УДК 575.174.015.3:582.893 DOI: 10.14258/pbssm.2026064

ISSR-вариабельность эндемика Восточной Азии *Saposhnikovia divaricata* в пределах естественного ареала

ISSR variability of East Asian endemic *Saposhnikovia divaricata* within its natural range

Скворцова Т. Э., Елисафенко Т. В.

Skvortsova T. E., Elisafenko T. V.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия. E-mails: tataskvo@gmail.com, tatvelisa@mail.ru
Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Реферат. Популяции *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. в Республике Бурятия стремительно деградируют из-за хищнических заготовок дикорастущего сырья. Столь высокая антропогенная нагрузка обусловлена тем, что данное растение является ценнейшим источником хромонов и кумаринов для восточной медицины. С целью разработки стратегии сохранения вида методом ISSR-ПЦР исследована генетическая структура четырех ключевых популяций. Всего было амплифицировано 105 локусов со средним уровнем полиморфизма 94,28 %. На основе анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) установлено, что основная доля изменчивости вида сосредоточена на внутрипопуляционном уровне (84 %), тогда как на межпопуляционную дифференциацию приходится 16 %. Данное соотношение указывает на выраженную генетическую дифференциацию, обусловленную пространственной фрагментацией степных экосистем и ограничением репродуктивного контакта. Кластеризация UPGMA (r = 0,7781) выявила разделение образцов на две основные ветви. Выборки Вознесеновка и Тарбагатай формируют строго изолированные кластеры, что указывает на длительную изоляцию их генофондов. Напротив, перекрывание индивидуальных ДНК-профилей в кластере Тапхар – Сосновка указывает на незавершенность процессов дифференциации. Установленная структура диктует дифференцированный подход к сохранению вида: полиморфная популяция Вознесеновка оптимальна для сбора семян, уникальный изолят Тарбагатай подлежит строгой охране, а генетически уязвимая популяция Сосновка требует моратория на заготовку сырья.

Ключевые слова. Генетическое разнообразие, молекулярные маркеры, популяционная структура, Республика Бурятия, ISSR-ПЦР, *Saposhnikovia divaricata*.

Summary. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. populations in the Republic of Buryatia are rapidly degrading due to the predatory harvesting of wild raw materials. This high anthropogenic pressure stems from the fact that this plant is a highly valuable source of chromones and coumarins for Oriental medicine. To develop a conservation strategy for the species, the genetic structure of four key populations was investigated using the ISSR-PCR method. A total of 105 loci were amplified, with an average polymorphism level of 94,28 %. Based on the analysis of molecular variance (AMOVA), it was established that the main share of the species' variation is concentrated at the intrapopulation level (84 %), whereas interpopulation differentiation accounts for 16 %. This ratio indicates pronounced genetic differentiation driven by the spatial fragmentation of steppe ecosystems and restricted reproductive contact. UPGMA clustering (r = 0,7781) revealed the separation of samples into two main branches. The Voznesenovka and Tarbagatay samples segregate into strictly isolated clusters, indicating a long-term isolation of their gene pools. Conversely, the overlapping of individual DNA profiles in the Tapkhar–Sosnovka cluster indicates incomplete differentiation processes. The established structure dictates a differentiated approach to conservation: the polymorphic Voznesenovka population is optimal for seed harvesting, the unique Tarbagatay isolate requires strict protection, and the genetically vulnerable Sosnovka population demands a complete moratorium on raw material harvesting

Key words. Genetic diversity, ISSR-PCR, molecular markers, population structure, Republic of Buryatia, *Saposhnikovia divaricata*.

Введение. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. – ценное многолетнее травянистое растение семейства Зонтичные (Apiaceae), широко применяемое в традиционной восточной медицине. Корни этого вида содержат богатый комплекс биологически активных соединений, включая кумарины, хро-

моны, полисахариды и эфирные масла, обладающие выраженными противовоспалительными, жаропонижающими и иммуномодулирующими свойствами (Kazakov et al., 2025). В последние десятилетия в связи с резким увеличением коммерческого спроса на лекарственное сырье на азиатских рынках природные популяции *S. divaricata* подвергаются экстремальной антропогенной нагрузке, выражающейся в массовом неконтролируемом сборе корневищ. В ряде регионов это привело к критическому сокращению численности вида и деградации его популяций. Для разработки научно обоснованных программ сохранения биоразнообразия, контроля заготовки дикоросов и успешной интродукции сапожниковии необходимо понимание ее пространственно-генетической структуры. Современная популяционная биология опирается на методы молекулярного анализа, среди которых особое место занимает ISSR-ПЦР (Zietkiewicz et al., 1994). Этот метод основан на амплификации участков генома, расположенных между микросателлитными повторами. ISSR-маркеры обладают высокой воспроизводимостью, мультилокусностью и не требуют предварительных данных о последовательности генома, что делает их удобным инструментом для работы с генетически малоизученными видами.

Цель настоящего исследования – оценка параметров внутрипопуляционного генетического разнообразия и характера межпопуляционной дифференциации сообществ *S. divaricata*, произрастающих в контрастных условиях Республики Бурятия.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы гербария четырех природных популяций *S. divaricata*, собранные в течение вегетационного периода 2023 г. в различных районах Республики Бурятия. Географическая привязка и объем выборок выглядели следующим образом: популяция №1 – Тарбагатайский район (51.53° с. ш. 107.38° в. д., n = 10); популяция №2 – с. Вознесеновка, Тарбагатайский район (51.73° с. ш. 107.45° в. д., n = 10); популяция №3 – улус Тапхар, Иволгинский район (51.73° с. ш. 107.33° в. д., n = 10); популяция №4 – с. Сосновка, Селенгинский район (50.84° с. ш. 105.96° в. д., n = 6).

Выделение тотальной геномной ДНК осуществляли из сухих листьев с помощью модифицированного CTAB-метода (Doyle, Doyle, 1987). Качество и концентрацию полученных препаратов ДНК контролировали спектрофотометрически с использованием прибора BioPhotometerPlus (Eppendorf, Германия).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли протокол по методике Вольф (Wolfe, 2005). Скрининг шел по четырем праймерам (HB12, HB14, 17899A и 17899B), которые показали высокую полиморфность на предварительном этапе (Скворцова и др., 2025). Реакционная смесь общим объемом 20 мкл содержала: 0,4 мкл 50 мМ$MgCl_2$, 1,6 мкл 10 μM раствора праймера, 0,4 мкл 40 мМdNTPs, 4 мкл 5х ПЦР-буфера, 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы (Biolabmix, Россия) и 10 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: начальная денатурация – 2 мин при 94 °C; затем 35 циклов: денатурация – 25 сек при 94 °C, отжиг праймеров – 45 сек при оптимальных для каждого олигонуклеотида температурах (от 41 °C до 48 °C), элонгация – 90 сек при 72 °C; стадия финальной достройки фрагментов – 7 мин при 72 °C. Разделение продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле в 1× TBE-буфере при градиенте напряжения 4 В/см. Визуализацию электрофореграмм выполняли на системе GelDocXR (Bio-Rad, США). Математическая обработка матриц проводилась в программах GenAlExv. 6.5и PASTv. 4.x.

Результаты и обсуждение. Применение четырех праймеров на суммарной выборке из 36 растений позволило стабильно амплифицировать 105 локусов (табл.1). Средний уровень полиморфизма по всей изученной панели составил 94,28 %, что указывает на высокое аллельное разнообразие вида в регионе. Праймер 17899A продемонстрировал наибольшую информационную емкость (31 фрагмент ДНК с уровнем полиморфизма 96,0 %). Наименьшие значения вариабельности зафиксированы для праймера HB14 (22 фрагмента, 82,4 % полиморфизма). Высокие характеристики амплификации позволяют рекомендовать использованный набор праймеров в качестве эффективной тест-системы для генетической паспортизации и фингерпринтинга *S. divaricata*.

Расчет основных популяционно-генетических показателей в программе GenAlEx выявил неравномерное распределение изменчивости по точкам сбора (табл. 2). Неожиданным результатом стало обнаружение экстремально высокого генетического потенциала в популяции Вознесеновка. Доля полиморфных локусов здесь достигла абсолютного максимума – 100 %, также эта популяция лидирует по числу аллелей (Na = 2,000), числу эффективных аллелей (Ne = 1,683), индексу Шеннона (I = 0,570) и ожидаемой гетерозиготности Нея (He = 0,388). Столь высокие значения свидетельствуют о сбалан-

Таблица 1. Полиморфизм ISSR-праймеров, использованных для анализа популяций

№ п/п	Название праймера	Нуклеотидный состав	Темп. отжига праймера, °C	Общее число амп. фрагментов	Полиморфизм праймера, %
1	HB12	$(CAC)_3GC$	41	29	98
2	HB14	$(CTC)_3GC$	42	22	82,4
3	17899A	$(CA)_6AG$	48	31	96
5	17899B	$(GA)_6GG$	42	23	95,5

Таблица 2. Основные популяционно-генетические показатели исследованных популяций *Saposhnikovia divaricata*

Популяция	P	Na	Ne	I	He	uHe
Тарбагатай	84,62 %	1,732 ± 0,092	1,541 ± 0,048	0,469 ± 0,032	0,316 ± 0,024	0,331 ± 0,025
Вознесеновка	100 %	2,000 ± 0,000	1,683 ± 0,037	0,570 ± 0,018	0,388 ± 0,016	0,412 ± 0,016
Тапхар	82,69 %	1,730 ± 0,087	1,489 ± 0,054	0,414 ± 0,037	0,277 ± 0,027	0,287 ± 0,029
Сосновка	84,62 %	1,774 ± 0,081	1,542 ± 0,047	0,469 ± 0,032	0,316 ± 0,024	0,345 ± 0,026

Примеч.: P – процент полиморфных локусов, Na – общее число аллелей, Ne – число эффективных аллелей, I – индекс Шеннона, He – ожидаемая гетерозиготность, uHe – несмещенная гетерозиготность.

сированности аллельного пула и отсутствии инбредной депрессии в данной локации. Популяции Тарбагатай и Сосновка продемонстрировали идентичный средний уровень полиморфизма – по 84,62 % при одинаковом значении индекса Шеннона (I = 0,469) и гетерозиготности (He = 0,316). В популяции Сосновка данные параметры удерживаются на высоком уровне вопреки меньшей выборке (n = 6), что подтверждается значением несмещенной гетерозиготности uHe = 0,345. Наименьший уровень полиморфизма отмечен в изолированной популяции Тапхар – P % = 82,69 %, He = 0,277, I = 0,414, что может свидетельствовать о локальном давлении факторов отбора. Исходя из проведенного анализа, популяцию Вознесеновка можно считать главным центром разнообразия вида *S. divaricata* в регионе, поскольку она обладает абсолютным 100 % полиморфизмом локусов и максимальной гетерозиготностью (He = 0,388), что делает ее приоритетным донором семян для интродукции.

Оценка пространственно-генетической структуры методом AMOVA (анализ молекулярной дисперсии) показала (рис. 1), что основная доля молекулярного разнообразия *S. divaricata* приходится на внутрипопуляционную компоненту и составляет 84 % (Est. Var. = 9,742), что может свидетельствовать о доминировании перекрестного опыления у вида и сохранении запаса эволюционной пластичности внутри отдельных луговых сообществ. На межпопуляционную дифференциацию приходится 16 % общей изменчивости (Est. Var. = 1,808). Данное значение указывает на умеренно высокий уровень пространственной дифференциации: популяции частично изолированы и успели накопить локальные аллельные отличия.

Топология дендрограммы сходства. Результаты статистического анализа подтверждаются построенной в программе PAST дендрограммой UPGMA (рис. 2). Базовый узел дерева со 100%-й бутстрэп-поддержкой делит всю выборку на две фундаментальные ветви. Верхняя ветвь представлена плотным кластером популяции Тарбагатай, внутрь которого внедрились лишь единичные особи Вознесеновки. Нижний надкластер объединяет популяции Тапхар и Сосновка. Их индивидуальные образцы хаотично переплетаются в общие субкластеры с надежной поддержкой от 66 % до 76 %. Образцы популяции Вознесеновка из-за обладания 100%-м внутренним полиморфизмом ведут себя диффузно, равномерно распределяясь по всему дереву.

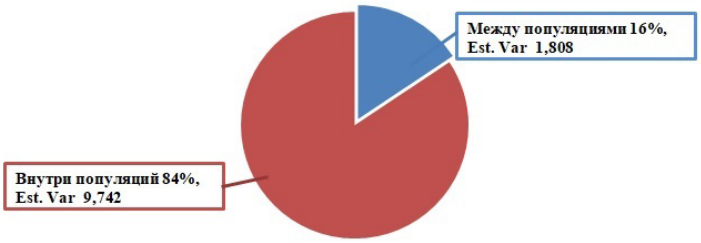


Рис. 1. Процентный вклад компонентов молекулярной дисперсии, рассчитанный методом AMOVA в программе GenAlEx. Условные обозначения: Est. Var. (Estimated Variance) – расчетное значение компоненты дисперсии.

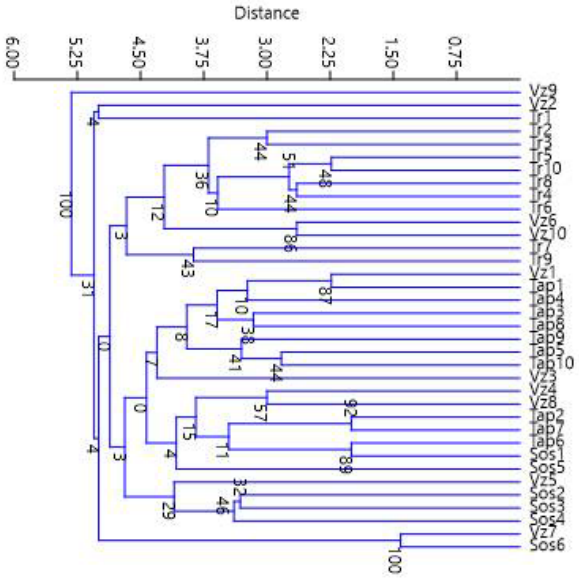


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства исследуемых образцов *Saposhnikovia divaricata*, построенная методом UPGMA на основе евклидовых расстояний (значения бутстрэп-поддержки при 1000 реплик; кофенический коэффициент корреляции, r = 0,7781). Условные обозначения: Tr – популяция Тарбагатай, Voz – популяция Вознесеновка, Tap – популяция Тапхар, Sos – популяция Сосновка.

На основании полученных молекулярно-генетических данных сформулированы ключевые рекомендации по сохранению и рациональному использованию генофонда *S. divaricata* в Республике Бурятия. Для интродукции сбор семенного материала рекомендуется проводить в популяции Вознесеновка, характеризующейся максимальным уровнем полиморфизма (100 %) и богатым набором генов. Первоочередной охране подлежит генетически изолированная популяция Тарбагатай, уничтожение которой приведет к утрате уникальных элементов генофонда вида. В то же время, заготовка дикорастущих корней наиболее опасна в популяции Сосновка: из-за низкого внутрипопуляционного разнообразия она обладает минимальным потенциалом к самовосстановлению. При искусственном воспроизводстве допускается совместный высев семян из близкородственных локаций Тапхар и Сосновка, тогда как интродукция чужеродного материала в популяцию Тарбагатай недопустима с целью предотвращения нарушения ее уникальной генетической структуры.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (126021617423-1).

ЛИТЕРАТУРА

Скворцова Т. Э., Елисафенко Т. В., Кубан И. Н., Якк В. Н., Дорогина О.В. ISSR-анализ полиморфизма природной и интродукционной популяций *Saposhnikovia divaricata* (Apiaceae) // Растительный мир Азиатской России, 2025. – № 3. – С. 238–247. https://doi.org/10.15372/RMAR20250304.

Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin, 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.

Kazakov M. V., Anenkhonov O. A., Zhigmittcyrenova B. M., Elisafenko T. V., Zheleznichenko T. V., Zhang F., Altaeva O. A., Tcybikov B. B., Dylenova E. P., Taraskin V. V., Tykheev Z. A. *Saposhnikovia divaricata* (Apiaceae) – important species of Oriental Traditional Medicine: current research status, cultivation experience and biotechnological potential (a review) // Botanica Pacifica, 2025. – Vol. 14, No. 1. – P. 71–86.

Wolfe A. D. ISSR techniques for evolutionary biology // Methods in Enzymology, 2005. – Vol. 395. – P. 134–144. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95009-X.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. – Vol. 20, No. 2. – P. 176–183. https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151.