



УДК 582.739:575.22+57.063.7(470.40/.43)

Что такое *Lotus zhegulensis* Клок. (Fabaceae): самостоятельный вид, эндемичный для Среднего Поволжья, или форма изменчивости широко распространенного *L. corniculatus* L.?

Т. Е. Крамина^{1,4}, И. Г. Мещерский^{2,5}, А. В. Федорова^{3,6}, Н. В. Васильева^{3,7},
Н. Ю. Степанова^{3,8}, И. А. Шанцер^{3,9*}

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет,
ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, г. Москва, 119234, Россия

² Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Ленинский пр., д. 33, г. Москва, 119071, Россия

³ Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Ботаническая ул., д. 4, г. Москва, 127276, Россия

⁴ ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6417-3678>; ⁵ ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4739-3342>

⁶ ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7362-2124>; ⁷ ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4060-7988>

⁸ ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-8414-4794>

⁹ E-mail: ischanzer@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4216-9923>

* Автор для переписки

Ключевые слова: бобовые, вид, генетика популяций, микросателлиты, популяция, систематика, *Lotus zhegulensis*.

Аннотация. Несколько выборок из популяций лядвенцев *Lotus corniculatus* s. l. и *L. zhegulensis* исследованы с использованием микросателлитных и нескольких секвенированных ядерных (ITS) и пластидных (*atpB-rbcL*, *ndhC-trnV*, *rpl32-trnL*(UAG), *trnH-psbA*, *trnL-trnF*) маркеров. В анализ включены 9 локальных популяций в долине Волги от Ульяновска на севере до Волгограда на юге, а также 2 популяции из Липецкой и Московской областей. Анализ микросателлитных маркеров в программе STRUCTURE разделил исследованную выборку на три генетических кластера. Популяции из Московской и Липецкой областей и 3 локальные популяции из locus classicus *L. zhegulensis* в Самарской области оказались в наибольшей степени генетически дифференцированными, в то время как остальные популяции оказались генетически смешанными с разной пропорцией участия всех трех кластеров. Низкие попарные значения *Fst* указывают на слабую генетическую дифференциацию популяций *Lotus* и говорят о внутривидовом характере наблюдаемой изменчивости. Анализ секвенированных пластидных и ядерных последовательностей ДНК выявил их малую информативность. Наблюдаемые замены и индели преимущественно носят характер аутопоморфий и характеризуют отдельные образцы или небольшие группы образцов, но не популяции в целом. Таким образом, проведенное нами исследование позволяет прийти к уверенному выводу, что популяции *Lotus* с правого берега р. Волги в окрестностях Жигулевской возвышенности, описанные как *L. zhegulensis*, генетически слабо дифференцированы от других популяций *Lotus corniculatus* s. l. и, соответственно, не заслуживают рассмотрения в ранге самостоятельного вида.

Is *Lotus zhegulensis* Klok. (Fabaceae) a separate species endemic of the Middle Volga Region or just a variety of a widespread *L. corniculatus* L.?

T. E. Kramina¹, I. G. Meschersky², A. V. Fedorova³, N. V. Vasilieva³,
N. Yu. Stepanova³, I. A. Schanzer³

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie Gory, 1-12, Moscow, 119991, Russian Federation

² A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninskij prosp., 33, Moscow, 119071, Russian Federation

³ Tsitsin Main Botanical Garden RAS, Botanicheskaya str., 4, Moscow, 127276, Russian Federation

Keywords: Fabaceae, *Lotus zhegulensis*, population, population genetics, species, SSR markers, taxonomy.

Summary. We have studied several samples from *Lotus corniculatus* s. l. and *L. zhegulensis* populations with the use of SSR and sequenced nuclear (ITS) and plastid (*atpB-rbcL*, *ndhC-trnV*, *rpl32-trnL(UAG)*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF*) markers. We analysed 9 local populations from the Volga River valley ranging from Ulyanovsk in the north to Volgograd in the south, as well as two local populations from Moscow and Lipetsk Provinces. Analyses of SSR markers using the STRUCRURE program divided the sample into three genetic clusters. Populations from Moscow and Lipetsk Provinces, and three local populations from the 'locus classicus' location of *L. zhegulensis* in Samara Province appeared to be the most genetically differentiated while all the other populations were variously genetically admixed. Low pairwise *F_{st}* values indicate low genetic differentiation of *Lotus* populations and the intraspecific nature of the revealed diversity. The nuclear and plastid DNA sequences analyzed yielded little information. Substitutions and indels revealed were mostly autapomorphies characteristic of separate specimens or small groups of specimens but not of populations. Our study enables to firmly conclude that *Lotus* populations from the right bank of the Volga River in vicinity of Zhiguli upland described as *L. zhegulensis* are weakly genetically differentiated from other populations of *Lotus corniculatus* s. l. and, hence, cannot be regarded as a separate species.

Lotus zhegulensis Клок. (лядвенец жигулевский) был описан М. В. Клоковым (Клоков, 1953) как один из представителей им же выделенного, но формально не описанного ряда *Ambigui*, который Клоков не только отличал от ряда *Corniculati* (к нему Клоков относил *L. corniculatus* L.), но и считал предковым по отношению к последнему. Сам *L. zhegulensis* Клоков считал реликтом, распространенным по галечникам и песчаным берегам рек Волги, Хопра и Суры. Вид внешне схож с *L. corniculatus*, который распространен гораздо шире. В качестве главных отличительных признаков М. В. Клоков (Клоков, 1953) выделял следующие: полуприжатое опушение стеблей и цветоносов, негустое отстоящее опушение на листьях и густое мохнатое на чашечках. Сравнивая с другими видами, имеющими также выраженное отстоящее опушение, М. В. Клоков отмечал, что в отличие от *L. caucasicus* Курт. и *L. tauricus* Juz. опушение *L. zhegulensis* менее густое, а на цветоносах почти прижатое, не отклоненное, кроме того, чашечки у последнего заметно короче, до 6 мм (а не до 8–9 мм). Сопоставляя *L. zhegulensis* и *L. ambiguus* Bess., М. В. Клоков делал акцент на более редком опушении и более крупных листьях и цветках жигулевско-

го лядвенца. Тип: «Куйбышевская обл., Жигули, Гос. заповедник, близ Бахиловой Поляны, берег Волги, в верхней части бечевника у опушки лиственного леса (песок и галька). 30 VI 1951. С. Юзепчук и В. Голубкова» (LE!).

Н. А. Миняев и З. Г. Улле (Minyaev, Ulle, 1987) отметили, что чашечка *L. zhegulensis* характеризуется некоторой степенью зигоморфности: три нижних зубца прямые, два верхних отогнуты кверху под острым углом к оси цветка, хотя зигоморфия чашечки встречается и у некоторых других видов комплекса *L. corniculatus*. В качестве важных отличительных признаков они также выделили следующие. У *L. corniculatus* листочки кроющего листа соцветия ланцетовидные, островатые. Бобы линейные цилиндрические. У *L. zhegulensis* листочки кроющего листа соцветия широколанцетовидные или ланцетовидные, туповато заостренные. Бобы линейные, но заметно расширенные на конце, вздутые и сжатые со спинки.

Lotus zhegulensis часто считается эндемиком Самарской Луки (Plaksina, 1999; Пјина, 2008). Е. К. Хлесткина и И. Г. Чухина (Khlestkina, Chukhina, 2020) отнесли его к диким родичам культурных растений. Указание на произрас-

тание его в Новгородской области (Krupkina, 2020), вероятно, является ошибкой определения. Вместе с тем, в недавней публикации А. А. Гомолко (Gomolko, 2019) автор приводит для территории Белоруссии 5 видов *Lotus*, причем статистически подтверждает различия между ними, в т. ч. и между *L. zhegulensis* и *L. corniculatus*, по 10 морфологическим признакам. Однако сколько было изучено образцов *L. zhegulensis* и почему эти образцы были определены именно таким образом, из его кратких тезисов остается неясным. Так как в данной студенческой работе не приведено никаких конкретных результатов статистического анализа и не использованы многомерные методы анализа, утверждения автора вызывают серьезные сомнения. Вместе с тем, у ряда поволжских ботаников существование *L. zhegulensis* как самостоятельного вида, видимо, сомнений не вызывает. Так, вид был исключен из последнего издания Красной книги Самарской области как «типичный в соответствующих местообитаниях вид, устойчиво удерживающий ценотические позиции даже в условиях умеренного антропогенного нарушения сообществ, не нуждающийся в настоящее время в охране» (Saksonov et al., 2017: с. 367).

В списке эндемичных растений бассейна Волги *L. zhegulensis*, однако, не упоминается (Vasjukov et al., 2015). В работах Т. Е. Краминой (Kramina, Tikhomirov, 1991; Kramina, 1999; Barykina, Kramina, 2006; Kramina et al., 2018) было показано, что изменчивость морфологических признаков у образцов *L. zhegulensis*, собранных в *locus classicus* данного вида, не выходит за пределы изменчивости *L. corniculatus* s. l. При этом изменчивость отдельных морфологических признаков в разных популяциях сильно перекрывается, делая различия средних значений статистически недостоверными. В работе Р. П. Барыкиной и Т. Е. Краминой (Barykina, Kramina, 2006: р. 33) авторы прямо пишут, что «*L. zhegulensis* Klok., and some others were proved to be so close to *L. corniculatus* s. str. by their morphological characters, that their recognition at the specific level has been rejected, and they have been included in *L. corniculatus* sensu lato». Равным образом, никаких отличий, выходящих за пределы изменчивости *L. corniculatus*, не было обнаружено и у 8 образцов, исследованных с использованием микросателлитных маркеров, а также у образца, из которого была расшифрована нуклеотидная последовательность пластидного межгенного спейсера *trnL-trnF* (Kramina et al., 2018). Изуче-

ние чисел хромосом показало, что *L. zhegulensis*, так же, как и *L. corniculatus*, является тетраплоидом $2n = 2x = 24$ (Larsen, Zertová, 1963; Grant, 1995; Kramina et al., 2018).

Учитывая существующие до сих пор противоположные мнения о статусе *L. zhegulensis*, целью нашего исследования было изучить генетическую структуру популяций данного вида в сравнении с *L. corniculatus* с использованием выборок большего размера и микросателлитных, ядерных и пластидных маркеров.

Материал и методы

Изученный материал

Материалом для микросателлитного анализа послужили 11 выборок из локальных природных популяций *L. zhegulensis* и *L. corniculatus*, собранных в Нижнем Поволжье и средней полосе европейской части России в 1987, 1989, 2008 и 2019 гг. (табл. 1; рис. 1).

Выделение ДНК

ДНК выделяли из 20 мг сухих листьев гербарных или высушенных в силикагеле образцов набором NucleoSpin Plant kit (Macherey-Nagel, Germany) согласно инструкции производителя или СТАВ-методом (Doyle J. J., Doyle J. L., 1987).

Получение микросателлитных данных

Выборка включала 72 образца из 11 популяций. Изучены семь микросателлитных локусов, описанных для *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen с известным для данного вида расположением на хромосомах гаплоидного набора ($x = 6$): TM0113 – хромосома 1, TM0035, TM0127 – хромосома 3, TM0030 – хромосома 4, TM0186 – хромосома 5, TM0014, TM0055 – хромосома 6 (Kai et al., 2010). ПЦР проводили с флуоресцентно-мечеными праймерами, синтезированными в компании Синтол (Москва, Россия). Последовательности праймеров и условия реакций ПЦР взяты из работы Kai et al. (2010). Фрагментный анализ продуктов ПЦР выполняли на секвенаторе 3500 Genetic Analyzer в присутствии размерного стандарта GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems). Полученные спектрограммы обрабатывали в программе GeneMapper. Затем совокупность значений длин фрагментов вручную разделяли на дискретные классы – аллели – в соответствии с ожидаемым размером tandemного повтора.

Таблица 1

Исследованные популяции *Lotus corniculatus* s. l. и номера последовательностей ДНК, депонированных в GenBank NCBI

№	Местонахождение	Гербарий	Число образцов	ITS	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ndhC-trnV</i>	<i>rp/32-trnL</i>	<i>atpB-rbcL</i>
1	Московская обл., Одинцовский р-н, 0,5 км зап. с. Лудино, луг у шоссе. 55°42'12,2" с. ш. 36°45'28,2" в. д. 03 VII 2008. Т. Е. Крамина	MW	8	–	–	–	–	–	–
2	Липецкая обл., Краинский р-н. ок. д. Засосенка, лев. берег р. Сосна, 52°43'01,2" с. ш. 38°54'26,0" в. д. 28 VI 1987. В. Н. Тихомиров, Е. Э. Северова, Е. С. Бабаева	MW	8	OK644700	–	OK863890	OK863897	OK863883	OK863958 – OK863963
3	г. Ульяновск, пойма р.Свяги, 54°19'49,5" с. ш. 48°20'16,5" в. д. 15 VII 2008. А. В. Масленников	MW	8	OK644699	OK863876	OK863889	OK863896	OK863882	OK863950 – OK863957
4	Ульяновская обл., Новоспасский р-н, 2 км к С от Новоспаское, у полевой дороги на песке. 53°10'23,8" с. ш. 47°43'51,7" в. д. 15 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	MNA	2	OK644698	OK863875	OK863888	OK863895	OK863881	OK863911, OK863912
5	Куйбышевская (Самарская) обл., окр. с. Бахилова Поляна, берег Волги, на галечнике, 53°26'19,1" с. ш. 49°39'21,5" в. д. 15 VI 1989. С. Саксонов, Р. Уткина	MW	25	OK644701	OK863877	OK863891	OK863898	OK863884	OK863921 – OK863949
6	Самарская обл., Жигулевский государственный природный заповедник имени И. И. Спрыгина, пос. Бахилова Поляна, правый берег р. Волги, бичева: на песке и задернованном галечнике. 53°26'18,5" с. ш. 49°39'50,3" в. д. 14 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	MNA	8	–	–	–	–	–	OK863913 – OK863920
7	Самарская обл., Жигули, с. Ширяево, по берегу Волги на песке и галечнике. 53°25'24,5" с. ш. 50°0'56,4" в. д. 14 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	MNA	6	OK644697	OK863874	OK863887	OK863894	OK863880	OK863906 – OK863910
8	Саратовская обл., Красноармейский р-н, 5,5 км ЮЗ Красноармейска, пойма левого берега р. Грязный Карамыш, обочина дороги. 50°58'48,0" с. ш. 45°36'34,8" в. д. 11 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	MNA	1	–	–	–	–	–	OK863905

Таблица 1 (окончание)

№	Местонахождение	Гербарий	Число образцов	ITS	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ndhC-trnV</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>atpB-rbcL</i>
9	Саратовская обл., Ровенский р-н, 3 км к С от пос. Ровное, левый берег р. Волги, низкий песчаный берег р. Волги за полосой тростников. На песке, единственное растение. 50°48'32,3" с. ш. 46°5'34,8" в. д. 5 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	МНА	1	OK644695	OK863872	OK863885	OK863892	OK863878	OK863899
10	Волгоградская обл., Ольховский р-н, между Дмитриевкой и Захаровкой, высокий правый берег р. Иловли, выходы мела вдоль дороги. 49°42'28,5" с. ш. 44°19'24,5" в. д. 9 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	МНА	1	–	–	–	–	–	OK863904
11	г. Волгоград, Красноармейский р-н, Сарепта, ЮВ край пересохшего Сарептского затона, выпадаемые лужайки. 48°32'4,4" с. ш. 44°29'52,2" в. д. 09 VI 2019. И. Шанцер, А. Федорова, О. Кузнецова	МНА	4	OK644696	OK863873	OK863886	OK863893	OK863879	OK863900 – OK863903

Анализ микросателлитных данных

Для оценки оптимального числа генетических кластеров в изучаемой группе из 11 популяций был применен подход Байеса, основанный на алгоритме Марковских цепей Монте-Карло и реализованный в программе STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Для каждого предполагаемого числа кластеров К от 1 до 11 проводили по пять независимых запусков Марковских цепей Монте-Карло со 100 000 предварительных итераций (burn-in) и 500 000 основных итераций. Использовали сочетание моделей генетического смешения (Admixture) и приоритета точки сбора (LocPrior) со скоррелированными частотами аллелей. Оптимальное число К определяли путем сравнения логарифма функции вероятности $[\ln P(K)]$ (Pritchard et al., 2000) и методом ΔK (Evanno et al., 2005), основанном на стандартизованном ускорении изменения $\ln P(K)$, с использованием программы STRUCTURE HARVESTER (Earl, von Holdt, 2012). Результаты расчетов по каждому К обобщали и визуализировали в программе CLUMPAK (Korolman et al., 2015). Популяционно-генетические параметры, характеризующие генетическую дифференциацию популяций, рассчитывали в программе SPAGeDi (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity) v. 1.3d (Hardy, Vekemans, 2002).

Пластидные и ядерные маркеры

Для предварительного скрининга были использованы 5 пластидных межгенных спейсеров (*atpB-rbcL*, *ndhC-trnV*, *rpl32-trnL*(UAG), *trnH-psbA*, *trnL-trnF*) и внутренний транскрибируемый спейсер ядерного рибосомального оперона ITS1-5.8S-ITS2 (ITS)), секвенированные у 7 образцов из популяций 2–5, 7, 9 и 11. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 20 мкл. Смесь для ПЦР содержала 13 мкл деионизированной воды, 5 пмоль каждого праймера, 4 мкл мастер-микса 5X Mas^{DD}TaqMIX-2025 на основе термостабильной SmarTaq ДНК-полимеразы (ЗАО Диалат Лтд., Россия) и 1,5–2 нг ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе MJ Research PTC220 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США) при следующих условиях: 95 °С – 3 мин.; 95 °С – 30 сек., 48 °С – 1 мин., 72 °С – 2 мин. (28 циклов); 72 °С – 3 мин. Продукты ПЦР разделяли на 1%-м агарозном геле в 0,5 × TBE (pH = 8,3) буфере, содержащем бромид этидия, и очищали пересадением в 0,125 М/л растворе ацетата аммония в 70%-м этаноле. После очистки про-

дукты ПЦР напрямую секвенировали в обоих направлениях на ДНК-анализаторе 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, США) в компании Синтол (Москва, Россия). Нуклеотидная последовательность *atpB-rbcL*, оказавшаяся наиболее длинной, была расшифрована у 58 образцов из

всех популяций, кроме 1 по причине недостаточного количества материала. Все секвенированные последовательности были депонированы в базу данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); их номера приведены в таблице 1.

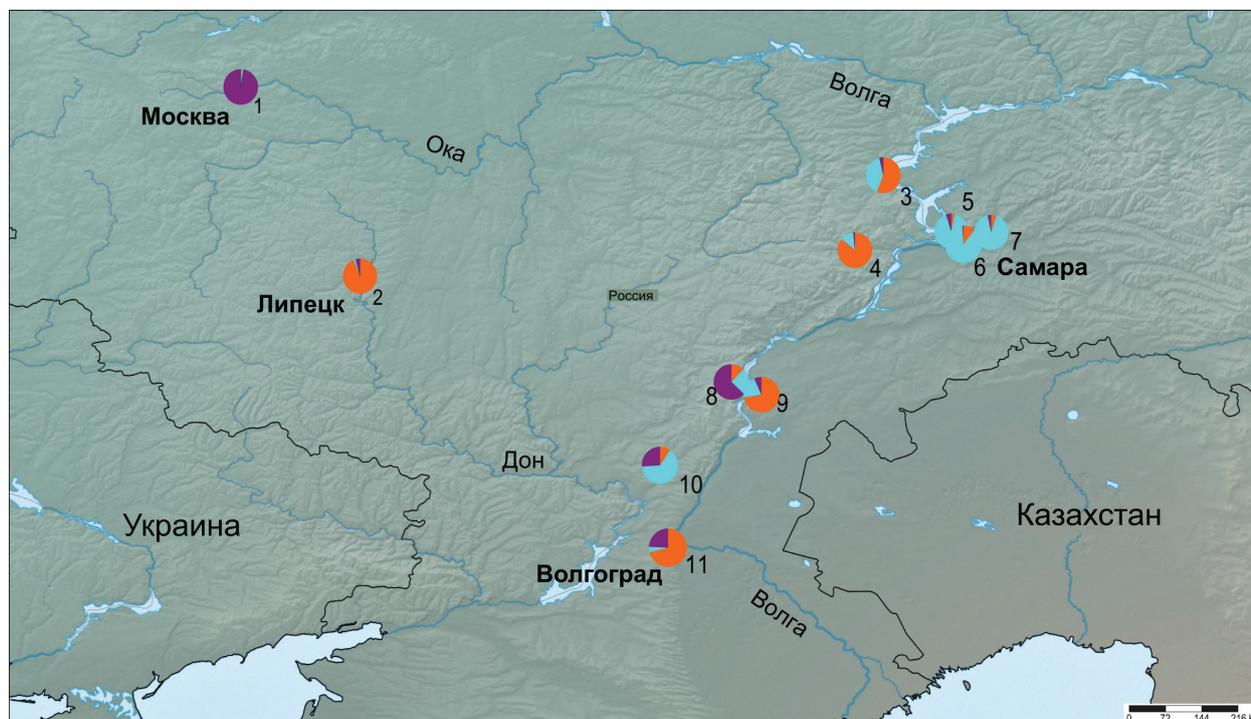


Рис. 1. Географическое положение изученных популяций *Lotus* и их генетическая дифференциация по результатам анализа микросателлитных маркеров в программе STRUCTURE (см. рис. 2С). Круговые диаграммы показывают соотношение генетического материала из трех разных кластеров у образцов каждой из популяций. Цвета, обозначающие кластеры: 1-й кластер – фиолетовый; 2-й кластер – оранжевый; 3-й кластер – голубой.

Анализ данных секвенирования

Полученные нуклеотидные последовательности были выравнены в программе MAFFT (Katoh et al., 2002; Katoh, Standley, 2013) с параметрами L-INS-i (аккуратная стратегия выравнивания) с последующей обработкой выравнивания в программе BioEdit ver. 7.0 (Hall, 1999). Последовательности пластидных маркеров, полученные у 7 образцов в ходе предварительного скрининга, были объединены в общее выравнивание. Последовательности участка *atpB-rbcL* были дополнительно отредактированы путем удаления неинформативных и плохо прочитанных участков. Оба выравнивания были проанализированы методом статистической парсимонии в программе TCS ver. 1.2 (Clement et al., 2000). Другие методы анализа не использовались в связи со слабыми различиями изученных последовательностей.

Результаты

Микросателлитные данные

Анализ полученных пиков флуоресценции показал, что все образцы содержат в каждом из 7 исследованных локусов от 1 до 4 аллелей и, вероятнее всего, являются тетраплоидами.

Программа STRUCTURE выявила наиболее оптимальное разделение исследуемой выборки на три генетических кластера, соответствующее максимальным значениям логарифма функции вероятности ($\ln P(K)$) перед выходом на плато и максимальным значениям ΔK (рис. 2). При этом часть локальных популяций оказались отнесенными к данным кластерам с высокой вероятностью (более 90 %), а часть оказались генетически смешанными (рис. 1, 2). Так, образцы из популяции 1 (Московская область) были

отнесены к первому кластеру с кумулятивной апостериорной вероятностью более 97 %. Образцы из популяции 2 (Липецкая область) были все отнесены ко второму кластеру с кумулятивной апостериорной вероятностью около 94 %. Образцы из популяций 5, 6 (*L. zhegulensis* locus classicus: Самарская обл., Жигули, окр. с. Бахилова Поляна, выборки, собранные в 1989 и 2019 гг. соответственно) и 7 (Самарская обл., Жигули, окр. с. Ширяево) были отнесены к третьему кластеру с кумулятивными апостериорными вероятностями 92, 89 и 92 % соответственно. Более низкие значения апостериорной вероятности для популяции 6 связаны с присутствием там одного генетически смешанного образца, который с ве-

роятностью около 70 % может быть отнесен ко 2-му кластеру.

Географически кластеры распределились таким образом (рис. 1), что популяции из Московской и Липецкой областей и из Жигулей в Самарской области оказались наименее генетически смешанными. В то же время популяции 3, 4 и 11, расположенные вдоль Волги от Ульяновской до Волгоградской области, демонстрируют значительную степень генетического смешения между двумя или всеми тремя кластерами. Из популяций 8, 9 и 10 из Саратовской и Волгоградской областей было исследовано только по одному образцу, каждый из которых по результатам анализа оказался генетически смешанным.

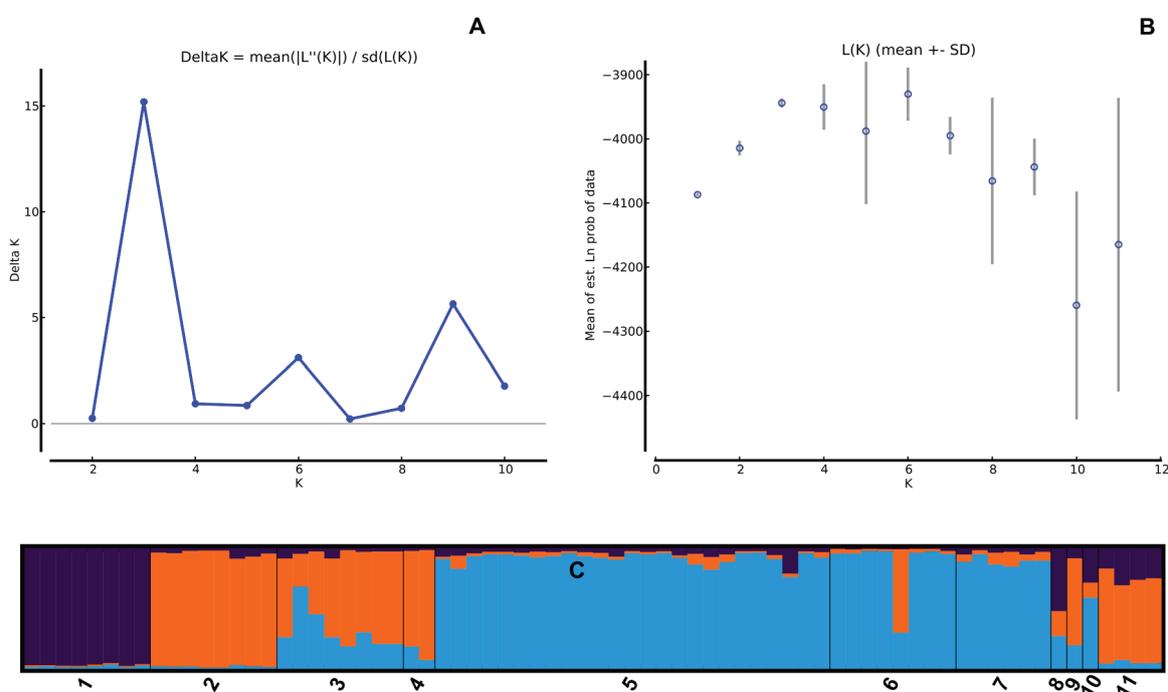


Рис. 2. Результаты анализа микросателлитных маркеров в программе STRUCTURE: А – значения ΔK (среднее для 5 независимых анализов значение функции вероятности, деленное на стандартное отклонение) для $K = 1 \dots 11$; В – среднее для 5 независимых анализов значение логарифма функции вероятности и стандартное отклонение для $K = 1 \dots 11$; С – генетическая структура исследованных популяций лядвенца по данным анализа в программе STRUCTURE для $K = 3$. Каждый индивидуальный образец представлен отдельным столбиком, разделенным на обозначенные разными цветами три части, соответствующие апостериорным вероятностям отнесения данного образца к одному из трех кластеров. Популяции обозначены цифрами под столбчатой диаграммой.

Глобальное значение F_{st} , характеризующее степень генетической дифференциации всех рассматриваемых популяций, оказалось равным $0,0396 \pm 0,0033$ ($p = 0,000$). Значения F_{st} , полученные при попарном сравнении всех популяций, приведены в таблице 2. Их порядок во всех случаях аналогичен глобальному значению, за

исключением пары популяций 1 и 4, для которых эта величина была несколько выше ($F_{st} = 0,1246$). Это может быть связано как с тем, что различия между этими популяциями действительно выше, так и с погрешностью, связанной с недостаточностью выборки (в популяции 4 было изучено только 2 образца).

Таблица 2

Попарные значения Fst между 8 изученными популяциями *Lotus*. В первых строке и столбце указаны номера популяций. Жирным шрифтом выделены популяции из Жигулей

	1	2	3	4	5	6	7	11
1	-							
2	0.0593	-						
3	0.0493	0.0204	-					
4	0.1246	0.0516	0.0549	-				
5	0.0335	0.0396	0.0241	0.0521	-			
6	0.0608	0.0615	0.0239	0.0815	0.0115	-		
7	0.0647	0.0387	0.032	0.0634	0.0114	0.0321	-	
11	0.0615	0.0646	0.0607	0.0955	0.0687	0.0826	0.0526	-

Результаты секвенирования

Длина выравнивания последовательностей ITS составила 635 позиций. Все последовательности оказались идентичными, за исключением образцов из 7 и 9 популяций, отличавшихся присутствием двух мононуклеотидных инделей. Кроме того, во всех 7 последовательностях присутствовал единственный полиморфный (А или G) сайт в позиции выравнивания 204.

Длины выравниваний пластидных межгенных спейсеров *rpl32-trnL*, *psbA-trnH*, *ndhC-trnV*, *trnL-trnF* и *atpB-rbcL* после удаления плохо прочитавшихся участков в начале последовательностей составили 378, 344, 418, 362 и 879 позиций соответственно. Различия между последователь-

ностями по числу замен и инделей представлены в таблице 3. Исследованные последовательности всех 7 образцов из 7 популяций (2–5, 7, 9, 11) отличаются друг от друга различным набором мутаций в одном или нескольких локусах, что не позволяет разделить их на группы. Анализ в программе TCS построил сети из 6 или 7 (с учетом инделей) гаплотипов (рис. 3А, 3В). Максимальное число мутационных шагов, допускающих экономное решение, программа в обоих случаях рассчитала равным 21. В сети, построенной без учета инделей, последовательности обоих образцов *L. zhegulensis* из популяций 5 и 7 объединены в один гаплотип.

Таблица 3

Число нуклеотидных замен и инделей в пяти пластидных межгенных спейсерах, выявленное у образцов *Lotus* из 7 исследованных популяций.
Жирным шрифтом выделены популяции из Жигулей

№ популяции	замены/индели	<i>rpl32-trnL</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>ndhC-trnV</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>atpB-rbcL</i>
2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	5/1	0/0	4/1	1/0	0/0	0/0
4	3/2	0/0	0/0	1/2	0/0	2/0
5	1/2	0/1	0/0	0/2	1/0	0/0
7	2/1	0/0	0/0	0/0	2/0	0/1
9	1/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0
11	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Отдельное выравнивание спейсера *atpB-rbcL* включало 58 последовательностей образцов из всех популяций, кроме 1, и после удаления неинформативных инделей и плохо прочитавшихся участков составило 770 п. н. В выравнивание были включены полученные из GenBank последовательности *L. corniculatus* (MT528596) и *L. japonicus* (AP002983 и AP022636) в качестве

внешней группы. В выравнивании были учтены 7 замен. В результате анализа в программе TCS была построена одна сеть из 8 гаплотипов (рис. 3С). Максимальное число мутационных шагов, допускающих экономное решение, программа рассчитала равным 12, но фактические различия между гаплотипами не превышают одного мутационного шага. Полученная сеть, одна-

ко, не отражает межпопуляционных различий. Большинство последовательностей образцов из всех популяций *L. corniculatus* и *L. zhegulensis*, кроме 4, оказались идентичными и были объединены программой в один внутренний гаплотип. К нему же были отнесены и обе последовательности *L. japonicus*, взятые в анализ в качестве внешней группы. В качестве самостоятельных гаплотипов программа выделила обе последо-

вательности из популяции 4, единственную последовательность образца из популяции 10, две последовательности *L. zhegulensis* из популяции 5 и одну из популяции 7. Также в качестве отдельного гаплотипа (outgr c) выделена последовательность *L. corniculatus* из GenBank, взятая в качестве внешней группы. Его положение оказалось, однако, неопределенным, что вызвало появление в сети замкнутой петли.

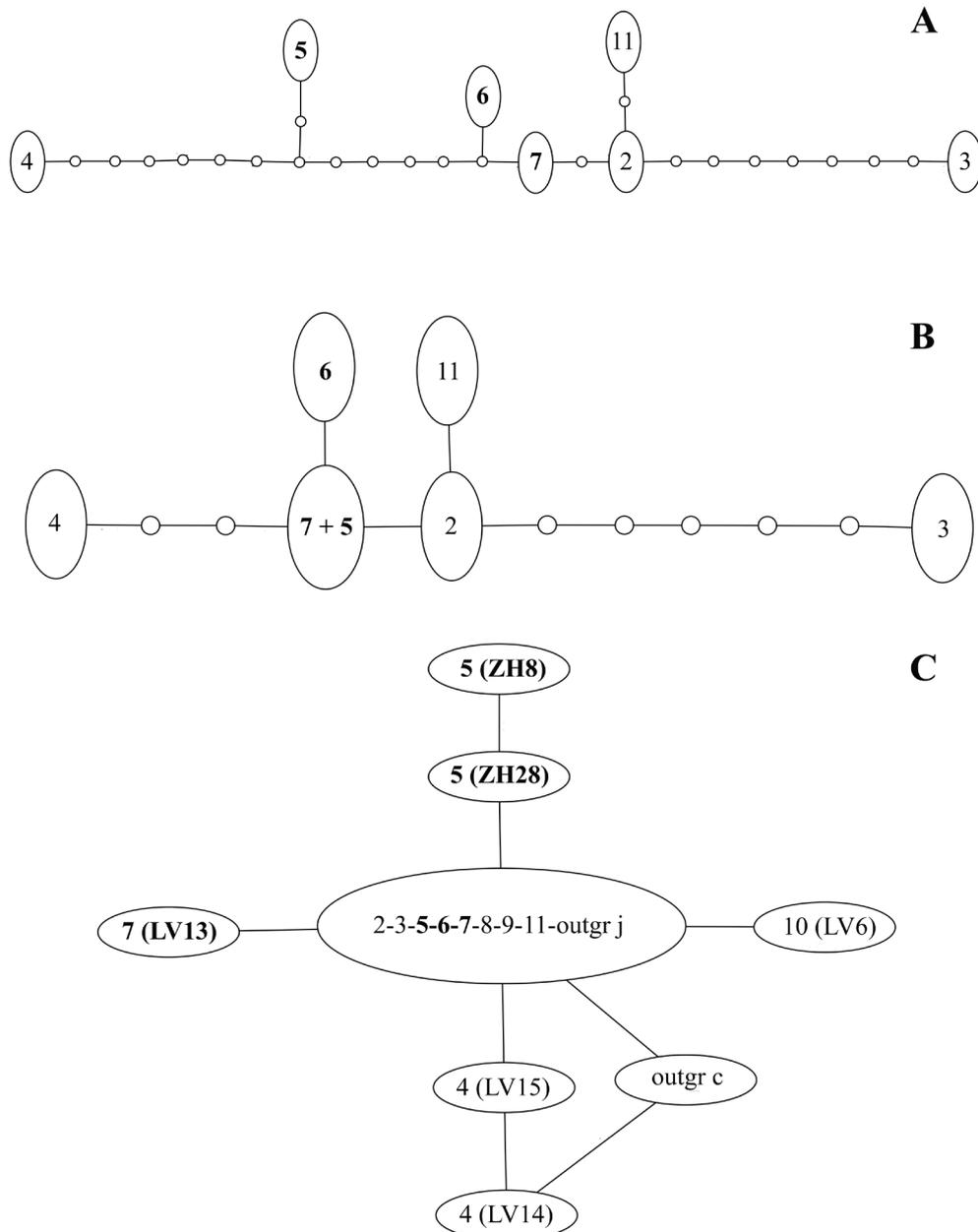


Рис. 3. Сети, отражающие генеалогические отношения пластидных гаплотипов, выявленных в популяциях *Lotus* в результате анализа в программе TCS: А – сеть по данным пяти пластидных участков для 7 образцов из 7 популяций. Номера гаплотипов соответствуют номерам популяций. Жирным шрифтом выделены популяции из Жигулей. Маленькие кружки обозначают отсутствующие в данных гипотетические гаплотипы, дедуцированные программой. Линии соответствуют одному мутационному шагу; В – то же, но без учета инделей; С – сеть по данным пластидного межгенного спейсера *atpB-rbcL* для 58 образцов из популяций 2–11. Последовательности, включенные в анализ в качестве внешней группы, обозначены как outgr c (*L. corniculatus*) и outgr j (*L. japonicus*).

Обсуждение

Наблюдаемые паттерны изменчивости *Lotus corniculatus* s. l. не позволяют заключить, что популяции из Жигулей заслуживают рассмотрения в качестве самостоятельного вида. Секвенированные нуклеотидные последовательности ITS и пластидных спейсеров оказались мало информативны. Наблюдаемые замены и индели преимущественно носят характер аутопоморфий и характеризуют отдельные образцы или небольшие группы образцов, но не популяции в целом. При этом последовательности *L. japonicus* и *L. corniculatus*, взятые из GenBank в качестве внешней группы, также оказываются в пределах диапазона изменчивости исследуемой группы. Гораздо более информативную картину дают микросателлитные маркеры. Байесовский анализ в программе STRUCTURE разделил выборку на три кластера, один из которых представлен в значительной мере популяциями *L. zhegulensis* из Жигулей. Это, несомненно, указывает на своеобразие жигулевских популяций лядвенца, но все же не позволяет рассматривать их в ранге самостоятельного вида, так как московская и липецкая популяции *L. corniculatus* столь же своеобразны и представлены образцами, отнесенными к двум другим кластерам. При этом все популяции, расположенные вдоль Волги, кроме жигулевских, демонстрируют значительную степень генетического смешения между кластерами. Низкие

значения *F_{st}*, характеризующие генетическую дифференциацию популяций, говорят о внутривидовом характере наблюдаемой изменчивости. Полученные результаты подтверждают выводы, сделанные в более ранних исследованиях как морфологической (Крамина, 1999), так и молекулярно-генетической (Крамина et al., 2018) изменчивости полиплоидного комплекса *L. corniculatus*. Так, в последней работе, выполненной в гораздо большем масштабе, с учетом как тетра-, так и диплоидных представителей комплекса, популяция лядвенца из Жигулей никак не выделялась из прочих популяций *L. corniculatus* при Байесовском анализе микросателлитных маркеров, а по пластидному локусу *trnL-trnF* характеризовалась одним из широко распространенных в Восточной Европе и на Балканах внутренним гаплотипом.

Благодарности

Авторы благодарны кураторам гербариев МНА и MW за возможность изучения и деструктивного отбора образцов для исследования ДНК. Работа выполнена в рамках государственного задания ГБС РАН № 19-119012390082-6 и при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 19-04-01308 и № 19-04-00883). Благодарим Министерство науки и высшего образования за поддержку ЦКП «Гербарий ГБС РАН», грант № 075-15-2021-678.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Barykina R. P., Kramina T. E.** 2006. A comparative morphological and anatomical study of the model legume *Lotus japonicus* and related species. *Wulfenia* 13: 33–56.
- Clement M., Posada D., Crandall K. A.** 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molec. Ecol.* 9: 1657–1659. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
- Doyle J. J., Doyle J. L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemistry Bulletin, Botanical Society of America* 19: 11–15.
- Earl D. A., von Holdt B. M.** 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molec. Ecol.* 14(8): 2611–2620.
- Gomolko A. A.** 2019. Morphological variability of species of the *Lotus corniculatus* L. s. l. complex (Fabaceae) in Belarus. In: *Struktura i dinamika bioraznoobraziya: Sbornik tezisov konferentsii [Structure and dynamics of biodiversity: Conference abstracts]*. Minsk: BGU. Pp. 115–117. [In Russian] (**Гомолко А. А.** Морфологическая изменчивость видов комплекса *Lotus corniculatus* L. s. l. (Fabaceae) на территории Беларуси // Структура и динамика биоразнообразия: Сб. тез. конф. Минск: БГУ, 2019. С. 115–117).
- Grant W. F.** 1995. A chromosome atlas and interspecific-intergeneric index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (Fabaceae). *Canad. J. Bot.* 73: 1787–1809.
- 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.
- Hardy O. J., Vekemans X.** 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2: 618–620. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2002.00305.x

- Iljina V. N.** 2008. Fabaceous flora of southern districts of Samarskaya Province. *Phytodiversity of Eastern Europe* 5: 131–137. [In Russian] (**Ильина В. Н.** Флора бобовых южных районов Самарской области // Фиторазнообразие Восточной Европы, 2008. № 5. С. 131–137).
- Kai S., Tanaka H., Hashiguchi M., Iwata H., Akashi R.** 2010. Analysis of genetic diversity and morphological traits of Japanese *Lotus japonicus* for establishment of a core collection. *Breeding Science* 60: 436–446.
- 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. DOI: 10.1093/nar/gkf436
- Katoh K., Standley D. M.** 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molec. Biol. Evol.* 30: 772–780. DOI: 10.1093/molbev/mst010
- Khlestkina E. K., Chukhina I. G.** 2020. Plant genetic resources: a strategy for preservation and use. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk [Herald of the Russian Academy of Sciences]* 90(6): 522–527. [In Russian] (**Хлесткина Е. К., Чухина И. Г.** Генетические ресурсы растений: стратегия сохранения и использования // Вестник Российской академии наук, 2020. Т. 90, № 6. С. 522–527). DOI: 10.31857/S0869587320060043
- Klokov M.** 1953. Notula de *Lotis nonnulis criticis*. *Bot. Mater. Gerb. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk S.S.S.R.* 15: 145–149. [In Russian] (**Клоков М. В.** Заметка о некоторых критических видах лядвенца // Бот. мат. (Ленинград), 1953. Т. 15. С. 145–149).
- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I.** 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15(5): 1179–1191. DOI: 10.1111/1755-0998.12387
- Kramina T. E.** 1999. A contribution to the taxonomic revision of the *Lotus corniculatus* complex (Leguminosae, Loteae) in the European part of the former USSR. *Syst. & Geogr. Pl.* 68: 265–279.
- Kramina T. E., Meschersky I. G., Degtjareva G. V., Samigullin T. H., Belokon Y. S., Schanzer I. A.** 2018. Genetic variation in the *Lotus corniculatus* complex (Fabaceae) in northern Eurasia as inferred from nuclear microsatellites and plastid *trnL-trnF* sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 188: 87–116. DOI: 10.1093/BOTLINNEAN/BOY042
- Kramina T. E., Tikhomorov V. N.** 1991. Within populational variability of some morphological characters of *Lotus corniculatus* L. s. l. (Leguminosae) in the European part of the USSR. *Bull. Moscow Soc. Natur. Biol. Ser.* 96, 6: 117–126. [In Russian] (**Крамина Т. Е., Тихомиров В. Н.** Внутрипопуляционная изменчивость отдельных морфологических признаков *Lotus corniculatus* L. s. l. (Leguminosae) на территории европейской части СССР // Бюл. МОИП. Отд. Биол., 1991. Т. 96, Вып. 6. С. 117–126).
- Krupkina L. I.** 2020. Field explorations in the Novgorod Province together with Tamara Nikolaevna Onipko (Smekalova). *Vavilovia* 3, 1: 60–66. [In Russian] (**Крупкина Л. И.** Полевые исследования в Новгородской области с Тамарой Николаевной Онипко (Смекаловой) // Vavilovia, 2020. № 3, 1. С. 60–66). DOI: 10.30901/2658-3860-2020-1-60-66
- Larsen K., Zertová A.** 1963. On the variation pattern of *Lotus corniculatus* in Eastern Europe. *Bot. Tidsskr.* 59(3): 177–194.
- Minyaev N. A., Ulle Z. G.** 1987. *Lotus* L. In: *Flora Yevropeyskoy chasti SSSR [Flora Partis Europaeae URSS]*. Vol. 6. Leningrad: Nauka. Pp. 103–115. [In Russian] (**Миняев Н. А., Улле З. Г.** Лядвенец – *Lotus* L. // Флора Европейской части СССР. Т. 6. Л.: Наука, 1987. С. 103–115).
- Plaksina T. N.** 1999. Samarskaya Luka as a nature phenomenon of the Middle Povolzhje. *Vestnik Samarskogo gosudarstvennogo universiteta [Herald of Samara State University]* 2, 12: 158–171. [In Russian] (**Плаксина Т. И.** Самарская лука – феномен природы Среднего Поволжья // Вестник СамГУ, 1999. Т. 2, № 12. С. 158–171).
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Saksonov S. V., Vasjukov V. M., Senator S. A., Iljina V. N., Korchikov E. S.** 2017. Appendix. The list of plants and lichen fungi excluded from the Red Data Book of Samara Province. In: *Krasnaya kniga Samarskoy oblasti [Red Data Book of Samara Region]*. Vol 1. Samara: Izdatelstvo Samarskoy gosudarstvennoy oblastnoy akademii (Nayanovoy). Pp. 366–371. [In Russian] (**Саксонов С. В., Васюков В. М., Сенатор С. А., Ильина В. Н., Корчиков Е. С.** Приложение. Список объектов растительного мира и лишайникообразующих грибов, исключенных из Красной книги Самарской области // Красная книга Самарской области. Т. 1. Самара: Изд-во Самарской государственной областной академии (Наяновой), 2017. С. 366–371).
- Vasjukov V. M., Saksonov S. V., Senator S. A.** 2015. Endemic plants of the Volga River basin. *Phytodiversity of Eastern Europe* 9, 3: 27–43. [In Russian] (**Васюков В. М., Саксонов С. В., Сенатор С. А.** Эндемичные растения бассейна Волги // Фиторазнообразие Восточной Европы, 2015. Т. 9, № 3. С. 27–43).