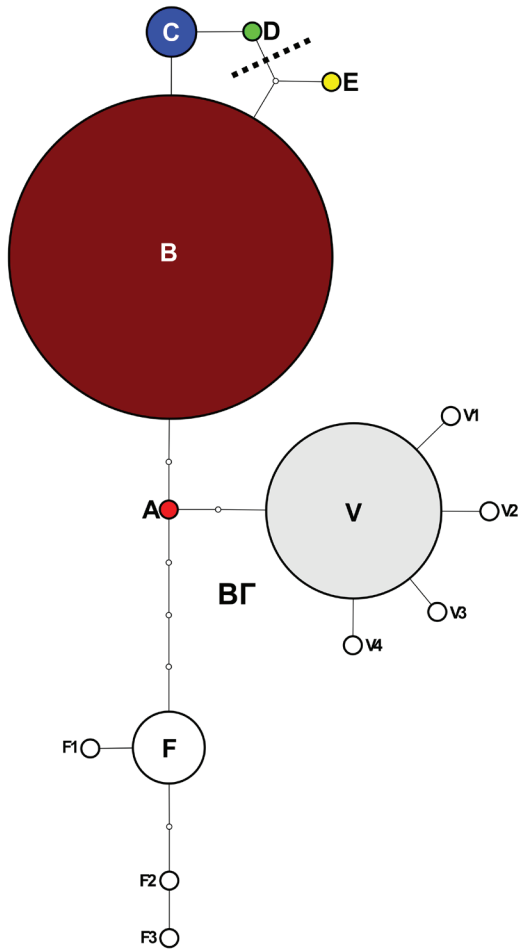


Рис. 5. Сеть гаплотипов хлоропластного участка *atpB-rbcL*. Размер кружка пропорционален числу образцов, обладающих данным гаплотипом. Белые кружки – ВГ, светло-серым цветом обозначен гаплотип, встреченный у одного образца ИГ; цветные кружки – ИГ. Маленькие кружки соответствуют гипотетическим гаплотипам, отсутствующим в выборке. Пунктирной линией обозначено положение разрыва петли.

Данные ITS1, 2 ядерной рибосомальной ДНК

Выравнивание включало большую часть внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1, начиная с 21-й позиции (мотив gaccscg), 5,8S ДНК и меньшую часть внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 до 49-й позиции (мотив

gscgscgt). Общая длина выравнивания составила 426 позиций, включая единичные одно- и двухнуклеотидные индели. После фазирования в программе DNAsp выравнивание включало 84 последовательности. Из 426 позиций 23 были информативными, 14 представляли собой аутопоморфии, 6 позиций приходились на индели.

Анализ полученной матрицы методом максимального правдоподобия в программе RAxML показал, что ИГ распадается на несколько плохо поддерживанных клад, в которых значительная часть образцов располагается на ветвях нулевой длины, так как обладает идентичными риботипами. Для лучшей визуализации это дерево представлено на рис. 7 в виде кладограммы. Как видно из рисунка, *S. triandra* и *S. fursaevii* не образовали самостоятельных клад и распределились по дереву достаточно случайно. Более того, риботипы ВГ также не образовали самостоятельной клады и распределились среди нескольких базальных ветвей совместно с образцами обоих видов ИГ. При этом поддержки большинства ветвей оказались крайне низкими.

При анализе методом статистической парсимонии, максимальное число мутационных шагов, допускающее экономное решение, рассчитанное программой TCS, было равным 8. Программа сгруппировала последовательности в 33 риботипа, но не смогла объединить все риботипы ИГ и ВГ в одну сеть: три риботипа *S. triandra* были выделены в отдельную сеть (не показано). Образцы видов ИГ и ВГ оказались перемешаны в одном из риботипов, наиболее часто встречающийся риботип включал в себя образцы как *S. triandra*, так и *S. fursaevii*, большинство риботипов (21) оказались индивидуальными. Дальнейший анализ сетей риботипов не проводился в связи с неоднозначностью интерпретации наблюдаемой картины их отношений.

Анализ плоидности

Для определения плоидности все выращенные образцы были проанализированы методом

проточной цитометрии. Все образцы исследовались в один день, на одинаковых настройках прибора (gain 553,0). По содержанию ДНК образцы не отличались друг от друга. Для верификации данных проточной цитометрии был про-

веден прямой подсчет метафазных хромосом у двух образцов. У обоих изученных образцов хромосомы мелкие, по морфологии трудно различимы, число хромосом в проанализированных образцах составило 76 ($2n = 4x = 76$) (рис. 8).

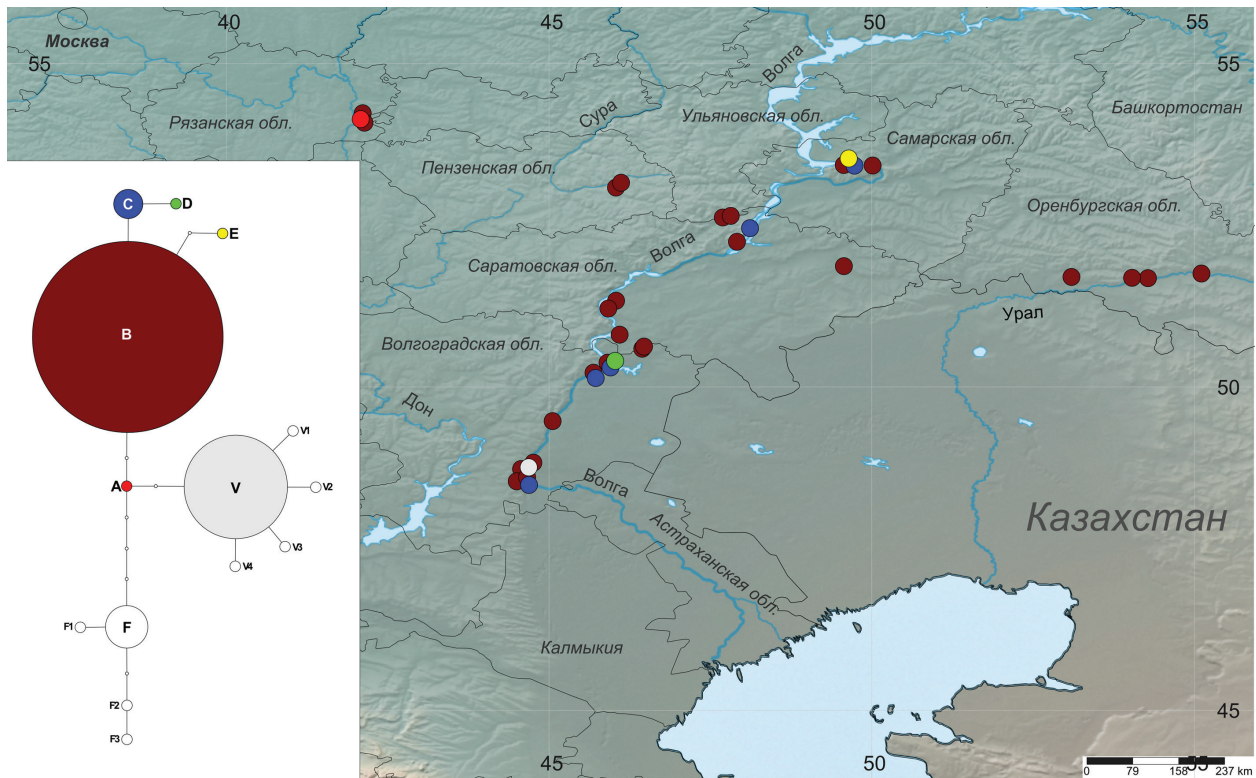


Рис. 6. Географическое распространение гаплотипов хлоропластного участка *atpB-rbcL* в исследованных популяциях *Salix triandra*.

Обсуждение

Представление об экотипах как о внутривидовых наследственно закрепленных адаптивных вариациях у растений, приспособленных к специфическим условиям климата или различным типам местообитаний, было первоначально развито Turesson (1922a, b). В этих работах Turesson исследовал множество разных видов из различных семейств и пришел к выводу, что вид в пределах своего ареала формирует ряд специфически адаптированных групп популяций, нередко обладающих и некоторыми морфологическими отличиями, представляющих собой результат взаимодействия генотипа и местообитания и никак не связанных с возможной изоляцией популяций. В дальнейшем экотипы, в том числе и экотипы, различающиеся по времени цветения, были выявлены у многих растений и изучены с различных сторон различными авторами (Sinskaja, 1938; Sanda et al., 1997; Jonstrup

et al., 2020), в том числе и у ив (Sukachev, 1935; Skvortsov, 1980; Junttila, Kaurin, 1990). В ходе подобных исследований было показано, что время цветения у ив, на примере *S. viminalis*, находится под эпигенетическим контролем (Cheng et al., 2019). Поскольку особенности развития и цветения ранне- и позднецветущих пойменных форм *S. triandra* уже были подробно описаны в работах Сукачева (Sukachev, 1935) и Скворцова (Skvortsov, 1980), основной нашей задачей была оценка степени генетической дивергенции и репродуктивной изоляции этих форм и ответ на вопрос, действительно ли их можно считать разными видами.

Точная видовая идентификация образцов *S. triandra* и *S. fursaevii* имела ключевое значение для нашего исследования. Однако диагностические признаки, приведенные в статье Мавродиёва с соавт. (Mavrodiev et al., 2012), часто не позволяли однозначно отнести образец к одному из двух видов. Диагностические признаки для

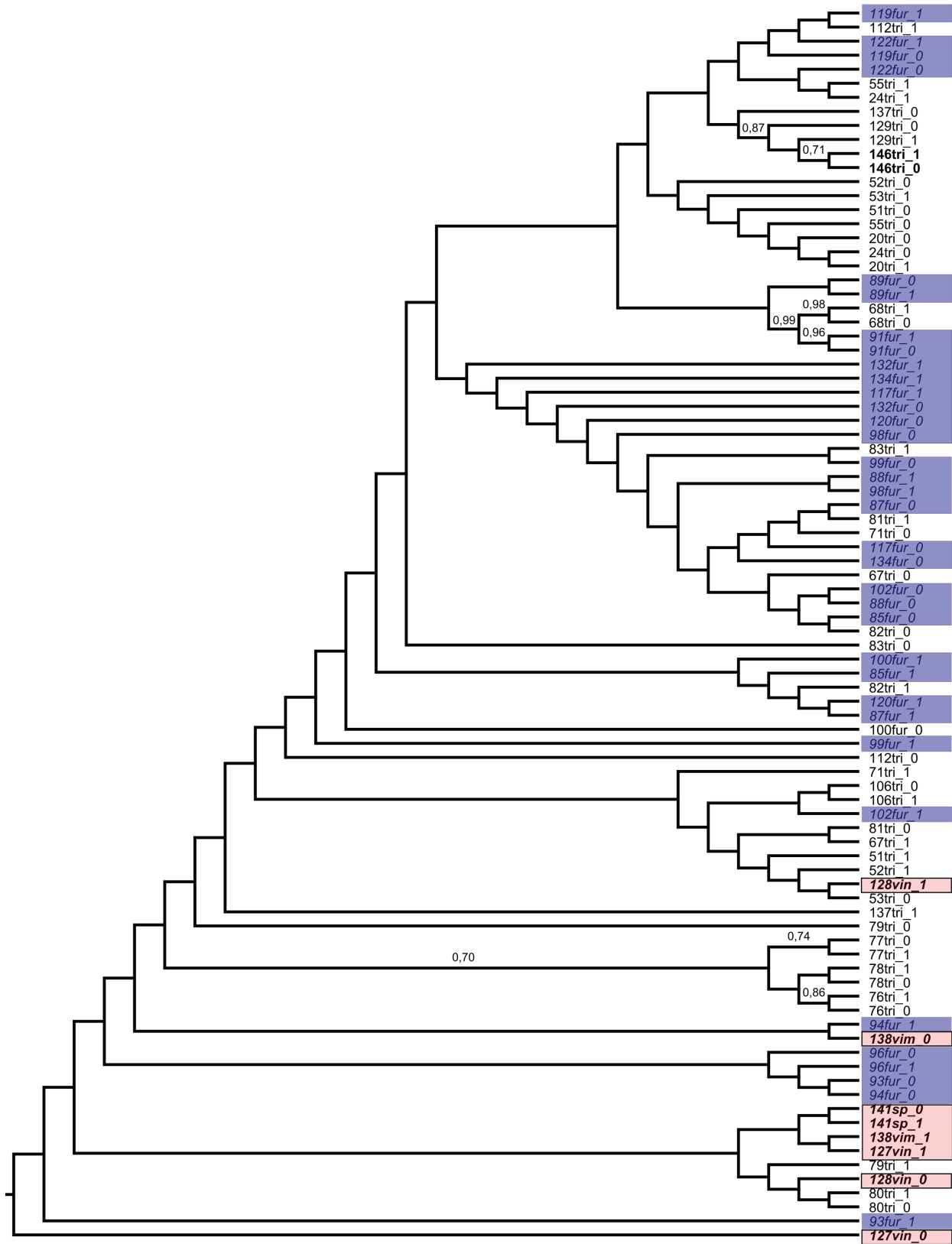


Рис. 7. Кладограмма аллелей ITS *Salix triandra*: индексы 0 и 1 обозначают номера аллелей фазированных в программе DNAsp: розовые прямоугольники – последовательности образцов ВГ; синие прямоугольники – последовательности образцов *S. fursaevii*; без выделения – последовательности образцов *S. triandra*; жирным шрифтом выделены последовательности ITS образцов из популяции 31 (Якутия). Значения бутстреп поддержки выше 0,7 указаны над ветвями.

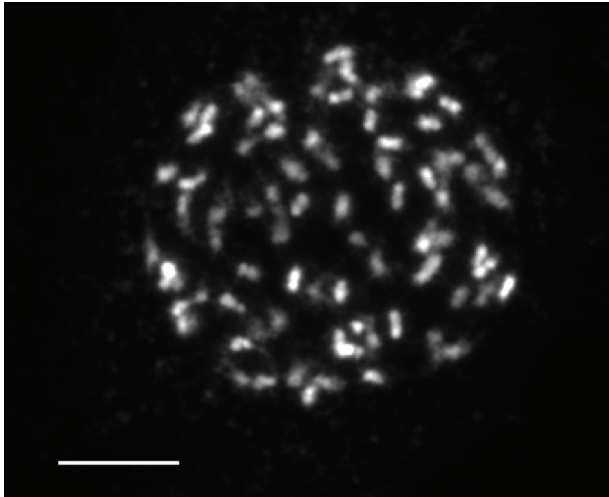


Рис. 8. Метафазные хромосомы *Salix triandra* из популяции 25. Окрашивание DAPI, масштабная линейка – 10 мкм.

мужских растений этими авторами вообще не были приведены, поэтому нами было проведено специальное исследование, позволившее с максимально возможной вероятностью идентифицировать видовую принадлежность наших образцов. Нам удалось разделить исходную выборку *S. triandra* на две группы, статистически достоверно различающиеся сроками цветения и несколькими морфологическими признаками, соответствующими *S. triandra* и *S. fursaevii*. Образцы последнего вида были строго приурочены к пойме реки Волги за исключением нескольких образцов из верховьев реки Суры (популяция 25). Особенно контрастными были различия по срокам цветения (рис. 3). Однако молекулярно-генетическое исследование показало отсутствие генетической дифференциации между двумя этими группами. Распределение образцов по клатам дерева, полученного по данным ITS ядерной рибосомальной ДНК, было совершенно хаотичным и никак не связанным с их видовой принадлежностью. Таким образом, результат, полученный Мавродиным с соавт. (Mavrodiev et al., 2012), когда оба вида образовали на дереве сестринские клаты, можно с полным основанием считать артефактом недостаточной выборки. По пластидному маркеру *atpB-rbcL* ситуация несколько иная, так как в этом случае два гаплотипа, С и D, оказались характерными только для образцов *S. fursaevii*, а гаплотипы А и Е – для *S. triandra*. Все гаплотипы, кроме А, были отмечены исключительно в пойме Волги. Вместе с тем, большинство образцов обоих видов, как в долине Волги, так и за ее пределами оказались

носителями широко распространенного гаплотипа В, анцестрального для трех упомянутых выше гаплотипов. Среди последних только гаплотип С был отмечен в нескольких локальных популяциях по всей долине, от Самары до Волгограда. Гаплотипы D и E были встречены лишь единожды. Находка гаплотипа V, характерного для видов внешней группы, у одного образца *S. triandra* из популяции 28 на берегу Волги напротив Волгограда, скорее всего, связана с гибридизацией с одним из видов внешней группы, так как этот гаплотип широко распространен среди растущих в ближайших окрестностях *S. viminalis*, *S. vinogradovii* и *S. acutifolia*. В целом, характер распространения гаплотипов в пойме р. Волги и на прилегающих территориях может свидетельствовать о каких-то начальных стадиях генетической дифференциации ранне- и позднецветущей форм *S. triandra*, но никак не о видовом уровне различий. Об этом же говорят низкие значения статистик Gst и Nst и, соответственно, высокие оценки числа мигрантов на поколение. При этом все исследованные нами образцы *S. triandra*, в том числе и один из образцов, определенных как *S. fursaevii*, оказались тетраплоидами ($2n = 4x = 76$), что опровергает предположение Мавродинова с соавт. (Mavrodiev et al., 2012) о возможной дифференциации этих двух видов по уровню пloidности. Здесь следует отметить, что в литературе преобладают указания на диплоидное число хромосом ($2n = 2x = 38$) у *S. triandra* в Западной и Центральной Европе (Blackburn, Heslop-Harrison, 1924; Wilkinson, 1944; Fedorova-Sarkisova, 1946; Löve, 1954; Neumann, Polatschek, 1972). В «CCDB chromosome counts database» (Rise et al., 2015) достаточно часто встречаются также указания на триплоиды ($2n = 3x = 57$), а также ди- и тетраплоиды с другим основным числом хромосом $n = 22$ (в т. ч. у Blackburn, Heslop-Harrison, 1924; Wilkinson, 1944; Fedorova-Sarkisova, 1946; Hörandl et al., 2002). Такая изменчивость чисел хромосом в пределах одного вида, вероятно, говорит о его неоднородности, связанной со сложной историей и генетической структурой его популяций в огромном евро-азиатском ареале. Однако детального исследования морфологической, кариологической и генетической изменчивости *S. triandra* по всему ареалу этого вида никем до сих пор не предпринималось. *Salix triandra* была описана Линнеем в «Species Plantarum» (Linnaeus, 1753) по материалам из Швейцарии и Сибири. В этой же публикации Линней описал *S. amygdalina*,

которая отличается от *S. triandra* окраской обратной стороны листовой пластинки. Эти два вида трактовались разными ботаниками в качестве подвидов (Arcangeli, 1882; Rechinger, 1957; Hörandl et al., 2002), разновидностей (Wimmer, Grabowski, 1829; Lejeune, Courtois, 1836; Koch, 1837; Andersson, 1868; Seemen, 1908; Sell, 2018) и форм (Skvortsov, 1968, 1999; Belyaeva, Govaerts, 2022; Belyaeva et al., 2022). Скворцов (Skvortsov, 1968, 1999) выделил помимо основного подвида, *S. triandra* subsp. *triandra*, который распространен в Евразии, еще два подвида: *S. triandra* subsp. *nipponica* (Franch. et Sav.) A. K. Skvortsov, отличающийся наличием воскового налета на побегах, с распространением в Восточной Сибири, на Дальнем Востоке, Китае и Японии, и *S. triandra* subsp. *bornmuelleri* (Hauskn.) A. K. Skvortsov, который отличается наличием опушения листьев и побегов и распространен в Малой Азии. В «World Checklist of Vascular Plants» (Belyaeva, Govaerts, 2022) признаются два подвида: *S. triandra* subsp. *triandra* и *S. triandra* subsp. *bornmuelleri*, а *S. triandra* subsp. *nipponica* трактуется как самостоятельный вид (Nedoluzhko, 1995; Belyaeva, Govaerts, 2022). Однако в отсутствие детальных работ по изменчивости и филогеографии *S. triandra* делать какие-либо выводы о генетической или таксономической структуре этого вида мы считаем преждевременным.

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование убеждает в правильности рассмотрения позднецветущих растений *S. triandra* в качестве экотипа, возникшего как локальное приспособление пойменных популяций к высоким паводкам, а вовсе не самостоятельного вида *S. fursaevii*. Последнее название следует считать синонимом *S. triandra*. Высокая концентрация редких гаплотипов в пойме р. Волги, вероятно, имеет совершенно другое объяснение, не связанное с видообразованием. Территория поймы р. Волги могла служить рефугиумом для *S. triandra* в ледниковое время и одним из источников экспансии этого вида после отступления ледника, о чем свидетельствует, в частности, отрицательное значение D-теста Таджимы. Вместе с тем, нельзя исключить и связь гаплотипа С, специфич-

ного для позднецветущей формы *S. triandra*, с приспособлением к особенностям паводкового режима р. Волги. Если это действительно так, то еще в недавнее время гаплотип С мог быть шире распространен в пойме Волги. На это указывает сокращение численности как ранне-, так и позднецветущих ив в пойме Волги в связи с зарегулированием ее стока после создания каскада гидроэлектростанций и соответствующих водохранилищ (Nevidomov, 2003). По нашим полевым наблюдениям, смещение сроков цветения у позднецветущих растений, наблюдавшееся в 2019 и 2020 гг., было не столь велико, как описывается в литературе 1930-х и 1950-х гг. и в статье Мавродиева с соавт. (Mavrodiev et al., 2012). В 2019 г. при крайне низком уровне воды в Волге в окрест. г. Волгограда все позднецветущие ивы цвели уже в середине июня, а в 2020 г., при высоком уровне воды, в середине июня цветение даже не намечалось. Для проверки предположения связи гаплотипа С с феноменом позднего цветения у *S. triandra* можно попытаться секвенировать участок *atpB-rbcL* из старых гербарных образцов позднецветущих ив. Если данный гаплотип окажется преобладающим, нельзя будет исключить, что нынешнее преобладание гаплотипа В в пойме Волги связано с гибридизацией между ранне- и позднецветущей формами и вытеснением последней после изменения гидрорежима. Это, однако, может быть темой отдельного исследования.

Благодарности

Авторы благодарны сотрудникам Гербария ГБС РАН (МНА) М. Б. Носовой и Н. Ю. Степановой, а также Ботанического сада СГУ (Саратов) А. С. Кашину и А. С. Пархоменко, участвовавшим в полевых исследованиях и сборе материала и давшим разрешение на работу с коллекциями Гербариев МНА и SARBG, соответственно; А. П. Ефимовой (ИБПК СО РАН, Якутск), любезно предоставившей в наше распоряжение образцы *S. triandra* из Якутии.

Работа выполнена в рамках государственного задания ГБС РАН № 122042700002-6 и при финансовой поддержке РФФИ, грант № 19-04-01308. Благодарим Министерство науки и высшего образования за поддержку ЦКП «Гербарий ГБС РАН», грант № 075-15-2021-678.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

Andersson N. J. 1868. Salicineae: *Salix* L. In: A. P. De Candolle *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Vol. 16(2). Parisiis: Sumptibus Victoris Masson et filii. Pp. 190–323.

- Arcangeli G.** 1882. Salicaceae. In: *Compendio della Flora Italiana*. Roma e Firenze: presso la stessa Casa. Pp. 625–630.
- Belyaeva I. V., Epanchintseva O. V., Erokhin N. G., Govaerts R. H. A., Salmina N. P., Veselkin D. V., Vorobio, A. A., Zvezdina E. M., Semkina L. A.** 2022. Annotated catalogue of herbarium specimens of *Salix* L. (Salicaceae) associated with the work of Veniamin I. Shaburov in the Urals (Russia). *Skvortsovia* 8, 1: 1–144. DOI: 10.51776/2309-6500_2022_8_1_1
- Belyaeva I. V., Govaerts R. H. A.** 2022. Genera *Populus* L. and *Salix* L. In: R. H. A. Govaerts (ed.) *The World Checklist of Vascular Plants*. Kew: Royal Botanic Gardens. URL: <https://wcvp.science.kew.org> (Accessed 24 August 2022).
- Blackburn K. B., Heslop-Harrison J. W.** 1924. A preliminary account of the chromosomes and chromosome behavior in the Salicaceae. *Ann. Bot.* 38: 361–378.
- Cheng Y.-H., Peng X.-Y., Yu Y.-C., Sun Z.-Y., Han L.** 2019. The Effects of DNA methylation inhibition on flower development in the dioecious plant *Salix viminalis*. *Forests* 10, 173. DOI: 10.3390/f10020173
- Clement M., Posada D., Crandall K. A.** 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1659.
- Crandall K. A., Templeton A. R.** 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959–969.
- Daniels S. E.** 2003. Preparation and direct automated cycle sequencing of PCR products. In: J. M. S. Bartlett, D. Stirling (eds.). *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 226. Totowa, New Jersey: Eds. Bartlett J. M. S., Stirling, D. Humana Press. Pp. 341–346. DOI: 10.1385/1-59259-384-4:341
- Doyle J. J., Doyle J. L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Elder D., Klein J., Antonelli A., Silvestro D.** 2021. raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Meth. Ecol. Evol.* 12: 373–377. DOI: 10.1111/2041-210X.13512
- Fedorova-Sarkisova O. V.** 1946. On the number of chromosomes of some willow and poplar species. *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, 54(4): 357–360. [In Russian] (**Фёдорова-Саркисова О. В.** О числе хромосом некоторых видов ив и тополей // Доклады Академии наук СССР, 1946. Т. 54, № 4. С. 357–360.
- Fursaev A. D.** 1937. On speciation in river flood plains. *Sovetsk. Bot.* 3: 33–40. [In Russian] (**Фурсаев А. Д.** К вопросу о видообразовании в условиях пойм рек // Сов. бот., 1937. № 3. С. 33–40).
- Fursaev A. D.** 1940. *To the knowledge of flora and vegetation of the Lower Volga valley*. Doct. diss. Saratov. 559 pp. [In Russian] (**Фурсаев А. Д.** К познанию флоры и растительности долины Нижней Волги. Дис. ... докт. биол. наук. Саратов, 1940. 559 с.).
- Hall T. A.** 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hammer O., Harper D. A., Ryan P. D.** 2001. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeont. Electronica* 4(1): 9.
- Hörandl E., Florineth F., Hadacek F.** 2002. *Weiden in Österreich und angrenzenden Gebieten*. Wien: Ferdinand Berger & Söhne GmbH. 164 pp.
- Jonstrup A., Hedrén M., Oja T., Talve T., Andersson S.** 2020. The evolution of spring fen ecotypes in *Rhinanthus*: genetic evidence for parallel origins in Scandinavia after the last ice age. *Pl. Syst. Evol.* 306: 35. DOI: 10.1007/s00606-020-01662-y
- Junntila O., Kaurin Å.** 1990. Environmental control of cold acclimation in *Salix pentandra*. *Scand. J. Forest Res.* 5: 195–204.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T.** 2002. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30: 3059–3066.
- Katoh K., Standley D. M.** 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780.
- Kirov I., Divashuk M., Van Laere K., Soloviev A., Khrustaleva L.** 2014. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. *Mol. Cytogenet.* 7(1): 1–10.
- Koch W. D. J.** 1837. *Salix* L. In: W. D. J. Koch. W. D. J. *Synopsis Florae Germaniae et Helveticae*. Francofurti ad Moenum: Sumptibus Friederici Wilmann. Pp. 641–660.
- Kozlov A.M., Darriba D., Flouri T., Morel B., Stamatakis A.** 2019. RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35: 4453–4455.
- Laktionov A P., Pilipenko A. P., Vostrikova N. O., Mavrodiiev E. V.** 2012. Notes on Fursajew’s theorem of endemism in the Volga valley flora. *Natural Sciences* 2(39): 13–17. [In Russian] (**Лактионов А. П., Пилипенко В. Н., Вострикова Н. О., Мавродиив Е. В.** Заметки о теореме Фурсаева (К вопросу об эндемизме флоры Поволжья, его оценках и перспективах изучения) // Естественные науки, 2012. № 2(39). С. 13–17).
- Lejeune A. L. S., Courtois R.** 1836. *Salix* L. In: *Compedium Florae Belgicae*. Vol. 3. Verdiae: Remagle A., Typographum et Bibliopolam. Pp. 265–278.

- Linnaeus C.** 1753. *Salix*. In: *Species Plantarum*. Vol. 2. Holmiae. Pp. 1015–1022.
- Löve A.** 1954. Cytotaxonomical evaluation of corresponding taxa. *Vegetatio* 5–6: 212–224.
- Mavrodiev E. V., Laktionov A. P., Alexeev Yu. E.** 2012. On the new species *Salix fursaevii* Mavrodiev in context of the old question about rapid speciation in river plains. *Byull. Moskovsk. Obshch. Isp. Prir., Otd. Biol.* 117, 4: 62–68. [in Russian] (**Мавроди́ев Е. В., Лактио́нов А. П., Алексе́ев Ю. Е.** О новом для науки виде, иве Фурсаева (*Salix fursaevii* Mavrodiev sp. nova), в связи со старым вопросом о быстром видообразовании в условиях пойм рек // Бюл. МОИП. Отд. биол., 2012. Т. 117, вып. 4. С. 62–68).
- Nedoluzhko V. A.** 1995. Salicaceae Mirb. In: S. S. Charkevich S. S. (ed.) *Plantae Vasculares Orientis Extremi Sovietici*. Vol. 7. St. Petersburg: Nauka. Pp. 145–212. [In Russian] (**Недолужко В. А.** Salicaceae Mirb. // Сосудистые растения Советского Дальнего Востока. Т. 7. СПб.: Наука, 1995. С. 145–212).
- Neumann A., Polatschek A.** 1972. Cytotaxonomischer Beitrag zur Gattung *Salix*. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 76: 619–633.
- Pons O., Petit R. J.** 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144(3): 1237–1245. DOI: 10.1093/genetics/144.3.1237
- Rechinger K. H.** 1957. *Salix* L. In: G. Hegi (ed.). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Ed. 2. Bd. 3(2). München: Carl Hanser. Pp. 44–135.
- Rice A., Glick L., Abadi S., Einhorn M., Kopelman N. M., Salman-Minkov A., Mayzel J., Chay O., Mayrose I.** 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytol.* 206(1): 19–26. URL: <http://ccdb.tau.ac.il/Angiosperms/Salicaceae/Salix/Salix%20triandra%20L>. (Accessed 17 June 2022).
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sanchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E., Sanchez-Gracia A.** 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molec. Biol. Evol.* 34: 3299–3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
- Sanda S., John M., Amasino R.** 1997. Analysis of flowering time in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *J. Heredity* 88(1): 69–72.
- Seemen O., von.** 1908. *Salix* L. In: P. F. A. Ascherson P. F. A., K. O. R. Graebner K. O. R. (eds.). *Synopsis der Mitteleuropäischen Flora*. Bd. 4. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann. Pp. 54–350.
- Sell P. D.** 2018. *Flora of Great Britain and Ireland*. Vol. 1 (Lycopodiaceae – Salicaceae). Cambridge: Cambridge University Press. 787 pp.
- Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E., Small R. L.** 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *Amer. J. Bot.* 94: 275–288. DOI: 10.3732/ajb.94.3.275
- Shorthouse D. P.** 2010. SimpleMappr, an online tool to produce publication-quality point maps. URL: <https://www.simplemappr.net/> (Accessed 01 February 2022).
- Sinskaja E. N.** 1938. Ecotype concept and its value for the phylogeny of higher plants. *Uspekhi Sovrem. Biol.* 9(1): 1–15. [In Russian] (**Синская Е. Н.** Учение об экотипах в свете филогенеза высших растений // Успехи современной биологии, 1938. Т. 9, вып. 1. С. 1–15).
- Skvortsov A. K.** 1968. *Willows of the USSR. A taxonomic and geographic revision*. Moscow: Nauka. 262 pp. [In Russian] (**Скворцов А. К.** Ивы СССР. Систематический и географический обзор. М.: Наука, 1968. 262 с.).
- Skvortsov A. K.** 1980. The works of V. N. Sukachev on the late-flood-plain ecotypes of willows. *Byull. Moskovsk. Obshch. Isp. Prir., Otd. Biol.* 85, 3: 89–97. [In Russian] (**Скворцов А. К.** Работы В. Н. Сукачева по изучению позднепойменных экотипов ив // Бюл. МОИП. Отд. биол., 1980. Т. 85, вып. 3. С. 89–97).
- Skvortsov A. K.** 1999. *Willows of Russia and adjacent countries. Taxonomical and geographical revision*. Joensuu: Univ. Joensuu. 307 pp.
- Stamatakis A.** 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Sukachev V. N.** 1935. On a new kind of ecotypes in some plants. *Trudy Leningradsk. Obshch. Estestvoisp.* 64(2): 209–217. [In Russian] (**Сукачев В. Н.** О новом роде экотипов у некоторых растений // Тр. Ленинградского общества естествоиспытателей, 1935. Т. 64, вып. 2. С. 209–217).
- Turesson G.** 1922a. The species and the variety as ecological units. *Hereditas* 3: 100–113.
- Turesson G.** 1922b. The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas* 3: 211–350.
- Wen J., Zimmer E.** 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molec. Phylogen. Evol.* 6: 167–177. DOI: 10.1006/mpev.1996.0069
- Wilkinson J.** 1944. The cytology of *Salix* in relation to its taxonomy. *Ann. Bot., n. s.* 8(30/31): 270–284.
- Wimmer C. F. H., Grabowski H. E.** 1829. *Salix* L. In: *Flora Silesiae*. Vol. 2. Vratislaviae: G. T. Korn. Vol. 2. Pp. 357–385.