

Генетическое разнообразие некоторых таксонов *Astragalus* секции *Cenantrum* Bunge

Genetic diversity of some *Astragalus* taxa of the section *Cenantrum* Bunge

Кулакова Н. В., Казановский С. Г.

Kulakova N. V., Kazanovsky S. G.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия. E-mails: kulakova@sifibr.irk.ru; skazanovsky@mail.ru
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

Реферат. Вопросы генетической variability, филогенетических отношений и таксономического статуса представителей секции *Cenantrum* Bunge остаются актуальными, несмотря на большое число работ, посвященных отдельным видам. *Astragalus mongholicus* Bunge и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray характеризуются широким ареалом, пластичными морфологическими признаками и наличием вариантов и подвидов, идентификация которых затруднена. Согласно современным представлениям о систематике рода *Astragalus* (Podlech и Zarre, 2013), с *Astragalus mongholicus* Bunge синонимизированы: *Astragalus membranaceus* Bunge, *Astragalus borealimongolicus* Y. Z. Zhao, *Astragalus propinquus* Schischk., *Astragalus mongholicus* var. *dahuricus* (DC.) Podlech и др. Однако, данная систематика не всегда согласуется с результатами молекулярных исследований. С целью молекулярной идентификации, определения генетического разнообразия и эволюционного родства *A. mongholicus*, *A. membranaceus*, *A. propinquus*, *A. frigidus* и *Astragalus saralensis* Gontsch., в работе проведен анализ молекулярного маркера ITS1-ITS2 для 18 образцов из гербария СИФИБР СО РАН. Для сравнения использованы нуклеотидные последовательности ITS из базы данных GenBank. В результате анализа последовательностей и построения сети гаплотипов показано, что *A. mongholicus* (включая *A. membranaceus*) и *A. propinquus* (включая *A. borealimongolicus*) являются генетически обособленными таксонами. В то же время *A. frigidus* и *A. saralensis* – близкородственные таксоны, не различающиеся по исследованному маркеру, что требует дальнейшего анализа систематического положения *A. saralensis*. При использовании маркера ITS не обнаружено генетических отличий между *Astragalus frigidus* subsp. *secundus* (DC.) Vorosch. и *Astragalus frigidus* subsp. *parviflorus* Hultén. Подтверждено, что *A. mongholicus* var. *dahuricus* не имеет близкородственных связей с *A. mongholicus* и другими видами секции *Cenantrum*. Показана генетическая идентичность *A. propinquus* и *A. borealimongolicus* по маркеру ITS. Установлены значения внутри- и межвидовой генетической variability для исследованных таксонов.

Ключевые слова. Гаплотипы, секция *Cenantrum*, *Astragalus frigidus*, *Astragalus mongholicus*, *Astragalus propinquus*, *Astragalus saralensis*, ITS.

Summary. Issues of genetic variability, phylogenetic relationships, and taxonomic status of representatives of the section *Cenantrum* Bunge remain relevant, despite the significant number of studies of some species. *Astragalus mongholicus* Bunge and *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray are characterized by a wide range, flexible morphological characters and the presence of variants and subspecies whose identification is difficult. According to the taxonomic revision of the genus *Astragalus* (Podlech, Zarre, 2013), the following are synonymized with *Astragalus mongholicus* Bunge: *Astragalus membranaceus* Bunge, *Astragalus borealimongolicus* Y. Z. Zhao, *Astragalus propinquus* Schischk., *Astragalus mongholicus* var. *dahuricus* (DC.) Podlech and others. However, this taxonomy does not always agree with the results of molecular data. The current study is aimed at molecular identification, determination of genetic diversity, and evolutionary relationship of *A. mongholicus*, *A. membranaceus*, *A. propinquus*, *A. frigidus*, and *Astragalus saralensis* Gontsch., for which we analyzed the molecular marker ITS1-ITS2 in 18 samples from the herbarium of the SIFIBR SB RAS. For comparison, ITS nucleotide sequences from the GenBank database were used. Sequence analysis and haplotype network construction showed that *A. mongholicus* (including *A. membranaceus*), *A. propinquus* (including *A. borealimongolicus*) are genetically distinct taxa. At the same time, *A. frigidus* and *A. saralensis* are congeneric, which requires further analysis of systematic position of *A. saralensis*. It was shown that when using the ITS marker, no genetic differences were found between *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray subsp. *secundus* (DC.) Vorosch. and *Astragalus frigidus* subsp. *parviflorus* Hultén. It is confirmed that *A. mongholicus* var. *dahuricus* is not closely related to *A. mongholicus* and other species of the section *Cenantrum*. Based

on ITS, *A. propinquus* and *A. borealimongolicus* are genetically identical. The values of intra- and interspecific genetic variability for the studied taxa are provided.

Key words. *Astragalus frigidus*, *Astragalus mongholicus*, *Astragalus propinquus*, *Astragalus saralensis*, ITS, haplotypes, section *Cenantrum*.

Виды *Astragalus mongholicus* Bunge и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray секции *Cenantrum* Bunge (филогенетическая клада Phasa), характеризуются широким ареалом и значительной пластичностью морфологических признаков, что часто затрудняет их идентификацию. *A. mongholicus* – наиболее изученный региональный эндемик азиатской части России, Монголии, Казахстана, западных и северных регионов Китая. Широкое использование двух вариантов *Astragalus membranaceus* Bunge и *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao в традиционной китайской и монгольской медицине, способствует поиску способов их дифференциальной идентификации и интенсивному изучению метаболически активных веществ (Guo et al., 2010). Оба варианта используются в составе лекарственного сырья “Radix Astragali”, который входит в список из 50 наиболее широко применяемых в Китае растений, и перечислен в Китайской и др. фармакопеях (Li et al., 2017). Результаты исследований молекулярных маркеров ядерной ДНК (ITS) показали высокую степень сходства этих двух вариантов (Dong et al., 2003; Guo et al., 2010). В то же время, результаты анализа геномов хлоропластов выявили различия *A. membranaceus* var. *mongholicus* и *A. membranaceus*, а также идентичность последнего с *Astragalus nakaianus* Y. N. Lee (Wang et al., 2016; Su et al. 2021). В работе Liu с соавторами (2011) были проанализированы 8 активных компонентов *A. membranaceus* var. *mongholicus* и *A. membranaceus*, выращенных в одинаковых условиях, и выявлены существенные различия в концентрации специфичных изофлавоноидов и сапонинов, что авторы связывают с генетическими различиями исследованных вариантов. Кроме того, анализ геномов хлоропластов помог установить, что *Astragalus mongholicus* var. *dahuricus* (Fisch. ex DC.) Podlech не является близкородственным для видов секции *Cenantrum* (Tian et al., 2021).

На сегодняшний день, в результате ревизии систематики рода *Astragalus* (Podlech, Zarre, 2013), таксоны *A. membranaceus* var. *mongholicus*, *A. membranaceus*, *Astragalus propinquus* Schischk., *Astragalus borealimongolicus* Y. Z. Zhao, *A. mongholicus* var. *dahuricus* приведены в качестве синонимов *A. mongholicus* Bunge. Однако данные, полученные с привлечением различных подходов, указывают на необходимость уточнения их систематического положения. В Южной Сибири многие виды астрагалов остаются недостаточно исследованными.

Цель работы – выявить генетические особенности *A. mongholicus*, *A. membranaceus*, *A. propinquus*, *A. frigidus* и *Astragalus saralensis* Gontsch. с помощью анализа последовательностей ITS и определения генетической гетерогенности.

Для анализа использовали 18 образцов из гербария Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (IRK) (табл. 1).

Таблица 1

Анализируемые образцы

ID в гербарии СИФИБР СО РАН	Таксон	Местонахождение
22200	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	Забайкальский край, р. Шилка
45532 IRK00023333	<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge	Приморский край, Надеждинский район
11981	<i>Astragalus propinquus</i> Schischk.	Иркутская область, Нижнеудинский район
21612	<i>Astragalus propinquus</i> Schischk.	Иркутская область, Ольхонский район
9724	<i>Astragalus propinquus</i> Schischk.	Бурятия, Окинский район
19733	<i>Astragalus propinquus</i> Schischk.	Бурятия, Баргузинский район, п-ов Святой Нос
26262	<i>Astragalus propinquus</i> Schischk.	Бурятия, Кабанский район
13582	<i>Astragalus propinquus</i> Schischk.	Бурятия, Закаменский район
11249	<i>Astragalus saralensis</i> Gontsch.	Бурятия, Баргузинский хребет
19905	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Забайкальский край
65467	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Иркутская область, Шелеховский район

Продолжение табл. 1

ID в гербарии СИФИБР СО РАН	Таксон	Местонахождение
48608	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Монголия, юго-западное побережье оз. Хубсугул
50365	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Бурятия, Тункинский район
9729	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Бурятия, Окинский район, оз. Ильчир
9728	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Бурятия, Окинский район
9712	<i>Astragalus frigidus</i> (L.) A. Gray	Бурятия, Окинский район
22202	<i>Astragalus frigidus</i> subsp. <i>secundus</i> (DC.) Vorosch.	Бурятия, Тункинский район
19817	<i>Astragalus frigidus</i> subsp. <i>parviflorus</i> (Turcz.) Hultén	Чукотский п-ов

Экстракцию ДНК, амплификацию фрагментов ITS1-ITS2 и секвенирование проводили по ранее опубликованной методике и протоколам (Кулакова и др., 2023). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Для сравнения использовали последовательности *A. mongholicus* и других видов из базы данных GenBank (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Генетические дистанции K2P (Kimura, 1980) рассчитывали в программе Mega 11 (Tamura et al., 2021). Построение сети гаплотипов проводили в программе PopArt 1.7 (Leigh et al., 2015) на основе алгоритма TSC (Clement et al., 2002).

Полученные из гербарных образцов нуклеотидные последовательности сравнивали со 139 последовательностью из базы Genbank, преимущественно *A. mongholicus* и *A. membranaceus* (123 записи в GenBank), а также других видов (рис. 1).

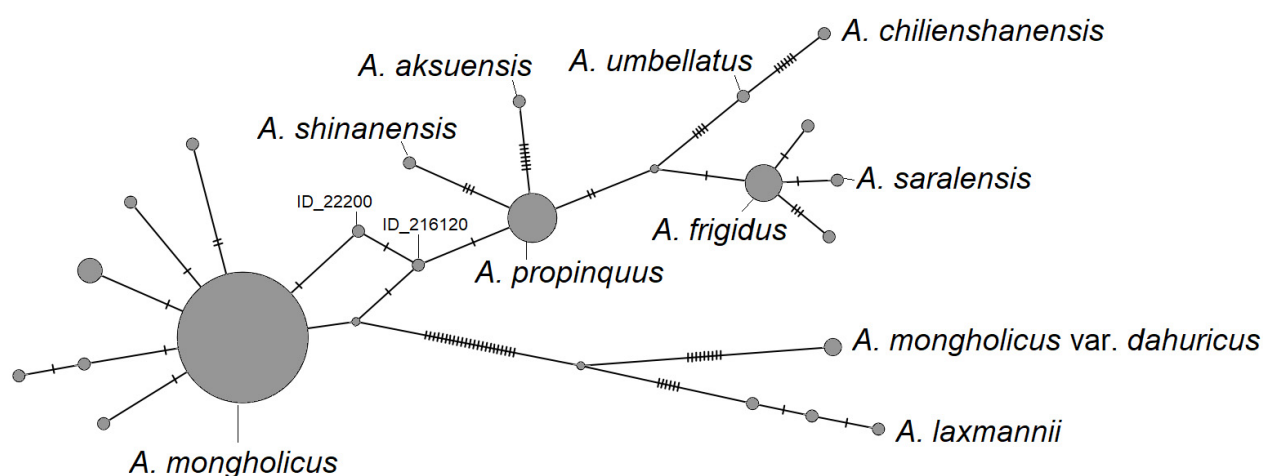


Рис. 1. Сеть гаплотипов, исследованных видов *Astragalus*, полученная на основе анализа ITS1-ITS2. Размер круга соответствует количеству последовательностей; *A. aksuensis* (AF359753), *A. chilienshanensis* (MW432232), *A. shinanensis* (LC760273), *A. umbellatus* (AF121683) представлены единичными последовательностями. Штрихами обозначено количество мутаций. Номера (ID) отмечены исследованные в работе образцы, не вошедшие в обозначенные гаплотипы.

Как показали результаты анализа, варианты *A. mongholicus* и *A. membranaceus* характеризуются высокой степенью схожести, что подтверждается другими исследованиями (Dong et al., 2003; Liu et al., 2011). Таксоны *A. mongholicus* (включая *A. membranaceus*), *A. frigidus* (включая исследованные подвиды) и *A. propinquus* имеют четкие генетические отличия видового уровня. Нуклеотидная вариабельность ITS1-ITS2 составила 0–1 % внутри видов и 1,4–2 % между вышеперечисленными видами. При сравнении с последовательностями других видов этой же секции (*A. umbellatus*, *A. aksuensis*, *A. chilienshanensis*, *A. shinanensis*), вариабельность составила от 1,4 до 4,5 %. Средние межвидовые генетические дистанции (табл. 2) в 3,5 и более раз превышали внутривидовые дистанции.

Таблица 2

Генетические дистанции между исследуемыми видами

	<i>A. mongholicus</i> (1)	<i>A. propinquus</i> (2)	<i>A. frigidus</i> (3)	<i>A. mongholicus</i> var. <i>dahuricus</i> (4)	<i>A. laxmannii</i> (5)
1					
2	0.0069				
3	0.0123	0.0068			
4	0.0688	0.0650	0.0722		
5	0.0582	0.0597	0.0656	0.0325	

Два исследованных образца (ID 22200, 21612) занимали переходное положение между *A. mongholicus* и *A. propinquus*, что указывает на неполное эволюционное расхождение этих генетических вариантов и существование переходных форм. Последовательности исследованных нами образцов *A. propinquus* оказались схожими между собой и с *A. borealimongolicus* (HM142291- HM142291), что указывает на вероятную синонимичность этих таксонов. Как самостоятельный вид, *A. borealimongolicus* описан в работе Zhao (2006). Генетические отличия *A. borealimongolicus* от других видов были ранее отмечены в работе Guo с соавторами (2010) и показано, что данные последовательности кластеризовались в отдельную филогенетическую кладу. Кроме того, в ITS1-ITS2 не найдено отличий между исследованными подвидами *A. frigidus* (*secundus* и *parviflorus*). Последовательность *A. saralensis*, отличалась единственной нуклеотидной заменой (возможно случайной мутацией) от всех других последовательностей *A. frigidus*, взятых в анализ. Так как проанализирован только один образец *A. saralensis*, получены лишь предварительные данные о близком родстве либо идентичности с *A. frigidus*, однако эти результаты нуждаются в дальнейших исследованиях с привлечением большего числа образцов.

С помощью анализа гаплотипов подтверждено, что *A. mongholicus* var. *dahuricus* не является близкородственным *A. mongholicus* и другим видам секции *Cenantrum*, что ранее было отмечено в ряде работ (Guo et al., 2010; Azani et al., 2017; Su et al., 2021; Tian et al., 2021) (рис. 1).

Анализ последовательностей позволил выявить три основных гаплотипа, *A. mongholicus*, *A. propinquus* и *A. frigidus*, в которые вошло большинство исследованных образцов (рис. 1). Наиболее представленный по числу вошедших в него последовательностей гаплотип объединяет последовательности *A. mongholicus* и *A. membranaceus*, не различающиеся по исследованному молекулярному маркеру. В гаплотип *A. propinquus* вошли 5 из 6 образцов из Бурятии и Иркутской области (ID 11981, 9724, 19733, 26262, 13582), а также все последовательности *A. borealimongolicus* (Китай) из базы GenBank. Полученные данные указывают на синонимичность *A. propinquus* Schischk. и *A. borealimongolicus* Y.Z.Zhao, а также генетические отличия *A. propinquus* от близких видов *A. mongholicus* и *A. frigidus*.

Благодарности. Работа выполнена по теме гос. задания «Изучение динамики биологического разнообразия наземных экосистем Байкальской Сибири в оригинальной информационно-аналитической среде» (0277-2022-0001), номер гос. регистрации 122041100047-6.

ЛИТЕРАТУРА

- Кулакова Н. В., Верхозина А. В., Кондратов И. Г. Генетическая инвентаризация редких и эндемичных видов сосудистых растений Байкальского региона // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2023. – Т. 22, № 2. – С. 150–153. DOI: 10.14258/pbssm.2023116
- Azani N., Bruneau A., Wojciechowski M. F., Zarre S. Molecular phylogenetics of annual *Astragalus* (Fabaceae) and its systematic implications // Bot. J. Linn., 2017. – Vol. 184(3). – P. 347–365. DOI:10.1093/botlinnean/box032
- Clement M., Snell Q., Walker P., Posada D., Crandall K. TCS: Estimating gene genealogies // Processing Symposium. International Proceedings, 2002. – Vol. 2. – P. 184. DOI:10.1109/ipdps.2002.1016585
- Dong T. T., Ma X. Q., Clarke C., Song Z. H., Ji Z. N., Lo C. K., Tsim K. W. Phylogeny of *Astragalus* in China: molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA // J. Agric. Food Chem., 2003. – Vol. 51(23). – P. 6709–6714. DOI: 10.1021/jf034278x
- Guo H., Wang W., Yang N., Guo B., Zhang S., Yang R., Yuan Y., Yu J., Hu S., Sun Q., Yu J. DNA barcoding provides distinction between *Radix Astragali* and its adulterants // Sci. China Life Sci., 2010. – Vol. 53(8). – P. 992–999. DOI: 10.1007/s11427-010-4044-y
- Hall T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series, 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.

- Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol., 1980. – Vol. 16. – P. 111–120.
- Leigh J. W., Bryant D.** PopART: Full-feature software for haplotype network construction // Methods Ecol. Evol., 2015. – Vol. 6(9). – P. 1110–1116.
- Liu J., Chen H. B., Guo B. L., Zhao Z. Z., Liang Z. T., Yi T.** Study of the relationship between genetics and geography in determining the quality of Astragali Radix // Biol. Pharm. Bull., 2011. – Vol. 34(9). – P. 1404–1412. DOI: 10.1248/bpb.34.1404
- Podlech D., Zarre Sh.** A Taxonomic Revision of the Genus *Astragalus* L. (Leguminosae) in the Old World. – Vienna: Naturhistorisches Museum Wien, 2013. – Vol. 1. – 822 p.
- Su C., Duan L., Liu P., Liu J., Chang Z., Wen J.** Chloroplast phylogenomics and character evolution of eastern Asian *Astragalus* (Leguminosae): Tackling the phylogenetic structure of the largest genus of flowering plants in Asia // Mol. Phylogenet. Evol., 2021. – Vol. 156, 107025. DOI: 10.1016/j.ympev.2020.107025
- Tamura K., Stecher G., Kumar S.** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Mol. Biol. Evol., 2021. – Vol. 38(7). – P. 3022–3027. DOI:10.1093/molbev/msab120
- Tian C., Li X., Wu Z., Li Z., Hou X., Li F. Y.** Characterization and Comparative Analysis of Complete Chloroplast Genomes of Three Species From the Genus *Astragalus* (Leguminosae) // Front Genet., 2021. – Vol. 12, 705482. DOI: 10.3389/fgene.2021.705482
- Wang B., Chen H., Ma H., Zhang H., Lei W., Wu W., Shao J., Jiang M., Zhang H., Jia Z., Liu C.** Complete plastid genome of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *membranaceus* // Mitochondrial DNA B Resour., 2016. – Vol. 1(1) – P. 517–519. DOI: 10.1080/23802359.2016.1197057
- Zhao Y. Z.** Taxonomy and floristic geographical distribution of the Chinese medicinal Huangqi // Bull. Botan. Res., 2006. – Vol. 26. – P. 532–538.