



УДК 575.174:581.3

Исследование изменчивости хлоропластной ДНК некоторых видов *Astragalus* секции *Helmia* и *Astragalus arcanus* секции *Erioceras* (Fabaceae)

М. С. Князев^{1,3*}, Е. Г. Филиппов^{1,4}, О. Е. Черепанова^{1,5}, Д. А. Кривенко^{2,6*}

¹ Ботанический сад УрО РАН, ул. 8 Марта, д. 202а, г. Екатеринбург, 620144, Россия

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, ул. Лермонтова, д. 132, г. Иркутск, 664033, Россия

³ E-mail: knyasev_botgard@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3868-8010>

⁴ E-mail: filorch@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5447-674X>

⁵ E-mail: botgarden.olga@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7775-6488>

⁶ E-mail: krivenko.irk@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2658-1723>

* Авторы для переписки

Ключевые слова: астрагал, интрон *trnL*, регион *trnF–trnV*, хпДНК.

Аннотация. Анализ последовательностей хлоропластной ДНК выявил высокий полиморфизм длины и нуклеотидного состава регионов *trnF–trnV* и интрона *trnL* для видов секций *Helmia* рода *Astragalus* (Fabaceae). Молекулярно-генетические исследования видов *Astragalus* секции *Helmia* ранее практически не проводились; секвенирование регионов *trnF–trnV* и интрона *trnL* хпДНК для 7 видов секции, а также вероятного межсекционного гибрида *Astragalus arcanus*, проведено впервые. На основании проведённых генетических исследований уточнены таксономические отношения между видами секции *Helmia*; обсуждены возможные этапы эволюции секции. Доказана самостоятельность *Astragalus permiensis* – для него предполагается не уральское, а сибирское или центрально-азиатское происхождение. Подтверждена принадлежность *A. ionae* к секции *Helmia*. Сделано предположение, что *A. depauperatus* s. l. представляет комплекс видов-двойников. Один из них в этой статье рассматривается в статусе вида *A. chakassiensis*.

Investigation of the variability of chloroplast DNA of some *Astragalus* spp. of sect. *Helmia* and *A. arcanus* of sect. *Erioceras* (Fabaceae)

M. S. Knyazev¹, E. G. Philippov¹, O. E. Cherepanova¹, D. A. Krivenko²

¹ Institute Botanic Garden UB RAS, 8 Marta St., 202a, Yekaterinburg, 620144, Russian Federation

² Siberian Institute of Plant Physiology & Biochemistry SB RAS, Lermontov St., 132, Irkutsk, 664033, Russian Federation

Keywords: cpDNA, intron *trnL*, Milkwetch, *trnF–trnV*.

Summary. Analysis of chloroplast DNA sequences revealed a high polymorphism of the length and nucleotide composition of *trnF–trnV* and the intron *trnL* for *Helmia* section species of the genus *Astragalus* (Fabaceae). Molecular genetic studies of *Astragalus* species of the *Helmia* section were previously practically not carried out; sequencing of *trnF–trnV* and the intron *trnL* of chloroplast DNA for 7 species of the section, as well as the probable intersection hybrid *Astragalus arcanus* held for the first time. On the basis of genetic studies, clarified the relationship between species included in the section *Helmia*. The possible stages of sect. *Helmia* evolution are discussed. The taxonomic isolation of *Astragalus permiensis* has been confirmed; it is assumed not to be of Uralic, but of Siberian or Central Asian origin. *Astragalus ionae* belongs to the section *Helmia* is confirmed. *Astragalus depauperatus* s. l. is thought to be a complex of twin species. In this article, one of them is considered in the status of the species *A. chakassiensis*.

Введение

Таксономический объём секции *Helmia* Bunge рода *Astragalus* L. является дискуссионным. Н. Ф. Гончаров и М. Г. Попов (Goncharov, Popov, 1946) приводят для флоры бывшего СССР только четыре вида, без данных о распространении за его пределами. D. Podlech и Sh. Zarre (2013) указывают, что секция насчитывает 25 видов, в том числе 14 видов встречаются в границах бывшего СССР и 11 – в Монголии и Китае; М. С. Князев (Knyazev, 2019) считает, что секция *Helmia* насчитывает девять видов и подвидов, распространённых только в Монголии и на территории бывшего СССР. Одним из частных дискуссионных моментов является таксономическое положение *A. ionae* Palib. ex Gontsch. et Popov в системе рода. Этот вид был описан в составе секции *Dissitiflori* DC. (= *Xiphidium* Bunge) (Goncharov, Popov, 1946), М. Г. Попов (Popov, 1949) предполагал, что *A. ionae* может быть межсекционным гибридом *A. depauperatus* Ledeb. (sect. *Helmia*) × *A. angarensis* Turcz. ex Bunge s. l. (sect. *Dissitiflori*). Однако D. Podlech & Sh. Zarre (2013) и М. С. Князев (Knyazev, 2019) относят этот вид к секции *Helmia* на основании значительного морфологического сходства с некоторыми типичными её представителями. Виды этой секции достаточно сложны для определения, отличаясь «мелкими» морфологическими признаками, что вызывает вполне понятные сомнения: имеем ли дело с самостоятельными видами или лишь с разновидностями. Очевидно, что классическая систематика, в данном случае, исчерпала возможности тонкой идентификации, что определило актуальность обращения к молекулярно-генетическим исследованиям. Поэтому были проведены стандартные молекулярно-генетические исследования для проверки таксономического статуса видов *Astragalus* секции *Helmia*.

Изучение хлоропластного генома является одним из перспективных направлений современной геносистематики растений. В хлоропластной ДНК (хпДНК) содержится порядка 120 генов, среди которых около 30 генов тРНК, гены рРНК (4.5S, 5S, 16S и 23S) и более 80 генов белков (Shneer, 1991). Несмотря на то, что, в целом, пластом консервативен по размеру и составу генов, благодаря наличию ряда лабильных локусов, испытывающих повышенное мутационное воздействие (Shaw et al., 2007), он изменяется быстрее ядерного и митохондриального геномов, что может быть использовано при изучении микроэволюционных событий: видообразования,

гибридизации, в том числе, интрогрессивного взаимодействия и др. (Taberlet et al., 1991, 2007; Kress et al., 2005; Shaw et al., 2005, 2007; Kress, Erickson, 2007).

На первом этапе, для выявления регионов хпДНК с выраженной видоспецифичной изменчивостью у изученных видов, был проведён рестриктивный анализ, результаты которого опубликованы ранее (Knyazev, Philippov, 2019). Были подобраны подходящие рестриктазы и праймеры, которые позволили установить изменчивые участки хпДНК, а также детектировать их видовую принадлежность. Наиболее чёткая внутривидовая изменчивость выявлена для двух участков хпДНК – межгенного спейсера *trnF-trnV/Hinfl* и интрона *trnL/Hinfl*. Кроме того, для региона *psbA-trnH/Hinfl* отмечено отличие между *A. helmii* Fisch. ex DC. и остальными таксонами секции. По другим изученным системам выявлена слабая внутривидовая изменчивость. Рестриктивный анализ позволил выбрать для дальнейших молекулярно-генетических исследований *Astragalus* секции *Helmia* изменчивые регионы *trnF-trnV* и интрона *trnL*.

В данном сообщении представлены результаты, полученные при секвенировании региона *trnF-trnV* и интрона *trnL* хпДНК модельных видов *Astragalus* секции *Helmia* и вероятного межсекционного гибрида *A. arcanus* Knjaz., Krivenko et E. G. Philippov секции *Erioceras* Bunge.

Материал и методы

Большинство изученных видов относятся к секции *Helmia*. Это стелющиеся, иногда (почти) подушковидные полукустарнички, с укороченными годичными побегами (полурозетками); цветки, белые, реже розовые, очень редко пурпурные, в 1–5(10) цветковых головках на коротких цветоносах, примерно равных листьям; листочки обычно в числе 2–6 пар, густо покрыты прижатыми двуконечными волосками; прилистники при основании сросшиеся между собой и с черешком (формируют раструб, охватывающий стебель). Бобы от продолговато-яйцевидных до ланцетных, прямые, редко слегка изогнутые, густо опушённые длинными оттопыренными волосками. Четыре вида секции *Astragalus* *chakassiensis* Polozhij, *A. depauperatus*, *A. helmii* и *A. permiansis* С. А. Мей. ex Rupr. произрастают на скалах и щебнистых осыпях, почти исключительно на известняках, мергелях и других карбонатных породах. Ещё четыре вида *A. gregorii* В. Fedtsch. et Basil. (= *A. tuvunicus* Timochina),

A. heptapotamicus Sumnev., *A. kasachstanicus* Golosk. s. l. и *A. tergeminus* (Knjaz., Kulikov et E. G. Philippov) Knjaz. также являются петрофитами, но избегают горные породы, содержащие карбонаты. Наконец, *A. ionae* произрастает преимущественно на аллювии в долинах рек и, вероятно, не имеет предпочтения к химическому составу горных пород. Как правило, представители секции аллопатричны; в тех случаях, когда их ареалы частично перекрываются, а экологические особенности близки или идентичны, они (практически без исключений) не произрастают совместно. Такая интересная пространственная сегрегация, вероятно, и обуславливает существенные генетические отличия хпДНК, установленные нами для многих таксонов. Ещё один изученный вид *A. arcanus*, хотя и имеет значительное морфологическое сходство с типичными представителями секции *Helmia*, отнесён авторами вида к секции *Erioceras* (возможно, представляет собой межсекционный гибрид) (Князев et al., 2019). Представители этой секции невысокие (чаще стелющиеся) травы и полукустарнички, опушённые прижатыми, рыхло прижатыми или отстоящими двуконечными волосками; цветки обычно фиолетовые или пурпурные, в головчатых или зонтиковидных кистях, на цветоносах, равных или в 1,5–2 раза длиннее листьев; прилистники свободные или сросшиеся при основании между собой, но не с черешком. Бобы продолговатые, ланцетные, изогнутые, опушённые оттопыренными волосками. Большинство видов секции *Erioceras* произрастают в щебнистых и песчаных опустыненных степях и не проявляют какой-либо явной эдафической приуроченности.

Материалом для исследования послужили растения, собранные авторами в 2017–2019 гг. на Урале, в Казахстане и Сибири. Собран материал по 10 таксонам из 13 популяций (табл. 1). Ваучерные гербарные образцы хранятся в ботанической части Музея Института экологии растений и животных УрО РАН (SVER), некоторые дублиеты гербария переданы в коллекцию Ботанического института РАН им. В. Л. Комарова (LE) и Гербарий Ботанического сада УрО РАН (Екатеринбург), ваучерный образец *Astragalus chakassiensis* хранится в Гербарии им. П. Н. Крылова Национального исследовательского Томского государственного университета (ТК). Было исследовано по пять образцов в каждой из 13 популяций (всего 65 образцов). Для генетических исследований собирались листья от отдельных особей по трансекте на расстоянии 5–10 м друг от друга, или – в случае нахождения

популяций на отвесных скалах – у всех доступных особей. Собранный материал замораживался и хранился в морозильной камере при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В двух случаях – в популяциях «Ефремино» и «Нура» – от 10–15 особей были собраны бобы, и для экстракции ДНК использовались проростки, полученные в лабораторных условиях.

Для экстракции ДНК были взяты навески листьев или проростки из семян. Тотальная ДНК была выделена с использованием СТАВ метода (Devey et al., 1996). Для амплификации региона *trnF–trnV* и интрона *trnL* были использованы универсальные праймеры (Grivet et al., 2001). Амплификацию региона *trnF–trnV* проводили при температуре отжига $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 мин) и времени элонгации 3 мин при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, а интрона *trnL* при температуре отжига $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 мин) и времени элонгации 2 мин при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Наличие ПЦР-продукта визуализировали в 1%-м агарозном геле с добавлением этидиум бромид в ультрафиолетовом свете. Продукты амплификации были использованы для последующего секвенирования методом Сэнгера при помощи BigDye v. 3.1 kit (Gene Analyzers 3130; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Секвенирование региона *trnF–trnV* проводилось в несколько этапов с использованием разработанных праймеров: 5'-ATTCTGGC TGGTTAAACTTC-3', 5'-ATGGAGGTTTCATTC ATATC-3', 5'-CCGTTATTATATGTTTGCTC-3' и 5'-ATTGGTTCTATTCCTGATTC-3'. Редактирование и выравнивание полученных последовательностей выполнялось в программе MEGA6. Гаплотип каждого растения был определен путем объединения обоих регионов хпДНК.

Генетическая подразделенность (N_{st} , G_{st}) и параметры полиморфизма (H_d , π), а также дистанции (F_{st}) рассчитывались с помощью пакета программ DnaSP6. F_{st} рассчитывали для измерения молекулярной дивергенции между группами популяций и отдельными видами. Филогенетические отношения были реконструированы с использованием программы Network v.10.6.12 (method Reduced Median), филогенетическое дерево реконструировали в программе MEGA6 (Maximum Likelihood, Test of Phylogeny: Bootstrap method, Bootstrap Replications – 1000). В качестве внешней группы взят *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *membranaceus* (KX255662.1) из GenBank.

Результаты

В результате секвенирования межгенного спейсера *trnF–trnV* и интрона *trnL* хпДНК 65

Таблица 1

Происхождение исследованного материала видов рода *Astragalus*

Таксон	Популяция	Происхождение
<i>A. arcanus</i>	Жарык-18	Казахстан, Карагандинская обл., горный массив Бугалы, восточнее ж.-д. ст. Бурма, увал в 1,5 км к северо-востоку от горы Косшоки, 49.951949N, 72.930006E
<i>A. chakassiensis</i>	Ефремкино	Россия, Респ. Хакасия, правый берег р. Белый Июс близ с. Ефремкино, 54.446196N, 89.467627E
<i>A. depauperatus</i> var. <i>depauperatus</i>	Бреды	Россия, Челябинская обл., Брединский р-н, севернее пруда р. Бирсуат, петрофитные степи, 52.232690N, 58.879460E
Он же	Кизил	Россия, Челябинская обл., Кизильский р-н, обнажение известняков по левому берегу р. Большой Кизил, 52.743235N, 60.660020E
<i>A. helmii</i>	Усень	Россия, Респ. Башкортостан, Туймазинский р-н, правый берег р. Усень, северо-восточнее с. Новосуккулово, 54.499333N, 53.925248E
Он же	Куш-тау	Россия, Респ. Башкортостан, северо-восточнее г. Стерлитамак, южная оконечность горы Куш-тау, 53.685260N, 56.082621E
<i>A. heptapotamicus</i>	Жарык-17	Казахстан, Карагандинская обл., горный массив Бугалы, северо-восточнее ж.-д. ст. Жарык, увал около 1,5 км к юго-западу от горы Косшоки, 49.906160N, 72.954554E
<i>A. ionae</i>	Красноярск	Россия, г. Красноярск, западная окраина, южный склон холма севернее р. Бугач, западнее оконечности ул. Звёздная, скалы, 56.053898N, 92.795621E
<i>A. kasachstanicus</i>	Нура	Казахстан, правый берег р. Нура выше с. Романовка, яры Аксингир, по краю и на дне карьера, 50.817852N, 71.374479E
<i>A. permianensis</i> var. <i>permianensis</i>	Дужной	Россия, Пермский край, правый берег р. Чусовая, скалы Камень Дужной, около 8 км выше устья р. Серебрянка, 57.788238N, 58.759845E
<i>A. permianensis</i> var. <i>sacrimontis</i>	Тра-тау	Россия, Респ. Башкортостан, правый берег р. Белой, юго-восточнее г. Стерлитамак, восточный склон г. Тра-тау, 53.552899N, 56.102904E
<i>A. tergeminus</i>	Губерля	Россия, Оренбургская обл., вершина увала, 1 км юго-западнее ж.-д. ст. Губерля, 51.294572N, 58.166389E
Он же	Хабарное	Россия, Оренбургская обл., г. Новотроицк, склоны холма 1–2 км севернее пос. Хабарное, 51.158528N, 58.222582E

образцов различных таксонов *Astragalus* были получены последовательности длиной в среднем около 3412 п. н. После выравнивания было идентифицировано 24 гаплотипа, включая внешнюю группу, представленную *A. membranaceus*, отношения между которыми были визуализированы в виде сети в программе Network. Общее число проанализированных сайтов составило 3056 (включая гэпы), количество вариабельных сайтов – 68 (включая гэпы), среднее разнообразие гаплотипов по общей группе низкое ($0,879 \pm 0,039$), общее количество мутаций – 69. Анализ региона *trnF-trnV* и интрона *trnL* хпДНК модельных таксонов *Astragalus* показал достаточно высокую вариабельность этого региона, позволяющую идентифицировать большинство изученных видов и разновидностей (табл. 2).

Одним из наиболее эффективных критериев дискретности популяций и интенсивности

потоков генов является критерий F_{st} , который можно вычислить на основе расшифрованных последовательностей ДНК. С помощью F_{st} критерия можно определить генетическую разобщенность между группами и популяциями организмов, изолированными как географическими барьерами, так и расстоянием.

Анализ межпопуляционных дистанций, рассчитанный на основании значений F_{st} , выявил континуальность изученных регионов хпДНК для трёх таксонов и хорошо выраженную для остальных пяти. Характерный уровень межпопуляционной изменчивости (табл. 3) 0,250 (между тремя популяциями *A. depauperatus*), 0,048 (между популяциями *A. helmii*) и 0,091 (между популяциями *A. permianensis*).

Молекулярно-генетический анализ изменчивости не позволил различить четыре вида (табл. 4): *Astragalus chakassiensis*, *A. depauperatus*,

Таблица 2

Распределение гаплотипов и параметры генетической изменчивости по данным хпДНК ($p \geq 0,001$)

Таксон	Популяция	H_d	π	F_{st}	N_{st}	G_{st}	№ гаплотипа (всего)
<i>A. arcanus</i>	Жарык-18	1,0	0,00588	0,860 ± 0,123	0,979 ± 0,073	0,378 ± 0,318	19–23 (5)
<i>A. chakassiensis</i>	Ефремкино	0	0	0,458 ± 0,153	0,852 ± 0,162	0,591 ± 0,193	15 (1)
<i>A. depauperatus</i>	Бреды	0	0	0,250 ± 0,820	0,591 ± 0,125	0,394 ± 0,123	1 (1)
<i>A. depauperatus</i>	Кизил	0,6	0,00652	0,318 ± 0,092	0,616 ± 0,091	0,142 ± 0,059	1, 2 (2)
<i>A. helmii</i>	Усень	0,6	0,00268	0,822 ± 0,061	0,781 ± 0,032	0,984 ± 0,237	3, 4 (2)
<i>A. helmii</i>	Куш-тау	0,4	0,00268	0,584 ± 0,046	0,765 ± 0,024	0,586 ± 0,072	3, 4 (2)
<i>A. heptapotamicus</i>	Жарык-17	0	0	0,911 ± 0,128	0,945 ± 0,137	0,719 ± 0,240	18 (1)
<i>A. ionae</i>	Красноярск	0	0	0,931 ± 0,015	0,984 ± 0,046	0,769 ± 0,133	14 (1)
<i>A. kasachstanicus</i>	Нура	0,7	0,00522	0,586 ± 0,047	0,925 ± 0,059	0,281 ± 0,034	15–17 (3)
<i>A. permiensis</i> var. <i>permiensis</i>	Дужной	0,8	0,01913	0,708 ± 0,148	0,684 ± 0,127	0,326 ± 0,064	8–10 (3)
<i>A. permiensis</i> var. <i>sacrimontis</i>	Тра-тау	0,7	0,01565	0,547 ± 0,028	0,841 ± 0,155	0,672 ± 0,075	11–13 (3)
<i>A. tergeminus</i>	Губерля	0	0	0,506 ± 0,149	0,635 ± 0,022	0,156 ± 0,540	5 (1)
<i>A. tergeminus</i>	Хабарное	0,8	0,00348	0,410 ± 0,125	0,636 ± 0,111	0,285 ± 0,012	5–7 (3)
межгрупповое		0,842	0,00160	0,885 ± 0,030	0,885 ± 0,03	0,564 ± 0,19	1–23 + Outside group
внутригрупповое		0,382	0,00020	0,764 ± 0,550	0,810 ± 0,29	0,573 ± 0,39	

Примеч.: π – нуклеотидное разнообразие; H_d – разнообразие гаплотипов; F_{st} , N_{st} , G_{st} – индексы фиксации генетической дифференциации между популяциями.

A. kasachstanicus и *A. tergeminus*. Показатель F_{st} между этими таксонами имеет уровень, характерный для межпопуляционной дифференциации (табл. 3, 4). *Astragalus arcanus* резко отличается от всех остальных видов и разновидностей ($F_{st} = 0,859–0,969$). Поскольку он относится к секции *Erioceras*, то выявленный уровень F_{st} , в нашем случае, следует оценивать как межсекционный.

Как видно из таблицы 4, ещё один вид *A. ionae* («Красноярск») столь же устойчиво отличается высоким значением F_{st} 0,829–1,000. Возможно, эту особенность *A. ionae* следует связать с его гибридогенным происхождением (Поров, 1949).

Для некоторых типичных представителей секции *Helmia* среднее значение F_{st} было проме-

жуточным, между межсекционным и межпопуляционным уровнями: 0,676–0,876 (*A. permiensis*, популяции «Дужной» и «Тра-тау»), $F_{st} = 0,720–1,000$ (*A. heptapotamicus*), $F_{st} = 0,711–0,937$ (*A. helmii*, популяции «Усень» и «Куш-тау»).

Среднее разнообразие гаплотипов (H_d) между популяциями составило 0,842; внутрипопуляционное не превысило 0,382, так как ряд популяций характеризуются нулевым значением по данному параметру. Также относительно стабильно и нуклеотидное разнообразие (π) в популяциях (табл. 2). Максимальные значения π отмечены для *A. permiensis* var. *permiensis* (0,01913) и *A. permiensis* var. *sacrimontis* Knjaz. (0,01565). F_{st} оценивает степень генетической дифференци-

ции субпопуляций на основании расчета стандартизированных вариантов частот аллелей между популяциями. Достаточно высокие значения F_{st} отмечены для *A. ionae* (0,931), *A. heptapotamicus* (0,911), *A. helmii* (0,898), а минимальные для *A. depauperatus* (0,250–0,318). Значения, полученные для индексов фиксации генетической дифференциации между изученными популяциями подтверждают данные, выявленные при анализе гаплотипов. Межгрупповой и внутривнутригрупповой индексы фиксации N_{st} ($0,885 \pm 0,030$ и $0,810 \pm 0,290$, соответственно) несколько превышают G_{st} ($0,564 \pm 0,190$ и $0,573 \pm 0,390$, соответственно).

На рис. 1 и 2 изображены схемы филогенетических отношений семи видов рода *Astragalus* секции *Helmia* и *A. arcanus* по данным секвенирования полиморфных регионов *trnF-trnV* и *trnL* хпДНК 65 образцов, построенные двумя методами.

В качестве внешней группы в обоих методах взята аналогичная последовательность регионов *trnF-trnV* и *trnL* хпДНК *A. membranaceus*. Все изученные виды относятся к подроду *Cercidotrix* Bunge рода *Astragalus*, тогда как *A. membranaceus* к типовому подроду *Astragalus*, поэтому отмечаемая на схемах дифференциация между внешней группой и остальными таксонами следует

оценивать как уровень между подродами.

Сеть гаплотипов (рис. 1) даёт сходную топологию с результатами анализа методом NJ (рис. 2). В обоих вариантах выделяются четыре группы: 1) *A. arcanus*, 2) диффузный субкластер *A. heptapotamicus* – *A. ionae* – *A. permiensis*; 3) весьма неоднородная группа *A. depauperatus* – *A. kasachstanicus* – *A. tergeminus* и 4) *A. helmii*. Сеть гаплотипов (рис. 1) более чётко показывает обособленность *A. helmii*.

Обсуждение

Дендрограмма, построенная методом Neighbour Joining (NJ) на основе данных секвенирования FV TabCD хлоропластного генома показывает достоверное отличие четырёх из восьми изученных таксонов *Astragalus* (рис. 2). Наиболее резко отделяется *A. arcanus*. Он морфологически весьма близок к *A. heptapotamicus*, но, на основании строения бобов, отнесён авторами к секции *Erioceras* (Кныазев et al., 2019). Таким образом, данный уровень обособленности следует оценивать, как межсекционный (точнее, между представителями двух близких секций подрода *Cercidotrix* рода *Astragalus*). Остальные семь видов являются представите-

Таблица 3

Средние межгрупповые дистанции (F_{st}) ($p \geq 0,001$)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0												
2	0,250	0											
3	0,250	0	0										
4	0,776	0,868	0,868	0									
5	0,800	0,905	0,905	0,048	0								
6	0,250	0	0	0,868	0,905	0							
7	0,200	0,111	0,111	0,800	0,828	0,111	0						
8	0,676	0,720	0,720	0,717	0,728	0,720	0,687	0					
9	0,678	0,729	0,729	0,724	0,737	0,729	0,690	0,091	0				
10	0,928	1	1	0,937	0,957	1,000	0,950	0,829	0,846	0			
11	0,351	0,429	0,429	0,786	0,810	0,429	0,333	0,685	0,688	0,930	0		
12	0,896	1	1	0,915	0,940	1	0,927	0,720	0,729	1	0,901	0	
13	0,922	0,959	0,959	0,928	0,939	0,959	0,933	0,859	0,872	0,969	0,923	0,965	0

Примеч.: Номерами обозначены популяции: 1 – *Astragalus depauperatus* (Кизил); 2 – *A. depauperatus* (Бреды); 3 – *A. chakassiensis* (Ефремкино); 4 – *A. helmii* (Усень); 5 – *A. helmii* (Куш-тай); 6 – *A. tergeminus* (Губерля); 7 – *A. tergeminus* (Хабарное); 8 – *A. permiensis* (Дужной); 9 – *A. permiensis* (Тра-тай); 10 – *A. ionae* (Красноярск); 11 – *A. kasachstanicus* (Нура); 12 – *A. heptapotamicus* (Жарык-17); 13 – *A. arcanus* (Жарык-18).

Таблица 4

Средние межвидовые дистанции (F_{st}) ($p \geq 0,001$)

№	Таксон	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>A. depauperatus</i>	0								
2	<i>A. chakassiensis</i>	0,077	0							
3	<i>A. helmii</i>	0,809	0,831	0						
4	<i>A. tergeminus</i>	0,091	0,036	0,838	0					
5	<i>A. permiensis</i>	0,667	0,599	0,705	0,680	0				
6	<i>A. ionae</i>	0,926	0,930	0,918	0,957	0,755	0			
7	<i>A. kasachstanicus</i>	0,323	0,429	0,777	0,370	0,599	0,930	0		
8	<i>A. heptapotamicus</i>	0,894	1	0,890	0,937	0,610	1	0,901	0	
9	<i>A. arcanus</i>	0,930	0,959	0,925	0,947	0,816	0,969	0,923	0,965	0

лями секции *Helmia*. Среди них резко выделяется *Astragalus ionae* (бутстреп поддержка 0,99), субкластер *A. heptapotamicus* – *A. permiensis* (0,97) и *A. helmii* (0,96). Еще четыре вида *A. chakassiensis*, *A. depauperatus*, *A. kasachstanicus* и *A. tergeminus* на основании изменчивости FV TabCD хлоропластного генома и при использовании статистического метода NJ достоверно не различаются, хотя морфологически впол-

не обособлены, а некоторые отличаются числами хромосом. Так, у *A. tergeminus* $2n = 16$, у *A. depauperatus* (уральские популяции) $2n = 32$, у *A. chakassiensis* $2n = 64$ (Krivenko et al., 2022 и оригинальные данные авторов).

В отличие от дендрограммы NJ (рис. 2), сеть гаплотипов (рис. 1.) более наглядно демонстрирует корреляцию между диплоидным уровнем плоидности и базальным положением таксонов

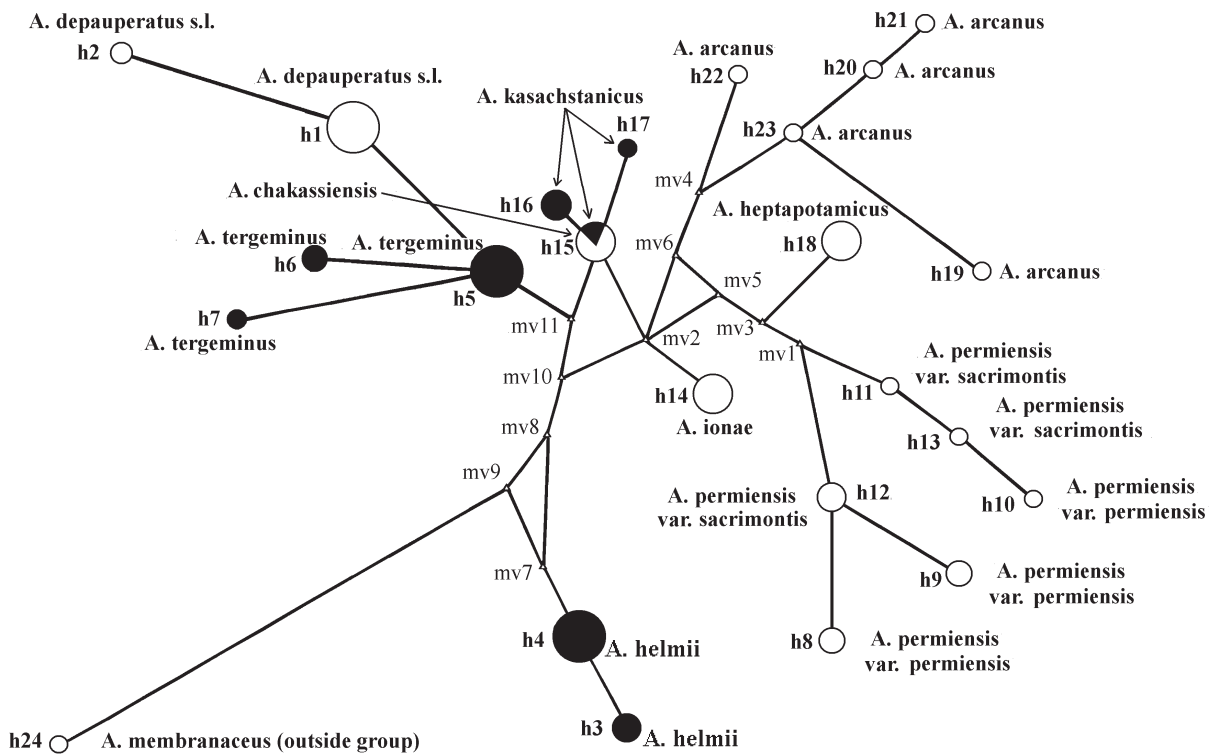


Рис. 1. Сеть гаплотипов, построенная на основании анализа 65 последовательностей FV TabCD хпДНК (65 образцов из 13 популяций 8 видов *Astragalus*) в программе Network v.10.6.12 (method Reduced Median). Заливкой обозначены гаплотипы диплоидных таксонов.

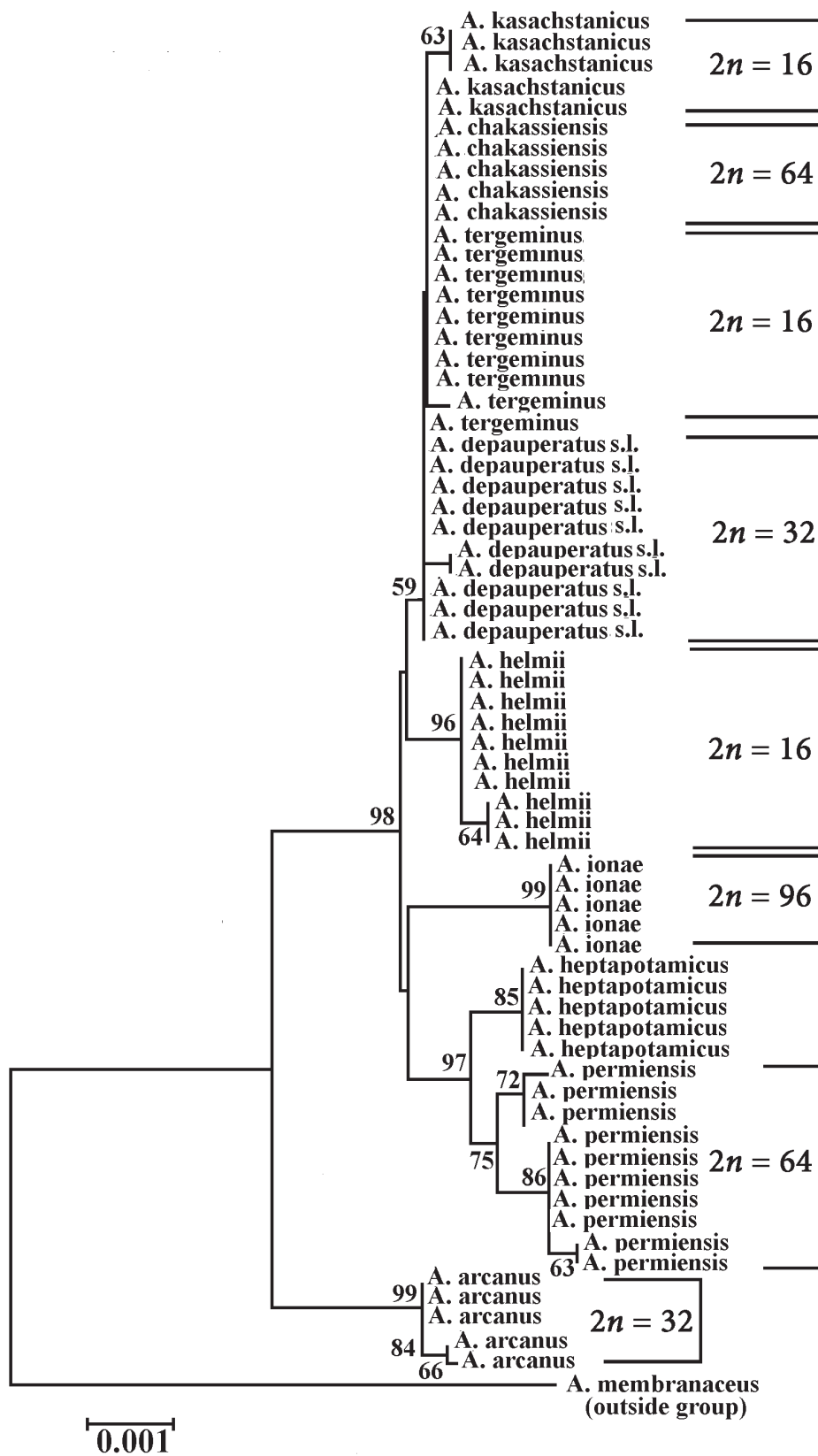


Рис. 2. Схема филогенетических взаимоотношений видов *Astragalus* секции *Helmia*, а также их вероятного гибридного производного – *A. arcanus*. Кладограмма построена методом NJ на основе данных секвенирования регионов *trnF-trnV* и *trnL* хлоропластного генома. Цифрами в узлах ветвей показаны значения бутстреп-поддержки $\geq 50\%$. Филогенетическое дерево реконструировали в программе MEGA 6.06 (140226).

в сети гаплотипов. Если диплоидный *A. helmii* (гаплотипы h3, h4), очевидно, представляет независимую, сестринскую линию развития, то гаплотипы других диплоидных таксонов могли быть исходными для некоторых гаплотипов-дериватов. Так, гаплотип h5 (диплоидный *A. tergeminus*), скорее всего, был исходным как для h6, h7 (некоторые образцы *A. tergeminus*), так и для h1, h2, характерных для уральской тетраплоидной расы *A. depauperatus* s. l. Гаплотип h15 единственный, который отмечен одновременно у двух видов: *A. chakassiensis* (у всех пяти изученных особей) и *A. kasachstanicus* (у одной из пяти исследованных особей). Все остальные гаплотипы не только видоспецифичны, но и не совпадают у разных разновидностей. Наличие общего гаплотипа у *A. chakassiensis* и *A. kasachstanicus*, конечно же, не может быть основанием для их объединения – это морфологически, экологически и географически резко обособленные таксоны. Кроме того, *A. kasachstanicus* диплоид – $2n = 2x = 16$, тогда как *A. chakassiensis* октоплоид – $2n = 8x = 64$ (Krivenko et al., 2022). Вероятно, частичное совпадение гаплотипов следует объяснить тем, что h15 был характерен для анцестора всех сибирских и среднеазиатских таксонов секции, а это значит, с определённой частотой может встречаться у всех или многих из них. Возможно, этим предковым видом является диплоидный *A. kasachstanicus*.

Весьма примечательны положение и полиморфизм *A. permiensis* s. l., демонстрируемые на рис. 1 и 2. Ранее (Goncharov, Popov, 1946) этот таксон считался синонимом *A. helmii*. Однако, как показывают наши исследования, он проявляет большее генетическое сходство со среднеазиатским *A. heptapotamicus*, и, вероятно, имеет среднеазиатское или сибирское, но не уральское, происхождение. Примечательно, что южноуральская разновидность *A. permiensis* var. *sacrimontis* (гора Тра-тау близ г. Стерлитамак) и типовая *A. permiensis* var. *permiensis* (Камень Дужной на р. Чусовая) не имеют общих гаплотипов, при этом гаплотипы последней могут рассматриваться как производные гаплотипов *A. permiensis* var. *sacrimontis*. Перечисленные

факты можно объяснить следующим образом: 1) *A. permiensis* мигрировал на Урал из Средней Азии или Южной Сибири; 2) на первоначальной родине вымер, но распространился на Южном Урале, где представлен разновидностью *A. permiensis* var. *sacrimontis*, с исходными гаплотипами h3, h11–13) затем распространился на Средний и Северный Урал, где возникли производные гаплотипы h8–10.

Показано, что *A. depauperatus* генетически неоднороден – гаплотипы уральских популяций h1 и h2 представляют дериваты гаплотипа h5 (*A. tergeminus*), тогда как *A. chakassiensis* представлен гаплотипом h15, который рассматривается нами как исходный для всех сибирских и среднеазиатских представителей секции. Эти данные соответствуют разным числам хромосом уральского *A. depauperatus* s. l. – $2n = 32$, *A. chakassiensis* – $2n = 64$ (Krivenko et al., 2022) и образцов *A. depauperatus* var. *depauperatus* из Алтайского края – $2n = 48$ (An'kova, Shaulo, 2012). Предположительно, *A. depauperatus* представляет комплекс, морфологически крайне близких видов-двойников. Наши исследования дают дополнительную аргументацию необходимости видовой самостоятельности *A. chakassiensis*.

Относительное сходство *A. arcanus* с представителями секции *Helmia*, демонстрируемое на графе сети гаплотипов (рис. 1), скорее всего, следует рассматривать как артефакт, обусловленный достаточно близким родством секций *Helmia* и *Erioceras* рода *Astragalus*. В этих группах видов, скорее всего, сохраняется значительное сходство FV TabCD хпДНК, восходящее к общему предку.

Благодарности

Авторы выражают признательность А. Л. Эбелю, собравшему для наших исследований семена *Astragalus chakassienis*.

Acknowledgment

The authors express their gratitude to A. L. Ebel, who collected the seeds of *Astragalus chakassienis* for our research.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- An'kova T. V., Shaulo D. N. 2012. IAPT/IOPB chromosome data 14 (K. Marhold, ed.). *Taxon* 61(6): 1336. DOI: 10.1002/tax.616027
- Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N., Neale D. B., Moran G. F. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 92(6): 673–679. DOI: 10.1007/BF00226088

Goncharov N. F., Popov M. G. 1946. Genus *Astragalus* L. – Milkwetch. Section *Helmia* Bge. In: *Flora SSSR [Flora of USSR]*. Vol. 12. Moscow; Leningrad: Izdatelstvo AN SSSR. Pp. 545–549. [In Russian] (**Гончаров Н. Ф., Попов М. Г.** Род *Astragalus* L. – Астрagal. Секция *Helmia* Bge // Флора СССР. Т. 12. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1946. С. 545–549).

Grivet D., Heinze B., Vendramin G. G., Petit R. J. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Mol. Ecol. Notes* 1(4): 345–349. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2001.00107.x

Knyazev M. S. 2019. The review of genus *Astragalus* section *Helmia* (Fabaceae). *Novosti sistematiki vysshikh rasteniy [Novit. Syst. Pl. Vasc.]* 50: 120–131. [In Russian with English abstract] (**Князев М. С.** Ревизия секции *Helmia* рода *Astragalus* (Fabaceae) // Новости сист. высш. раст., 2019. Т. 50. С. 120–131). DOI: 10.31111/novitates/2019.50.120

Knyazev M. S., Krivenko D. A., Philippov E. G. 2019. New species of the genus *Astragalus* (Fabaceae) from Central Kazakhstan. *Bot. Zhurn.* 104(5): 136–140. [In Russian and Latin] (**Князев М. С., Кривенко Д. А., Филиппов Е. Г.** Новый вид рода *Astragalus* (Fabaceae) из Центрального Казахстана // Бот. журн., 2019. Т. 104, № 5. С. 136–140). DOI: 10.1134/S0006813619050089

Knyazev M. S., Philippov E. G. 2019. Investigation of chloroplast DNA variability of some representatives of section *Helmia* of the genus *Astragalus* (Fabaceae). In: *Modern synthesis methodologies for creating drugs and functional materials (MOSM 2018). Proceedings of the II International Conference 15–17 November 2018* Yekaterinburg, Russia. DOI: 10.1063/1.5087359

Kress W. J., Erickson D. L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2(6): e508. DOI: 10.1371/journal.pone.0000508

Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A., Janzen D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* 102(23): 8369–8374. DOI: 10.1073/pnas.0503123102

Krivenko D. A., Kuzmina P. A., Chimitov D. G., Knyazev M. S., Vishnyakov V. S. 2022. IAPT chromosome data 38/5 (K. Marhold & J. Kučera, eds). *Taxon* 71(6): 1356–1357. DOI: 10.1002/tax.12836

Podlech D., Zarre Sh. 2013. A taxonomic revision of the genus *Astragalus* L. (*Leguminosae*) in the Old World. Vol. 1–3. Vienna: Naturhistorisches Museum Wien. 2439 pp.

Popov M. G. 1949. *Astragalus ionae* Palib. *Catalogus Plantarum Herb. Fl. USSR (Leningrad)* 11(67): 62–63. [In Russian] (**Попов М. Г.** *Astragalus ionae* Palib. // Список раст. герб. Фл. СССР (Ленинград). 1949. Т. 11, вып. 67. С. 62–63).

Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. E., Small R. L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92(1): 142–166. DOI: 10.3732/ajb.92.1.142

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. *Am. J. Bot.* 94(3): 275–288. DOI: 10.3732/ajb.94.3.275

Shneer V. S. 1991. Chloroplast DNA as a source of information for the systematics and phylogeny of higher plants. *Bot. Zhurn.* 76(12): 1657–1673. [In Russian] (**Шнеер В. С.** Хлоропластная ДНК как источник информации для систематики и филогении высших растений // Бот. журн., 1991. Т. 76. № 12. С. 1657–1673).

Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermet T., Corthier G., Brochmann C., Willerslev E. 2007. Power and limitation of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA-barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35(3): e14. DOI: 10.1093/nar/gkl938

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17(5): 1105–1109. DOI: 10.1007/BF00037152