

УДК 575.17:582.736

О.С. Дымшакова, Д.А. Кривенко, Е.В. Жмудь

O.S. Dymshakova, D.A. Krivenko, E.V. Zhmud

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ПОЛУЛУННОПЛОДНЫХ АСТРАГАЛОВ (FABACEAE> ASTRAGALUS> CENANTRUM> SEMILUNARIA) МЕТОДОМ AFLP

## ANALYSIS OF GENETIC RELATIONSHIP AMONG SEMILUNAR FRUIT ASTRAGALUS (FABACEAE> ASTRAGALUS> CENANTRUM> SEMILUNARIA) BY AFLP

Изучены образцы двух видов полулунноплодных астрагалов секции *Cenantrum* подсекции *Semilunari* из Южной Сибири с помощью молекулярно-генетического анализа (AFLP). Внутри вида *A. mongholicus* (= *A. propinquus*, = *A. membranaceus*) обнаружена тенденция к разделению популяций по местонахождению к западу и к востоку от Байкала. Между видами *A. mongholicus* и *A. sericeocanus* генетической дифференциации не обнаружено.

Род *Astragalus* – самый крупный в семействе *Fabaceae* и является крупнейшим родом цветковых растений, насчитывает около 2900 видов, из которых в Старом Свете примерно 2400 видов и в Новом Свете около 500 видов (Zarre, Azani, 2013). В системе рода *Astragalus* выделяют от 9 (Bunge, 1869) до 2 (Podlech, 1988) подродов и примерно 200 секций (Zarre, Azani, 2013). Представители рода характеризуются значительным морфологическим и экологическим полиморфизмом, вследствие чего возникают трудности при определении таксономических границ для секций, подсекций и видов. Последние молекулярно-генетические исследования показали, что для рода характерна гомоплазия и выявлена высокая скорость эволюционного развития (Lavin et al., 2005; Zarre, Azani, 2013).

В настоящее исследование включены два вида полулунноплодных астрагалов: *A. mongholicus* Bunge и *A. sericeocanus* Gontsch. в понимании таксономических границ Д. Подлеха и Ш. Зарре (Podlech, Zarre, 2013).

*A. mongholicus* – лесостепной полиморфный вид, основная часть его ареала приурочена к степным межгорным котловинам Южной Сибири и прилегающих территорий Казахстана, Монголии и отчасти Китая, отмечен также на Дальнем Востоке и в Якутии (Podlech, Zarre, 2013). *A. sericeocanus* – псаммофит, эндем северо-восточной части побережья оз. Байкал (Малышев, Пешкова, 1884).

Цель исследования – оценить генетическое родство между популяциями *A. mongholicus* из разных точек ареала, а также выявить их филогенетические связи с эндемичным видом *A. sericeocanus* с помощью метода AFLP.

Материалом для настоящего исследования служили высушенные листья или проростки, по одному от каждого растения, полученные в лабораторных условиях из семян, собранных в природных местообитаниях (табл. 1).

Выделение ДНК для AFLP-анализа проведено с помощью СТАВ-метода (Devey et al., 1996). Анализ выполнен по протоколу, предложенному П. Вос с соавторами (Vos et al., 1995) с использованием трех праймерных комбинаций: [FAM] EcoRI-ACT/Mse-CGC, [JOE] EcoRI-ACG/Mse-CCT, [NED] EcoRI-AGC/Mse-CCGC. Всего исследовано 76 особей (табл. 2). Для анализа AFLP-данных были выбраны фрагменты длиной от 150 п.о. до 500 п.о., равномерно распределенные по профилю, – для исключения гомоплазии (Bonin et al., 2007). Анализ AFLP-фрагментов проводили с использованием секвенатора 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Данные обработаны с помощью программ GeneMapper Software Version 4.0 и GenAlix 6.501 (Peakall, Smouse, 2012).

На основании стабильности проявления AFLP-фрагмента и его дискретности было выбрано 82 изменчивых из 346 полученных фрагментов. Общее число бэндов на популяцию варьировало от 19 до 36, число уникальных бэндов – от 0 до 3, процент полиморфных фрагментов – от 8.54 % до 35.37 % (табл. 2).

На основе бинарной матрицы присутствия / отсутствия AFLP-фрагментов были вычислены генетические расстояния для выявления степени различия между исследуемыми популяциями. Для визуализации результата использовали анализ главных координат (PCoA, рис.). На рисунке видно, что в целом популяции *A. mongholicus* слабо дифференцированы друг от друга. Однако наблюдается тенденция к их разделению по первой оси, что совпадает с их местонахождением в Южной Сибири. Так, выявлена тенденция к обособле-

Таблица 1

Места сбора исследуемых полулунноплодных астрагалов на территории Южной Сибири

Популяция	Местонахождение	Ранее определение	ID ваучера IRK
<i>A. mongholicus</i>			
Джазатор	049°41'23" с. ш., 087°20'41" в. д., Республика Алтай, Кош-Агачский р-н	<i>A. propinquus</i> *	39812
Кокоря	049°54'58" с. ш., 088°59'39" в. д., Республика Алтай, Кош-Агачский р-н	<i>A. propinquus</i> *	39813
Чуйская Степь	049°55'53" с. ш., 089°08'08" в. д., Республика Алтай, Кош-Агачский р-н	<i>A. mongholicus</i> s. str.**	32832
Ялга	053°06'38" с. ш., 107°14'27" в. д., Иркутская область, Ольхонский р-н	<i>A. membranaceus</i> *	28970
Малая Кудара	050°11'06" с. ш., 107°42'26" в. д., Республика Бурятия, Кяхтинский р-н	<i>A. propinquus</i> *	39814
Горячинск	053°00'36" с. ш., 108°18'16" в. д., Республика Бурятия, Прибайкальский р-н	<i>A. propinquus</i> *	32252
Северобайкальск	055°34'54" с. ш., 109°13'12" в. д., Республика Бурятия, Северобайкальский р-н	<i>A. propinquus</i> *	23043
Ара-Иля	050°55'51" с. ш., 113°12'32" в. д., Забайкальский край, Дульдургинский р-н	<i>A. membranaceus</i> *	16605
Калиновка	051°51'41" с. ш., 116°41'49" в. д., Забайкальский край, Нерчинский р-н	<i>A. propinquus</i> * промежуточная форма к <i>A. membranaceus</i>	23909
<i>A. sericeocanus</i>			
Турка	052°54'29" с. ш., 108°09'07" в. д., Республика Бурятия, Прибайкальский р-н	–	23490
Ярки	055°45'48" с. ш., 109°42'04" в. д., Республика Бурятия, Прибайкальский р-н	–	39815

Примечание: \* – по С.Н. Выдриной (1994), \*\* – по А.И. Пяку (2012).

нию «Предбайкальского» и «Забайкальского» кластеров. Но в кластере «Предбайкалье» обнаруживается популяции «Горячинск» и «Малая Кудара», расположенные Забайкалье, а в кластере «Забайкалье» выявлена популяция «Ялга» с острова Ольхон на Байкале. При этом популяции *A. sericeocanus* обособляются друг от друга, но не дифференцируются от *A. mongholicus*, тогда как по морфологическим признакам виды хорошо отличаются.

Таблица 2

Частота AFLP-бэндов исследуемых полулунноплодных астрагалов

Популяция	N	Процент полиморфных фрагментов	Число бэндов	Число уникальных бэндов
<i>A. mongholicus</i>				
Джазатор	6	23,17	23	0
Кокоря	7	17,07	23	0
Чуйская Степь	8	17,07	26	1
Ялга	6	30,49	35	3
Малая Кудара	3	28,05	28	2
Горячинск	8	8,54	19	1
Северобайкальск	7	17,07	23	1
Ара-Иля	8	30,49	36	3
Калиновка	8	35,37	36	2
<i>A. sericeocanus</i>				
Турка	7	30,49	35	0
Ярки	8	35,37	29	0

Примечание: N – число особей в выборке.

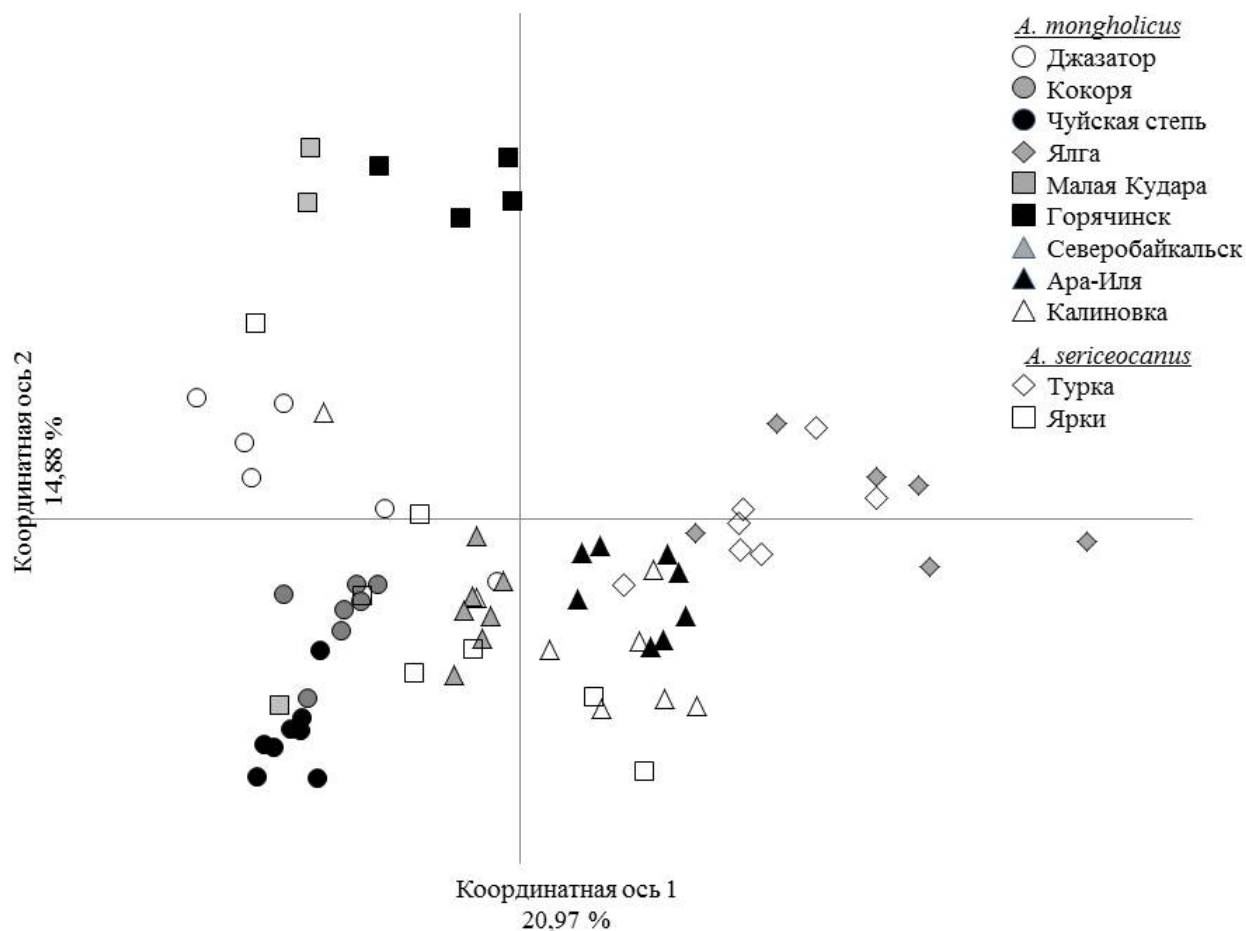


Рисунок. Популяции исследуемых полулуноплодных астрагалов в плоскости главных координат (РСоА-анализ).

В целом данные анализа AFLP-фрагментов не противоречат мнению Д. Подлеха и Ш. Зарре изложенному в последней монографической обработке астрагалов Старого Света (Podleh, Zarge, 2013). В ней к *A. mongholicus* сведены в синонимы *A. tetrapaneus* Bunge и *A. propinquus* Schischk., до недавнего времени рассматриваемыми исследователями в качестве самостоятельных видов (Выдрина, 1994; Пяк, 2012; Choi et al., 2013; Zheng et al., 2014; и др.). По полученным данным *A. mongholicus* и *A. sericeocanus* не дифференцируются друг от друга. Хотя по ранее проведенному изучению аллозимной изменчивости, их следует считать близкородственными видами (Дымшакова, Кривенко, 2014).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ №14-04-31023-мол\_a; №14-47-04125-р\_сибирь\_a; №14-44-04105-р\_сибирь\_a; 15-04-05372-а

#### ЛИТЕРАТУРА

- Выдрина С.Н.** *Astragalus* L. – Астрагал // Флора Сибири. Fabaceae (Leguminosae). – Новосибирск: Наука, 1994. – Т. 9. – С. 20–74.
- Дымшакова О.С., Кривенко Д.А.** Генетическая структура и дифференциация популяций видов секции *Cenantium* рода *Astragalus* (Fabaceae) // Экология: популяция, вид, среда: Мат. конф. молодых ученых. – Екатеринбург: Готтицкий, 2014. – С. 49–58.
- Мальшев Л.И., Пешикова Г.А.** Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). – Новосибирск: Сибирская издательская фирма ВО Наука, 1984. – 265 с.
- Пяк А.И.** Сем. Бобовые – Fabaceae (Leguminisae) // Определитель растений Республики Алтай. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. – С. 267–297.
- Bunge A.A.** Generis *Astragali* species gerontogae. Pars 2. Specierum enumeratio // Mem. Acad. Sci. Petersb. (Sci. Phys. Math.). – 1869. – Ser. 7. – Т. 15, No. 1. – 242 p.
- Bonin A., Enrich D., Manel S.** Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists // Molecular Ecology, 2007. – Vol. 16. – P. 3737–3758.
- Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.** A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet., 1996. – Vol. 92. – P. 673–679.

**Podlech D.** Beitrage zur Kenntnis der Gattung *Astragalus* L. (*Leguminosae*) III. Einige neue Arten aus dem Iran, aus Afganistan und Turkestan // Mitt. Bot. Staatsamml., 1988. – Vol. 27. – P. 51–64.

**Lavin M., Herendeen P.S., Wojciechowski M.F.** Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary // Syst. Biol., 2005. – Vol. 54, No. 4. – P. 575–594.

**Peakall R., Smouse P.E.** GenAlEx6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics, 2012. – Vol. 28. – P. 2537–2539.

**Podlech D., Zarre Sh.** A taxonomic revision of the genus *Astragalus* L. (*Leguminosae*) in the Old World. – Vienna: Natural History Museum, 2013. – Vol. 1. – P. 1–822.

**Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acid Research. 1995. – Vol. 23, No. 21. – P. 4407–4414.

**Yip P.Y., Kwan H. Sh.** Molecular identification of *Astragalus membranaceus* at the species and locality levels // J. Ethnopharmacology, 2006. – Vol. 106. – P. 222–229.

**Zarre S., Azani N.** Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus* (*Fabaceae*): a review // Progress in biological sciences, 2013. – Vol. 3, No. 1. – P. 1–5.

**Zheng S., Liu D., Ren W. et al.** Integrated analysis for identifying *Radix Astragali* and its adulterants based on DNA barcoding // Evidence-based complementary and alternative medicine, 2014. Article ID 843923. – 11 p.

#### SUMMARY

The samples of two species of semilunar fruit section *Cenantrum* of *Astragalus* genus from South Siberia on the base of molecular genetic analysis (AFLP) werestudied. Within the species *A. mongholicus* (= *A. propinquus*, = *A. membranaceus*) we detected a trend towards separation of populations at the location to the west and to the east of Baikal lake. Between species *A. mongholicus* and *A. sericeocanus* no genetic differentiation were found.