



УДК 582.736+575.857(470+571)

## О генетической структуре популяций *Eversmannia subspinoso* в России

Н. Ю. Степанова<sup>1,2</sup>, А. В. Федорова<sup>1,3</sup>, И. А. Шанцер<sup>1,4\*</sup>

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

<sup>2</sup>E-mail: ny\_stepanova@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8414-4794>

<sup>3</sup>E-mail: alina\_77777@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7362-2124>

<sup>4</sup>E-mail: ischanzer@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4216-9923>

\* Автор для переписки

**Ключевые слова:** генетическая структура, популяция, *Eversmannia*, Fabaceae.

**Аннотация.** Проведено исследование генетической структуры популяций *Eversmannia subspinoso* (Fisch. ex DC.) B. Fedtsch. с территории России (г. Большое Богдо, Астраханская область; балка Кегульта, Республика Калмыкия) и ряда образцов из Средней Азии (Казахстан, Киргизия) с применением межмикросателлитных (ISSR) маркеров, секвенированных ядерных (ITS 1,2) и хлоропластных маркеров (*trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *rpl32-trnL(UAG)*, *trnV-ndhC*). Анализ межмикросателлитных маркеров разделил исследованные образцы на три генетических кластера: популяция г. Большое Богдо, популяция из балки Кегульта, образцы из Средней Азии. Показано, что популяция из балки Кегульта является генетически вариабельной, тогда как популяция с г. Большое Богдо оказалась однородной. Результаты анализа хлоропластных участков ДНК показали общее родство популяций г. Большое Богдо и балки Кегульта. В то же время эти крайние западные популяции оказались наиболее родственными исследованным образцам из Западного Тянь-Шаня: Сырдарьинского Каратау, Таласского Алатау (гор Ичкеле-Тоо) и Кызылординской области Казахстана.

## On the genetic structure of *Eversmannia subspinoso* populations in Russia

N. Yu. Stepanova, A. V. Fedorova, I. A. Schanzer\*

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

\* Corresponding author

**Keywords:** *Eversmannia*, Fabaceae, genetic structure, population.

**Summary.** We have studied the genetic structure of *Eversmannia subspinoso* (Fisch. ex DC.) B. Fedtsch. populations from the Russian Federation (the Bolshoe Bogdo Mt., the Astrakhan Region; Kegul'ta gully, Republic of Kalmykia) and a number of specimens from the Middle Asia (Kazakhstan and Kyrgyzstan) using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers, sequenced nuclear (ITS 1, 2) and chloroplast markers (*trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *rpl32-trnL(UAG)*, *trnV-ndhC*). The analysis of ISSR markers divided samples into three genetic clusters: the population from the Bolshoe Bogdo Mt., the population from the Kegul'ta gully, and samples from the Middle Asia. The population from the Kegul'ta gully appeared to be genetically variable, whereas the population from the Bolshoe Bogdo Mt. exhibited no variation. Populations from the Bolshoe Bogdo and Kegul'ta are more closely related according to the results of the chloroplast DNA analysis. At the same time, these westernmost populations turned out to be related to the samples from the Western Tian Shan: Syr-Darya Karatau, Talas Alatau (Ichkele-Too Mts.) and Kyzylorda Region of Kazakhstan.

*Eversmannia* Bunge – олиготипный род, включающий широко распространенный вид *Eversmannia subspinosa* (Fisch. ex DC.) V. Fedtsch. (*E. hedysaroides* Bunge) и три эндемика Памиро-Алая: *E. botschantzevii* Sarkisova (Гиссарский хребет), *E. sarytavica* Sarkisova (Заравшанский хребет), *E. sogdiana* Ovcz. (Туркестанский хребет) (Ovczinnikov, 1978; Sarkisova, 1981; Vassilyeva, 1987).

*E. subspinosa* (эверсмания почти-колючая) представляет собой небольшой кустарник 15–60 см высотой с растрескивающейся желтовато-серой корой, с восходящими ветвями и редкими пазушными шипами до 2 см длиной, годичные побеги, цветоносы и черешки листьев сероватые

от обильного прижатого опушения, листья непарно-перистые из 3–7 пар эллиптических или обратно-яйцевидных заостренных листочков, снизу так же обильно опушенных прижатыми волосками; цветки пурпурные, собраны в кисти на длинных, превышающих листья, пазушных цветоносах; чашечка прижато-волосистая (рис. 1). Как и остальные представители рода, *E. subspinosa* произрастает преимущественно на выходах пестроцветов, третичных глин, красных песчаников, на щебнисто-каменистых, сухих глинистых склонах, в песчаных и глинисто-солончаковых пустынях (Sarkisova, 1981; Vassilyeva, 1987).



Рис. 1. *Eversmannia subspinosa* из окрестностей п. Кегульта, Республика Калмыкия, Россия, 29 V 2021 (фото Н. Ю. Степановой).

Ареал *E. subspinosa* простирается от предгорий Западного Тянь-Шаня на востоке, через всю центральную часть Средней Азии, заходя южнее в Иран и Афганистан, а на западе доходит до юго-восточных районов европейской части России (Svyazeva, Kamelin, 1986).

С территории России до недавнего времени было известно лишь одно достоверное место произрастания *E. subspinosa* – на склонах г. Большое Богдо в Астраханской области (Laktionov, 2018). Это местонахождение на северо-западном пределе ареала, на территории Прикаспийской

низменности, связывают с сохранившимися подходящими условиями для произрастания вида на возвышенностях, которые не подверглись затоплению морскими водами во время Хвалынской трансгрессии Каспийского моря 11–16 тыс. лет назад – так называемые «острова рефугиумы» (Yanina, 2012; Voloboeva, Laktionov, 2019; Laktionov, Voloboeva, 2021). В 2021 г. А. П. Лактионов с коллегами (Laktionov et al., 2021) обнаружили новую точку распространения вида близ п. Кегульта (Республика Калмыкия), которая оказалась наиболее западной в ареале и удаленной от места произрастания на г. Большое Богдо более чем на 200 км к западу. Новая популяция была обнаружена исследователями в верховьях балки Кегульта на восточном макросклоне возвышенности Ергени. С точки зрения истории развития Прикаспийской низменности, на момент Хвалынской трансгрессии данная территория являлась высоким берегом Каспийского моря и могла не затапливаться подобно г. Большое Богдо (Yanina, 2012). Соответственно, можно предположить, что популяции *E. subspinoso* из балки Кегульта и с г. Большое Богдо являются реликтами-анклавами одной популяции, некогда более широко распространенной на территории Прикаспия. Нами предпринята

попытка изучить генетическую структуру этих популяций и сравнить с образцами из основной части ареала (Казахстан, Киргизия) для установления их вероятных родственных связей.

### Материалы и методы

Общий объем выборки *E. subspinoso* составил 20 образцов: 4 образца из балки Кегульта (Республика Калмыкия), 6 образцов с г. Большое Богдо (Астраханская область) и 10 образцов из Средней Азии (Казахстан, Киргизия) были отобраны из гербариев Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE) и Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина РАН (МНА). Полный список всех исследованных образцов приведен в табл. 1. Географическое распространение исследованных образцов *E. subspinoso* показано на рис. 2, построенном в программе “SimpleMappr” (Shorthouse, 2010).

Гербарные образцы под номерами KZ1 и KZ2 предположительно могли принадлежать одному и тому же растению и представлять собой две отдельно смонтированные его части. Для проверки этого предположения образцы были исследованы независимо.



Рис. 2. Географическое положение исследованных популяций *Eversmannia subspinoso*. Буквенные обозначения популяций соответствуют таблице 1: Треугольники – популяции из России, кружочки – популяции из Средней Азии. Красным цветом обозначены популяции, составившие первую эволюционную линию по результатам анализа хлоропластных участков (*atpB-rbcL*, *trnV-ndhC*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*) в программе TCS, желтым – вторую.

Таблица 1  
Исследованные популяции *Eversmannia subspinoza* и номера последовательностей ДНК, депонированных в GenBank NCBI, с указанием гаплотипов объединенного выравнивания хлоропластных участков (*atpB-rbcL*, *trnV-ndhC*, *rp132-trnL*, *trnL-trnF*)

Образец	Данные этикетки образца	ITS1,2	<i>trnL-trnF</i>	<i>rp132-trnL</i> (UAG)	<i>trnV-ndhC</i>	<i>atpB-rbcL</i>	хп гаплотип
K1	Россия, Респ. Калмыкия, Кетченеровский р-н, 4,5 км к СВ от п. Кугульга. 11 V 2021. Н. Ю. Степанова, С. А. Полуэктов, Е. А. Ермакова. N46.95703, E44.47135 (МНА)	OM368599	ON237544	ON237504	ON237524	ON237484	A
K2	Россия, Респ. Калмыкия, Кетченеровский р-н, 4,5 км к СВ от п. Кугульга. 11 V 2021. Н. Ю. Степанова, С. А. Полуэктов, Е. А. Ермакова. N46.95703, E44.47135 (МНА)	OM368600	ON237545	ON237505	ON237525	ON237485	A
K3	Россия, Респ. Калмыкия, Кетченеровский р-н, 4,4 км к СВ от п. Кугульга, балка, склон западной экспозиции, разноотправное сообщество. 29 V 2021. Н. Ю. Степанова. N46.95671, E44.47212 (МНА)	OM368601	ON237546	ON237506	ON237526	ON237486	B
K4	Россия, Респ. Калмыкия, Кетченеровский р-н, 4,4 км к СВ от п. Кугульга, балка, склон западной экспозиции, разноотправное сообщество. 29 V 2021. Н. Ю. Степанова. N46.95671, E44.47212 (МНА)	OM368602	ON237547	ON237507	ON237527	ON237487	C
GB1	Россия, Астраханская обл., г. Большое Богдо близ оз. Баскунчак, ниж. часть ЮВ склона. 24 V 1990. Г. Климова, Т. Рыбникова, В. Сагалаев, И. Шанцер (МНА0182612)	OM368603	ON237548	ON237508	ON237528	ON237488	A
GB2	[Россия], Астраханская обл., у оз. Баскунчак, г. Большое Богдо. В верхней части склона С экспозиции. 29 V .1994. А. В. Попов (МНА0182613)	OM368604	ON237549	ON237509	ON237529	ON237489	A
GB3	Россия, Астраханская обл., г. Богдо. Осыпь под западной вершиной. 28–30 V 1994. А. К. Скворцов, М. В. Костина (МНА0086781)	OM368605	ON237550	ON237510	ON237530	ON237490	A
GB4	Россия, Астраханская обл., г. Богдо. Осыпь под западной вершиной. 28–30 V 1994. А. К. Скворцов, М. В. Костина (МНА0086780)	OM368606	ON237551	ON237511	ON237531	ON237491	A
GB5	Россия, Астраханская обл., г. Богдо. Осыпь под западной вершиной. 28–30 V 1994. А. К. Скворцов, М. В. Костина (МНА0086776)	OM368607	ON237552	ON237512	ON237532	ON237492	A
GB6	Россия, Астраханская обл., г. Богдо. Осыпь под западной вершиной. 28–30 V 1994. А. К. Скворцов, М. В. Костина (МНА0086775)	OM368608	ON237553	ON237513	ON237533	ON237493	A

Таблица 1 (окончание)

Образец	Данные этикетки образца	ITS1,2	trnL-trnF	rp132-trnL (UAG)	trnV-ndhC	atrB-rbcL	хп гаплотип
KZ1	Казахстан, Джамбульская обл., Мойынкумский р-н б трасса Алма-Ата – Балхаш, 320 км от Алма-Аты. Глинистая пустыня. 13 V 2011. Т. Коновалова, Н. Шевырёва, Ю. Пирогов; det. В. Бочкин (МНА)	OM368609	ON237554	ON237514	ON237534	ON237494	G
KZ3	Казахстан, Гурьевская обл. В15 км ВСВ Маката по дороге на Кандатгач. Солончаковатый луг. 06 VI 1956. А. Юнагов, Л. Кузнецов (LE)	OM368611	ON237555	ON237515	ON237535	ON237495	L
KZ4	[Казахстан], Мангышлакская обл. Плато Мангышлак (восточная часть). 10 км к ЮВ от кол. Сенек (пески Тьоесу). Эродированный склон чинка. Заросли <i>Sarcopoda grandiflora</i> по саю. 18 V 1980. И. Н. Сафронова, М. Д. Уфимцева (LE)	OM368612	ON237556	ON237516	ON237536	ON237496	H
KZ5	[Казахстан, Актюбинская область], Kazakhstan occidentalis, prov. Akjubinsk, южнее пос. Жаркамыс. Мел. хр. Чиркала. Останцы у оз. Акколь. 23 VII .1964. Г. Черкасова. LE	OM368613	ON237557	ON237517	ON237537	ON237497	J
KZ6	[Казахстан], Карагандинская область, 12 км к вост. от ст. Жана-Арка. Псаммофит-разнотравно-ковыльная степь. 09 VII 1958. № 6286. И. В. Борисова (LE)	OM368614	ON237558	ON237518	ON237538	ON237498	I
KZ7	[Казахстан] Восточный Бетпак-Дала. Западное побережье оз. Балхаш, вблизи Мын-Арал [Жамбылская область, Мойынкумский район, село Мынарал]. По глинистой пустыне. 07 VI 1949. В. П. Голоскоков (LE)	OM368615	ON237559	ON237519	ON237539	ON237499	K
KZ8	[Киргизия] Казахская ССР, Карагандинская область, горы Кзыл-Джал. Лог с кустарниковыми зарослями. 29 VII 1958. З. В. Карамышева (LE)	OM368616	ON237560	ON237520	ON237540	ON237500	F
KZ9	Казахстан. Перевал возвышенности северного склона Сырдарьинского Карагау между сел. Чулак-Курган и Кумкаг, окрестности оз. Кузылколь. [Туркестанская область, Сузакский район, в районе озера Кызылколь]. 17 V 1977. № 1705. Р. В. Камелин, М. И. Михайлова, А. П. Мищенко, И. Н. Сафронова, В. И. Соловьев (LE)	OM368617	ON237561	ON237521	ON237541	ON237501	D
KZ10	[Киргизия] Таласская долина, горы Ичкеле-Тоо, против с. Орловка. 3 VII 2005. Г. А. Лазьков (LE)	OM368618	ON237562	ON237522	ON237542	ON237502	D
KZ11	[Казахстан], Кызыл-Ординск. округ. В глинистой степи у дороги от пос. Аман-Таш и кол. Колдын-Кудук. 11 VI 1929. С. Ю. Липшиц; № 58 (LE)	OM368619	ON237563	ON237523	ON237543	ON237503	E

**Молекулярные методы**

Тотальная ДНК была выделена из сухих листьев образцов коммерческим набором NucleoSpin Plant kit (Macherey-Nagel, Германия) согласно протоколу производителя. Наличие и качество ДНК оценивали визуально в 1%-м агарозном геле (Amresco) с окрашиванием бромидом этидия. По результатам скрининга праймеров для дальнейшей работы были отобраны следующие участки ДНК: внутренний транскрибируемый спейсер ядерного рибосомального оперона ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) и четыре участка хлоропластной ДНК (*trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *rpl32-trnL*(UAG), *trnV-ndhC*). Последовательности праймеров взяты из работ (Shaw et al., 2007; Wen, Zimmer, 1996) и синтезированы в компании Синтол (Москва, Россия) (табл. 2). Амплификацию проводили в амплификаторе MJ Research PTC-220 DNA Engine Dyad (Biorad Ltd., США) по следующим протоколам: для ITS, *trnL-trnF*: 94 °C – 3 мин; 94 °C – 20 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 40 с (34 циклов); 72 °C – 3 мин; для *rpl32-trnL* (UAG), *trnV-ndhC*: 94 °C – 1 мин; 94 °C – 30 с, 57 °C – 40 с, 60 °C – 1 мин 20 с (35 циклов); 57 °C – 40 с, 60 °C –

1 мин 20 с (2 цикла); для *atpB-rbcL*: 95 °C – 3 мин; 95 °C – 30 сек, 48 °C – 1 мин, 72 °C – 40с (28 циклов); 72 °C – 3 мин. Объем одной реакции ПЦР составил 20 мкл: 1,5–2 нг ДНК, 5 пмоль каждого праймера, 4 мкл готового реакционного микса MasterMix 5X MagDDMIX-2025 (200 мкмоль каждого dNTP, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 1,5 ед. Taq-полимеразы и буфер, Диалат ЛТД, Россия), а также 13 мкл деионизированной воды. Для всех случаев амплификации включали по одной реакции отрицательного контроля, чтобы исключить возможность контаминации реактивов. Продукты ПЦР разделяли на 1%-м 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. 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). Все секвенированные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); их номера приведены в таблице 1.

Таблица 2

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймера
NNC-18S10	AGGAGAAGTCGTAACAA
C26A	GTTTCTTTTCCTCCGCT
<i>atpB</i>	GACTCGCACTTGATTTTCGTTGC
<i>rbcL</i>	CGGGGTGTAGTAAGTCAATTTATA
<i>trnV</i> (UAC)x2	GTCTACGGTTCGARTCCGTA
<i>ndhC</i>	ATTAGAAATGYCCARAAAATATCAT
<i>rpl32</i>	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC
<i>trnL</i> (UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT
<i>trnL</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trnF</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG

**Фрагментный анализ**

Для фрагментного анализа ДНК (Borner, Branchard, 2001) были использованы межмикросателлитные участки (ISSR), полученные с использованием 9 различных праймеров (табл. 3), комплементарных ди- и тринуклеотидным повторам, характерным для ядерной ДНК. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 10–20 нг ДНК, 20 пмоль праймера и 4 мкл готового реакционного микса MasterMix 5X MagDDMIX-2025 (200 мкмоль каждого dNTP, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 1,5 ед. Taq-полимеразы и буфер, Диалат ЛТД, Россия). ПЦР с предварительной денатурацией (95 °C – 3 мин) проводили в амплификаторе MJ Research

PTC-220 DNA Engine Dyad (Biorad Ltd., США) в течение 35 циклов в режиме: денатурация при 94 °C – 30 с, отжиг при 50 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 40 с + прибавление 2 с на каждый цикл. Разделение продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1,7 % агарозном (Amresco) геле в 0,5 × TBE (pH = 8,3) буфере с окрашиванием бромидом этидия (0,5 мкг/мл) при 125 В и фотографировали. Фотографии электрофореграмм ISSR маркеров анализировали в программе Cross Checker 2.91 (Buntjer, 2000). В результате была получена матрица присутствия/отсутствия фрагментов одинаковой длины (1 – есть/ 0 – нет).

Полученная матрица была проанализирована методом кластерного анализа (UPGMA) в программе PAST (Hammer et al., 2001) с использованием меры сходства Жаккара, а также мето-

дом объединения ближайших соседей (Neighbor Joining, NJ) в программе SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006).

Таблица 3

Последовательности ISSR праймеров, использованных в работе  
(Y = T C (пиримидины), R = G A (пурины))

Название праймера	Последовательность праймера
HB12	(CAC)3GC
HB13	(GAG)3GC
M13	(AGC)4(C/T)
M12	(CA)6RY
M10	(CA)6(A/G)G
M4	(AG)8(C/T)C
M2	(AC)8(C/T)G
M1	(AC)8CG
17899a	(AC)6AG

### Филогенетический анализ

Полученные нуклеотидные последовательности были выровнены с помощью алгоритма ClustalW в программе BioEdit (Hall, 1999), с последующей оценкой качества прочтения вручную. Индели учитывались как отсутствующие данные для всех образцов. Анализировались два финальных выравнивания: 1) по данным нуклеотидных последовательностей ITS1, 2; 2) все выравнивания для участков пластидной ДНК были объединены в одно общее выравнивание. Филогенетический анализ проводился в программе RAxML 8.2.12 (Stamatakis, 2014; Edler et al., 2021). Для ML-анализа использовалась модель GTR. В качестве внешней группы мы использовали полные хлоропластные геномы, выгруженные из GenBank, следующих видов: *Onobrychis viciifolia* (NC053934), *O. gaubae* (LC647182), *Hedysarum polybotrys* (MZ327727), *H. petrovii* (MT120797). Из геномов были вырезаны только те участки хлДНК, которые анализировались у исследуемых образцов *E. subspinoso*, и добавлены в общее выравнивание. Определение хлоропластных гаплотипов исследуемых образцов и их генеалогический анализ проводились методом статистической парсимонии (Templeton, Crandall, 1993) в программе TCS (Clement et al., 2000).

### Результаты

#### Результаты секвенирования

Все последовательности, секвенированные из образцов KZ1 и KZ2, а также их спектры ISSR маркеров оказались полностью идентичными,

что подтвердило принадлежность обеих частей гербарного образца к одному и тому же растению. В дальнейшем анализе оба образца рассматривались как один под обозначением KZ1.

Длина выравнивания участка ITS1, 2 составила 658 п. н. Последовательности ITS1, 2 оказались идентичными для всех образцов, за исключением двух образцов KZ9 и KZ11 из Восточного Казахстана, которые отличались наличием одной нуклеотидной замены в 197 позиции (замена C на T). Так как данный маркер оказался малоинформативным, дальнейшему филогенетическому анализу он не подвергался.

Длина полученных нуклеотидных последовательностей хлоропластных участков составила: 1) *atpB-rbcL* – 742 п. н.; 2) *rpl32-trnL(UAG)* – 550 п. н.; 3) *trnL-trnF* – 680 п. н.; 4) *trnV-ndhC* – 401 п. н. Анализ объединенного выравнивания длиной 2373 п. н. проводили методом статистической парсимонии в программе TCS. Программа рассчитала максимально возможное число мутационных шагов при 95%-й вероятности парсимонического решения равным 20 и объединила все последовательности *E. subspinoso* в одну сеть, сгруппировав их в 12 гаплотипов (рис. 3). В данном анализе мы не учитывали последовательности внешней группы, так как они оказались эволюционно далеки от исследуемой выборки, и программа не смогла объединить их в общую сеть вместе с гаплотипами *E. subspinoso*.

Полученная сеть не имеет петель, что позволяет однозначно оценивать генеалогические связи гаплотипов. Большинство исследуемых образцов обладают своими собственными га-

плотипами, только к гаплотипам А и D отнесено более 1 образца. Из 12 гаплотипов сети 5 оказались внутренними, т. е. связанными более чем с 1 гаплотипом, и 7 – концевыми. Большинство гаплотипов отличаются друг от друга большим (3–12) числом мутаций, за исключением группы из четырех внутренних гаплотипов (А, В, D, F), различия между которыми составляют всего одну мутацию. Согласно результатам укоренения (см. ниже), корень сети должен располагаться между внутренними гаплотипами D и F, разделенными единственной мутацией. Гаплотип D, таким образом, оказывается корневым гаплотипом первой эволюционной линии и присутствует у двух образцов: KZ10 из Таласской долины (Западный Тянь-Шань) и KZ9 из Сырдарьинского Каратау. Внутренний гаплотип А, производный от D и отличающийся от него одной нуклеотидной заменой, характерен для двух образцов из Кегульты (K1 и K2) и для всех шести образцов с г. Большое Богдо на западном краю ареала *E. subspinoso*. Внутренний гаплотип В отличается от гаплотипа А также одной нуклеотидной заменой и встречен у единственного образца из Кегульты. Четвертый образец из Кегульты обладает концевым гаплотипом С, производным от внутреннего гаплотипа В и отличающимся от него тремя мутациями. К первой эволюционной линии следует отнести и концевой гаплотип Е, производный от внутреннего (корневого) гаплотипа D и отличающийся от него 12 мутационными шагами. Этот гаплотип был встречен у единственного образца (KZ11) из Казахстана с северо-западной оконечности хребта Каратау. Вторая эволюционная линия представлена гаплотипами G–L, производными от внутреннего гаплотипа F и распространенными преимущественно в Центральном и Западном Казахстане. Большинство этих гаплотипов отличаются друг от друга большим числом мутаций, и все представлены в нашей выборке единичными образцами (табл. 1, рис. 1). Для укоренения сети мы проанализировали выравнивание гаплотипов *E. subspinoso* с включенными в него последовательностями внешней группы методом максимального правдоподобия в программе RAxML (рис. 4).

Все гаплотипы, как и ожидалось, оказались монофилетичны относительно внешней группы и образовали две самостоятельные клады: первая образована гаплотипами от А до Е включительно; во вторую кладу попали гаплотипы от F до L. Несмотря на низкие значения бутстреп-поддержек узлов, топология дерева оказалась

идентичной топологии сети, построенной методом статистической парсимонии. Таким образом, согласно результатам анализа, корень сети должен располагаться между гаплотипами D и F. Так как эти гаплотипы разделены всего одним мутационным событием, мы можем считать их в равной степени близкими к внешней группе. Соответственно, гаплотипы *E. subspinoso* образуют и на сети, и на дереве две независимые эволюционные линии.

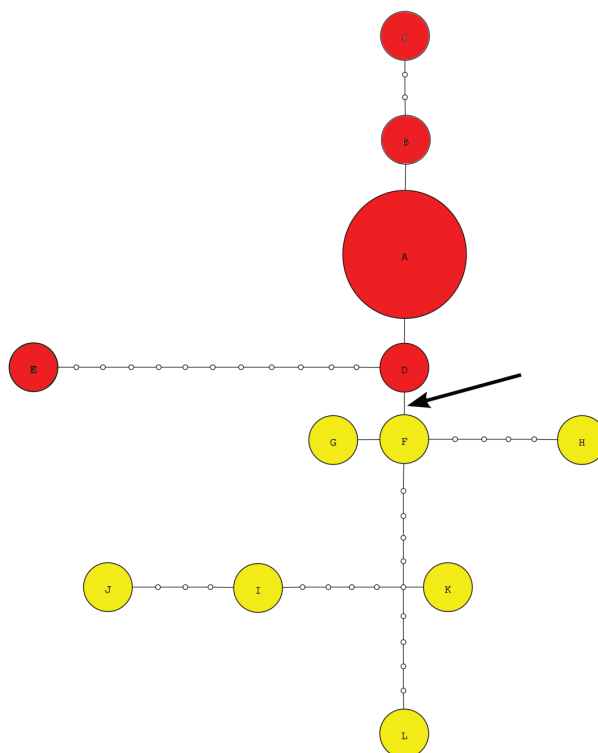


Рис. 3. Сеть гаплотипов объединенного выравнивания хлоропластных участков (*atpB-rbcL*, *trnV-ndhC*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*) изученных образцов в программе TCS. Размер кружка пропорционален числу образцов, обладающих данным гаплотипом. Красные кружки – первая эволюционная линия, желтые кружки – вторая эволюционная линия. Обозначения: А, В, С, D, Е, F, G, H, J, K, L – гаплотипы изученных образцов. Маленькие кружки соответствуют гипотетическим гаплотипам, отсутствующим в выборке. Стрелка обозначает положение внешней группы.

#### Анализ ISSR маркеров

ISSR-маркированию подверглись только те образцы, у которых наблюдалась устойчивая амплификация для всех 9 праймеров. Итоговая матрица включала 73 ISSR маркера и 14 образцов: K1, K2, K4, GB1-GB6, KZ1, KZ4, KZ8, KZ9, KZ10. 37 неинформативных маркеров, которые присутствовали или отсутствовали только у одного образца, были исключены из анализа. Кластерный (UPGMA) анализ разделил выборку на



два кластера (бутстреп поддержки 97 и 82, соответственно) (рис. 5). В первый попали все образцы из Казахстана и Киргизии, а во второй – образцы из Кегульта и с г. Большое Богдо. Второй кластер разделяется на два подкластера: а) все образцы с г. Большое Богдо (бутстреп поддержка 100); б) образцы из Кегульта (бутстреп поддержка 100). Все образцы первого подкластера оказались идентичными и расположились на ветвях нулевой длины. Во втором подкластере

идентичными оказались только два образца из трех изученных, что указывает на генетическую неоднородность популяции из Кегульта. Этот результат хорошо согласуется с результатом анализа нуклеотидных последовательностей, где у образцов калмыцкой популяции из балки Кегульта обнаруживаются три хлоропластных гаплотипа, в то время как все шесть образцов астраханской популяции с г. Большое Богдо обладают одним единственным гаплотипом А.

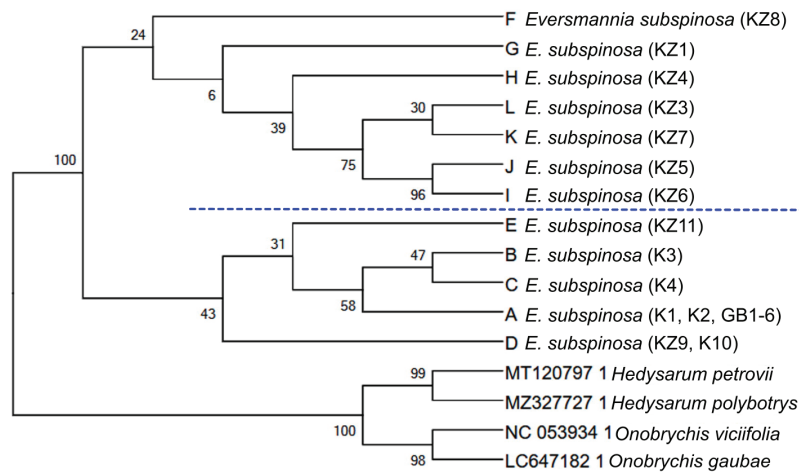


Рис. 4. Результаты ML (Maximum Likelihood) анализа объединенного выравнивания в программе RaхML (–lnL= 5893.837035). Число варибельных признаков 459, парсимонически информативных признаков 90. В узлах отмечены значения бутстрепа. Изученные образцы указаны с соответствующими гаплотипами. Пунктирная линия отделяет разные эволюционные линии. Образцы внешней группы показаны с номерами GenBank.

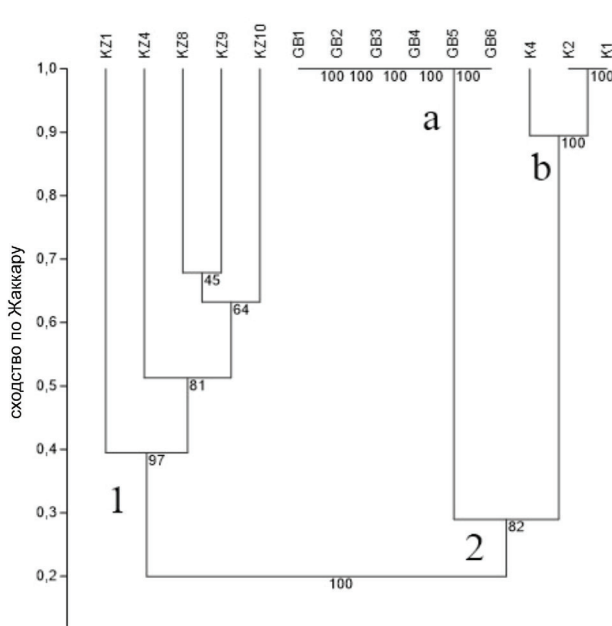


Рис. 5. Результаты кластерного анализа (UPGMA) 14 образцов по 73 ISSR маркерам в программе PAST со значениями бутстрепа (1000 реплик). Обозначения: 1 – образцы из Средней Азии (KZ); 2 – все остальные образцы (а – образцы с г. Б. Богдо (GB); б – образцы из балки Кегульта (K)).

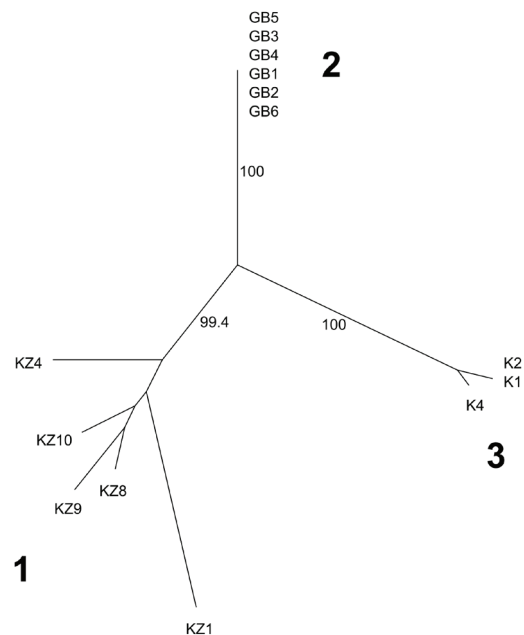


Рис. 6. Результаты анализа межмикросателлитных (ISSR) маркеров для части изученных образцов методом NeighborJoining в программе SplitsTree4 со значениями бутстрепа (1000 реплик): 1 – образцы из Средней Азии (KZ); 2 – образцы с г. Б. Богдо (GB); 3 – образцы из балки Кегульта (K).

Полученная бинарная матрица также была проанализирована методом объединения ближайших соседей (Neighbor Joining, NJ) в программе SplitsTree4. Результаты показаны на рисунке 6. Все исследуемые образцы четко разделяются соответственно своим природным популяциям: 1) образцы из балки Кегульта; 2) образцы с г. Большое Богдо; 3) образцы из Средней Азии (Казахстан и Киргизия). Результат принципиально не отличается от результата кластерного анализа. Все три группы (г. Большое Богдо, Кегульта и образцы с территории основного ареала) значительно удалены друг от друга, причем разрозненные образцы из Казахстана и Киргизии все же ближе друг к другу, чем к образцам из Кегульта и с г. Большое Богдо.

### Обсуждение

Несмотря на небольшой размер исследованной выборки, нам удалось выявить немало интересных аспектов генетической структуры популяций *E. subspinosa*. Во-первых, оказалось, что популяция с г. Большое Богдо в Астраханской области действительно генетически крайне изолирована и мономорфна как по хлоропластным, так и по ядерным маркерам. Мономорфность данной популяции по пластидному гаплотипу А не вызывает особого удивления, у многих видов растений локальные популяции не проявляют изменчивости по пластидным маркерам. Однако в данном случае наблюдается также идентичность всех шести изученных образцов по спектрам межмикросателлитных (ISSR) фрагментов, а это уже однозначно указывает на то, что исследованные образцы с г. Большое Богдо обладают одним генотипом и составляют популяцию, представляющую собой вегетативный клон. Наш результат подтверждает более ранние наблюдения других авторов (Voloboeva, Laktionov, 2018; Laktionov et al., 2021), которые указывали, что эверсмания на г. Большое Богдо редко образует плоды и размножается преимущественно вегетативно за счет длинных корневищ. Более того, О. В. Волобоева и А. П. Лактионов в ходе исследований *E. subspinosa* на г. Большое Богдо обнаружили две популяции этого вида. По их наблюдениям, особи, произрастающие на северных склонах, размножаются только вегетативно, в то время как растения склонов южной экспозиции обильно цветут и плодоносят. Вполне вероятно, что в нашей выборке были представ-

лены образцы только с северных склонов (Voloboeva, Laktionov, 2018). Также нужно отметить, что проведенные ранее исследования анатомической структуры плодов *E. subspinosa* из разных популяций тоже показали некоторые отличия образца из популяции с г. Большое Богдо от образцов из Казахстана (Mironov, Sokolov, 2000). При этом авторы отмечали, что семена в бобах растения с г. Большое Богдо были незрелыми. Полученный нами результат в совокупности с перечисленными выше данными свидетельствует о том, что эверсмания почти-колючая – преимущественно перекрестно опыляемый вид, скорее всего, не способный к самоопылению или апомиктическому завязыванию семян. Однако для более надежного вывода необходимо исследование большей по размеру выборки из разных частей локальной популяции с г. Большое Богдо.

Ярким контрастом популяции с г. Большое Богдо служит популяция с Ергеней из окрестностей п. Кегульта (Калмыкия). Это географически ближайшая к г. Большое Богдо популяция, причем представляющая собой крайне западную точку распространения вида. В подобной краевой популяции логично было бы также предполагать генетическую обедненность, однако это не так. У четырех исследованных из данной популяции образцов было выявлено три (!) разных, хотя и родственных пластидных гаплотипов (А, В и С), первый из которых общий с популяцией г. Большое Богдо, а два других представляют собой его прямых потомков и не были встречены более нигде. По ядерным межмикросателлитным маркерам (здесь было исследовано три образца из четырех) два образца, обладавшие одним и тем же пластидным гаплотипом А, оказались идентичными, а третий – отличным от них, что говорит о присутствии в популяции как вегетативного, так и семенного возобновления, вероятно, в результате перекрестного опыления. Вместе с тем, обе популяции, и с г. Большое Богдо, и из балки Кегульта, по всем типам маркеров достаточно далеки от популяций с территории Казахстана, в том числе и популяций Западного Казахстана (KZ3, KZ4, KZ5). Генетически (по пластидным маркерам) наиболее близкими к популяциям с западной окраины ареала *E. subspinosa* и принадлежащими к общей с ними эволюционной линии оказались образцы KZ10 из Таласской долины в Киргизии и KZ9 и KZ11 из Сырдарьинского Каратау в Казахстане, представляющего собой продолжение Та-

ласского Алатау, вдающееся вглубь территории Казахстана в северо-западном направлении и служащее водоразделом рек Сырдарья и Талас. Все остальные исследованные нами образцы из Северо-Восточного и Западного Казахстана и Киргизии оказались принадлежащими к другой эволюционной линии. Однако для того, чтобы делать какие-либо определенные выводы об истории *E. subspinosa*, необходимо исследование существенно больших выборок из популяций со всей территории ареала этого вида.

### Благодарности

Авторы благодарят куратора раздела Средней Азии Гербария БИН РАН (LE) Л. М. Раенко за помощь при работе с образцами и предоставленную возможность отобрать материал для генетических исследований.

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

### REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Bornet B., Branchard M.** 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 19: 209–215.
- Buntjer J. B.** 2000. Cross Checker: computer assisted scoring of genetic AFLP data. In: *Plant & Animal Genome: VIII Conference* (San Diego, CA, January 9–12). URL: <http://wheat.pw.usda.gov/jag/papers99/paper599/indexp599.html>
- Clement M., Posada D., Crandall K. A.** 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1659.
- Edler 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
- 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.
- Huson D. H., Bryant D.** 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23(2): 254–267.
- Laktionov A. P.** 2018. *Ewersmannia* Bunge. In: *Flora Nizhnego Povolzhya [Flora of the Lower Volga]*. Vol. 2. Moscow: KMK Scientific Press. P. 744. [In Russian] (**Лактионов А. П.** *Ewersmannia* Bunge // Флора Нижнего Поволжья. Т. 2. М.: Изд-во КМК, 2018. С. 744).
- Laktionov A. P., Korolyuk A. Yu., Voloboeva O. V.** 2021. *Eversmannia subspinosa* (Fabaceae), a new species to the flora of Kalmykia. *Bot. Zhurn.* 106(3): 303–305. [In Russian] (**Лактионов А. П., Корольюк А. Ю., Волобоева О. В.** *Eversmannia subspinosa* (Fabaceae) – новый вид для флоры Калмыкии // Бот. журн., 2021. Т. 106, № 3. С. 303–305).
- Laktionov A. P., Voloboeva O. V.** 2021. Relic species of flora of the Bogdo-Baskunchak salt dome region. *Natural Sciences* 1: 54–62. [In Russian] (**Лактионов А. П., Волобоева О. В.** Реликтовые виды флоры Богдинско-Баскунчакского солянокупольного района // Естественные науки, 2021. № 1. С. 54–62).
- Mironov E. M., Sokolov D. D.** 2000. A carpological study of *Eversmannia subspinosa* (Fisch. ex DC.) Fedtsch. (Leguminosae, Hedysarae). *Feddes Repertorium* 111(1–2): 1–8.
- Ovczinnikov P. N.** 1978. *Ewersmannia* Bunge. In: *Flora Tadzhikskoy SSR [Flora of Tajik SSR]*. Vol. 5. Leningrad: Nauka. Pp. 503–504. [In Russian] (**Овчинников П. Н.** Род *Eversmannia* Bunge // Флора Таджикской СССР. Т. 5. Л.: Наука, 1978. С. 503–504).
- Sarkisova S. A.** 1981. *Eversmannia* Bunge. In: *Opredelitel rasteniy Sredney Azii [Conspectus Florae Asia Mediae]*. Vol. 6. Tashkent. Pp. 357–358. [In Russian] (**Саркисова С. А.** Род *Eversmannia* Bunge // Определитель растений Средней Азии. Т. 6. Ташкент, 1981. С. 357–358).
- 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. In: SimpleMappr create free point maps for publications and presentations URL: <https://www.simplemappr.net> Accessed 14 September 2022].
- Stamatakis A.** 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Svyazeva O. A., Kamelin R. V.** 1986. *Eversmannia subspinosa* (Fisch. ex DC.) Fedtsch. In: *Arealy derevyev i kustarnikov SSSR [Areas of trees and shrubs of the USSR]*. Vol. 3. Leningrad. Pp. 50, 182. [In Russian] (**Связева О. А., Камелин Р. В.** Ареалы деревьев и кустарников СССР. Т. 3. Л., 1986. С. 50, 182).

**Templeton A. R., Crandall K. A.** 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959–969.

**Vassilyeva L. I.** 1987. *Eversmannia* Bunge. In: *Flora yevropeyskoy chasti SSSR [Flora Partis Europaeae URSS]*. Vol. 6. Leningrad: Nauka. Pp. 86–87. [In Russian] (**Васильева Л. И.** Род Эверсмания – *Eversmannia* Bunge // Флора европейской части СССР. Т. 6. Л.: Наука, 1987. С. 86–87).

**Voloboeva O. V., Laktionov A. P.** 2018. Biological-ecological features of *Eversmannia subspinoso* (DC.) Fedtsch. in the North-Eastern Caspian Sea region. In: *Scientific and ecological education activities in the specially protected natural territories: current state and development prospects: materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation, dedicated to the 20th anniversary of the State Nature Reserve “Bogdinsko-Baskunchaksky” (Akhtubinsk, April 19–21, 2018)*. Moscow. Pp. 38–44. [In Russian] (**Волобоева О. В., Лактионов А. П.** Биолого-экологические особенности *Eversmannia subspinoso* (DC.) Fedtsch. в северо-западном Прикаспии // Научная и эколого-просветительская деятельность на ООПТ: современное состояние и перспективы развития: Материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 20-летию государственного природного заповедника «Богдинско-Баскунчакский» (г. Ахтубинск, 19–21 апреля 2018 г.). М., 2018. С. 38–44).

**Voloboeva O. V., Laktionov A. P.** 2019. *Eversmannia subspinoso* (Fabaceae) and its “floristic suite” as representatives of relict flora of salt-dome hills of the Northern Caspian. *Rastitelnyy mir Aziatskoy Rossii [Plant life of Asian Russia]* 3: 53–56. [In Russian] (**Волобоева О. В., Лактионов А. П.** *Eversmannia subspinoso* (Fabaceae) и ее «флористическая свита» как представители реликтовой флоры соляно-купольных возвышенностей Северного Прикаспия // Растительный мир Азиатской России, 2019. № 3. С. 53–56). DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2019-3(53-56)

**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

**Yanina T. A.** 2012. *Neopleystotsen Ponto-Kaspiya: biostratigrafiya, paleogeografiya, korrelyatsiya [Neopleistocene of the Ponto-Caspian: biostratigraphy, paleogeography, correlation]*. Moscow. 264 pp. [In Russian] (**Янина Т. А.** Неоплейстоцен Понто-Каспия: биостратиграфия, палеогеография, корреляция. М., 2012. 264 с.).