

УДК 575.22:582.736

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ АЛТАЕ-САЯНСКОГО ЭНДЕМИКА *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) ПО ДАННЫМ МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ГЕНОМНОЙ ДНК

© 2013 г. Н. С. Звягина, О. В. Дорогина

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск 630090  
e-mail: zviagnat@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.02.2013 г.

Проведена оценка генетической variability и дифференциации редкого вида Алтае-Саянского эндемика копеечника чайного *Hedysarum theinum* Krasnob. Шесть использованных ISSR-праймеров позволили выявить 132 ПЦР-фрагмента, из них 126 – полиморфные (95.5%). Высокий уровень генетической variability вида, отмеченный на внутривидовом уровне ( $H_{pop}/H_{sp} = 70.5$ ), подтвержден данными анализа молекулярной изменчивости AMOVA (88.2%). Значительное генетическое сходство популяций ( $I = 0.875$ ) отражает узкий, эндемичный тип ареала *H. theinum*, способствующий процессам генетического дрейфа и ауткресинга. Учитывая значительный уровень генетической variability *H. theinum* на фоне невысокой популяционной дифференциации, в целях сохранения вида *ex situ* допустимо производить сбор материала из небольшого числа популяций. Высокий полиморфизм межмикросателлитных маркеров и устойчивая воспроизводимость результатов позволяют рекомендовать ISSR-анализ для паспортизации генотипов *H. theinum*, при оценке качества семенного материала и для идентификации сырья, предназначенного для изготовления лекарственных препаратов.

DOI: 10.7868/S0016675813100135

*Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae L.) – копеечник чайный, или “красный корень”, – является эндемиком Алтае-Саянской флористической провинции. Вид распространен в Центральном и Юго-Западном Алтае, Тарбагатае, Джунгарском Алатау и на севере Тянь-Шаня [1, 2]. Естественные местообитания *H. theinum* ограничены гумидными высокогорьями, где он встречается на альпийских и субальпийских лугах, каменистых склонах, галечниковых отмелях рек.

Вид был описан на основании сборов растений из альпийского пояса гор Юго-Западного Алтая, отличающихся высоким габитусом, особенностями морфологии и выраженными тонизирующими свойствами настоя корней, широко употребляемого местным населением [1]. Последующие биохимические исследования показали высокое содержание в корнях копеечника чайного изофлавоноидов, известных как фитоэстрогены: формононетин, формононетин гликозид и др. [3, 4].

Неконтролируемые сборы корней *H. theinum*, возросшие за последние десятилетия, на фоне медленных темпов роста растений и возобновления популяций [5] привели к почти полному уничтожению наиболее доступных местонахождений на территории Алтая, что послужило причиной для внесения вида в список редких для республики Горный Алтай [6, 7]. Вид находится под защитой на территории Катунского биосферного заповедника,

Сумультинского республиканского комплексного заказника и двух памятников природы: “Мультиинские озера” и “Большой Яломанский” [8].

Для оценки состояния популяций узколокальных, эндемичных видов и прогнозирования динамики их развития наряду с изучением демографической структуры, особенностей биологии и репродукции важным аспектом является выявление популяционно-генетической конституции этих видов [9, 10].

Ведущими генетическими факторами, повышающими риск угрозы существованию редких видов, считаются близкородственные скрещивания, вызывающие повышение доли гомозигот в популяциях, аккумуляцию летальных мутаций и сокращение дрейфа генов, что в свою очередь приводит к снижению плодовитости особей и их адаптивных качеств [10]. В последние десятилетия для проведения генетического анализа широкое распространение получили молекулярные методы [9, 11, 12]. Так, AFLP- (Amplified fragment length polymorphism) и RFLP- (Restriction fragment length polymorphism) маркеры были использованы для выявления внутривидового полиморфизма у *Hedysarum coronarium* L. [13, 14], изучения родства и филогении средиземноморских представителей рода *Hedysarum* [15], идентификации корней копеечника в составе лекарственных препаратов [16].



Рис. 1. Места сбора образцов *Hedysarum theinum*. На карте обозначены популяции: 1 – Озерная, 2 – Тальмень, 3 – Красная, 4 – Семинская.

Межмикросателлитные молекулярные маркеры (Inter simple sequence repeats, ISSRs), отличающиеся меньшей длиной, высокой частотой встречаемости в геноме высших растений и гипервариабельностью [12], были применены для оценки изменчивости ряда видов и сортов копеечника [17, 18]. Однако до сих пор изменчивость и популяционная структура Алтае-Саянского эндемика *H. theinum* остаются малоизученными [19]. В настоящей статье представлен анализ генетической вариабельности *H. theinum* на внутри- и межпопу-

ляционном уровне, что позволит определить оптимальные методы охраны вида, в том числе создание банка генотипов в условиях *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования был использован материал 36 растений из четырех популяций *Hedysarum theinum*, расположенных на территории республики Горный Алтай (рис. 1): 1) популяция Озерная; 2) Тальмень; 3) Красная и 4) Семинская. Растительный материал был собран с 6–12 случайно выбранных растений из каждой популяции и высушен в силикагеле.

ДНК экстрагировали методом, предложенным Doyle и Doyle [20], с небольшими модификациями. Чистоту и концентрацию полученных экстрактов ДНК определяли спектрофотометрически (Eppendorf, Germany). Чистота ДНК была рассчитана как соотношение величин оптической силы экстракта при длине волн 260 и 280 нм.

Среди 40 ISSR-праймеров шесть были отобраны для изучения изменчивости *H. theinum* благодаря высокому полиморфизму амплифицированных фрагментов и репрезентативности полученного ISSR-профиля (табл. 1). Процедура амплификации проводилась в 2–5 повторностях. Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл содержала 2.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM праймера, 0.4 mM мононуклеотидов, 1× PCR-буфер, 1.5 ед. *Taq* ДНК-полимеразы (Медиген, Россия) и 50 нг матрицы. Программа амплификации состояла из 1.30 мин при 94°C; 35 циклов амплификации: 0.40 мин при 94°C, 0.45 мин отжига при 42–64°C и 1.30 мин при 72°C; 5 мин при 72°C. ПЦР проводили в C 1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, USA). Для каждого праймера оптимальную температуру отжига  $T_{\text{оптим}}$  подбирали эмпирически. Продукты

Таблица 1. Характеристики ISSR-праймеров, использованных для изучения генетического полиморфизма *Hedysarum theinum*

Праймер	Температура отжига, °C		Кол-во ампликонов (в т.ч. полиморфных, %)	Rp	Ib	x
	$T_{\text{теор.}}$	$T_{\text{оптим.}}$				
(AC) <sub>8</sub> CG	56	47	35 (100.0)	13.055	0.373	75
(AG) <sub>10</sub> G	66	64	25 (96.0)	10.111	0.405	56
(CA) <sub>6</sub> AG	42	47	10 (90.0)	3.056	0.306	8
(CA) <sub>6</sub> GG	44	42	30 (96.7)	11.278	0.376	63
(CA) <sub>6</sub> RG*	43	49	21 (90.5)	6.612	0.315	32
(CTC) <sub>3</sub> GC	38	42	11 (90.0)	2.167	0.197	3
В среднем	—	—	22 (93.9)	7.713	0.329	39.5
Всего	—	—	132 (95.5)	46.277	1.971	237

Примечание. Rp – разрешающая сила, Ib – информативность, x – количество генотипов, которое может быть идентифицировано.  
\* R = (A, G).

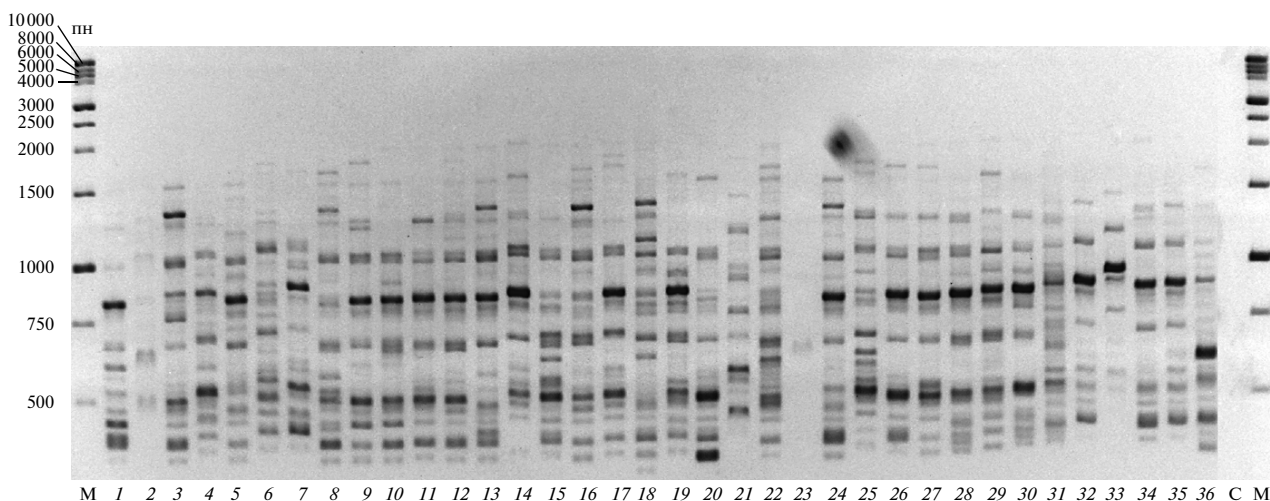


Рис. 2. ISSR-профиль 36 образцов *H. theinum*, полученный при амплификации с праймером  $(CA)_6AG$  ( $T_a = 47^\circ$ ). М – молекулярный маркер массы; С – отрицательный контроль.

амплификации разделяли электрофоретически в 1.5%-ном агарозном геле в  $1 \times$  TBE-буфере путем погружения 8 мкл амплификационной смеси в карман геля. Разделение продолжали до достижения индикатором бромфеноловый голубой противоположного края геля. Полученные ISSR-фрагменты были окрашены 0.1% SYBR-Green (Медиген, Россия), который добавляли в амплификационную смесь перед разделением в геле, и сфотографированы в УФ-свете. Размер амплифицированных фрагментов определяли с помощью молекулярного маркера массы (Медиген, Россия).

Каждый амплифицированный фрагмент рассматривался как доминантный маркер и для изучаемых образцов отмечалось его присутствие, т.е. наличие признака (1), либо отсутствие (0). Разрешающая сила праймеров ( $R_p$ ) была рассчитана в соответствии с формулой, предложенной Prevost и Wilkinson [21]:  $R_p = \sum I_b$ . Информативность праймера ( $I_b$ ) определялась следующим образом:  $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ , где  $p$  – доля образцов, содержащих данный маркер. Соотношение между разрешающей силой праймера и количеством генотипов, которое может быть идентифицировано с его помощью ( $x$ ), было определено по формуле [21]:  $R_p = 0.15x + 1.78$ .

Информационный индекс Шеннона ( $H$ ) рассчитывался на внутри- ( $H_{pop}$ ) и межпопуляционном уровне ( $H_{sp}$ ) согласно формуле [22, 23]:  $H = -\sum p_i \log_2 p_i$ , где  $p_i$  – частота встречаемости ампликона. Доля внутрипопуляционной изменчивости на основе индекса Шеннона рассчитывалась соотношением  $(H_{pop}/H_{sp}) \times 100$ ; доля межпопуляционной изменчивости ( $G_{st}$ ) определялась как  $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp} \times 100$ . Генетическое разнообразие внутри популяций рассчитывалось по формуле Nei и Li [24]:  $S_{xy} = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ , где  $N_{xy}$  –

количество ампликонов, общих для популяций X и Y,  $N_x$  и  $N_y$  – количество ампликонов, отмеченное для популяций X и Y соответственно. Индекс генетической идентичности ( $I$ ) определялся по формуле Nei [25]:  $I = J_{xy}/(J_x + J_y)0.5$ , где  $J_{xy} = \sum p_{ix}p_{iy}$ ,  $J_x = \sum p_{ix}^2$ ,  $J_y = \sum p_{iy}^2$ , где  $p_{ix}$  и  $p_{iy}$  – частота аллеля  $i$  в популяции X и Y соответственно. Величина генетической дистанции ( $D$ ) была рассчитана как  $D = -\ln [I]$  [25].

Анализ молекулярной изменчивости AMOVA проведен с помощью программы GenAlEx 6.4 [26]. Кластерный анализ выполнен на основе индекса генетических дистанций Nei [27] методом UPGMA (unweighted pair-group method with the arithmetic mean) с помощью программы TFPGA 1.3 [28]. Значения бутстреп рассчитывались для 1000 повторов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Чистота полученных экстрактов ДНК варьировала от 1.21 до 2.98 и в среднем составила 1.74, концентрация составила от 60 до 560 нг ДНК на 5 мг высушенного материала. Было выявлено 132 воспроизводимых ISSR-ампликона размером от 300 до 1700 пн, из них 126 – полиморфные (95.5%). Используемые в работе ISSR-праймеры имеют динуклеотидное строение, за исключением  $(CTC)_3GC$ . Последовательности  $(AG)_n$ ,  $(AC)_n$  и  $(GA)_n$  оказались наиболее частыми в геноме *H. theinum*. Пример ISSR-профиля *H. theinum*, полученного при амплификации с праймером  $(CA)_6AG$ , приведен на рис. 2.

В зависимости от праймера было получено 10–35 ПЦР-фрагментов, что в среднем составило 22 (табл. 1). Маркеры, специфичные для той или иной популяции, выявлены не были. Разрешаю-

**Таблица 2.** Количество амплифицированных фрагментов, их полиморфизм и индекс генетической изменчивости  $Nei$  и  $Li$  [24] для популяций *H. theinum*

Популяция	Объем выборки	Кол-во ампликонов (в т.ч. полиморфных, %)	Внутрипопуляционная изменчивость, $S$		
			min	max	в среднем
Озерная	8	95 (86.3)	0.185	0.732	0.486
Тальмень	10	104 (84.6)	0.176	0.718	0.419
Красная	12	112 (88.4)	0.205	0.660	0.639
Семинская	6	76 (72.4)	0.251	0.618	0.357
В среднем	9	96.8 (82.9)	0.204	0.682	0.475
Всего	36	132 (95.5)	—	—	—

**Таблица 3.** Коэффициенты генетической идентичности,  $I$  (выше диагонали) и генетических дистанций,  $D$  (ниже диагонали) ( $Nei$ , 1972), рассчитанные для популяций *H. theinum*

Популяция	Озерная	Тальмень	Красная	Семинская
Озерная	—	0.919	0.870	0.853
Тальмень	0.085	—	0.876	0.834
Красная	0.140	0.167	—	0.900
Семинская	0.159	0.182	0.106	—

шая сила праймеров варьировала от 2.167 до 13.055 и в среднем составила 7.713. Информативность праймеров была установлена в пределах от 0.197 до 0.405, что в среднем было равно 0.329. Наибольшие показатели разрешающей силы ( $R_p = 13.055$ ) и информативности ( $I_b = 0.405$ ) отмечены для праймеров  $(AC)_8CG$  и  $(AG)_{10}G$  соответственно. Количество генотипов, которое может быть идентифицировано при использовании исследованных праймеров, варьировало от 3 до 75 и в среднем составило 39.

Величина внутрипопуляционной изменчивости  $S$ , предложенная  $Nei$  и  $Li$  [23], составила от 0.357 до 0.639 и в среднем была равна 0.475 (табл. 2). Для каждой из исследованных популяций число ампликонов изменялось в пределах от 76 до 112 с долей полиморфных ампликонов 72–88%. Среди изученных популяций наибольшее значение генетической идентичности  $I$ , равное 0.919 (табл. 3), было выявлено для популяций Тальмень и Озерная, несколько меньшая величина отмечена для популяций Семинская и Красная (0.900). Средние значения величин генетической идентичности ( $I$ ) и дивергенции ( $D$ ) для популяций *H. theinum* составили 0.875 и 0.139 соответственно. Все изученные популяции характеризовались значением генетической изменчивости Шеннона  $H_0$  в диапазоне от 3.83 до 6.18 (табл. 4). Значение индекса внутрипопуляционной изменчивости ( $H_{pop}/H_{sp} = 70.5$ ) оказалось выше значения межпопуляционной изменчивости ( $G_{st} = 29.5$ ), что подтверждено результатами теста AMOVA: величина изменчи-

вости внутри популяций составила 15.684 (88.2%), между популяциями – 2.092 (11.8%).

По данным UPGMA-анализа выявлено разделение популяций *H. theinum* на две клады с бутстреп-поддержкой 100% (рис. 3). Первый кластер содержит популяции Озерная и Тальмень (98%), второй кластер представлен популяциями Красная и Семинская (85%).

## ОБСУЖДЕНИЕ

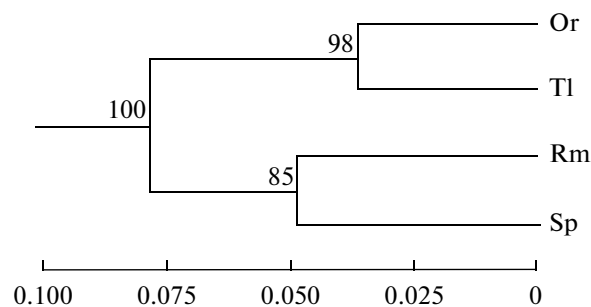
По данным ISSR-анализа, все исследованные образцы обладают индивидуальным паттерном, что указывает на высокую разрешающую силу метода. Праймеры  $(AC)_8CG$ ,  $(AG)_{10}G$ ,  $(CA)_6GG$  и  $(CA)_6RG$  имели положительный результат для оценки генетической изменчивости *H. theinum*: доля полиморфных ампликонов составила 90.5–100%, величина разрешающей силы варьировала от 6.6 до 13. Эффективность праймера  $(AG)_{10}G$  для изучения полиморфизма видов *Hedysarum*, установленная ранее [17, 18], подтвердилась и для исследования изменчивости *H. theinum*. Выявлено, что наряду с  $(AG)_n$ -повторами наиболее частыми в геноме *H. theinum* являются микросателлитные динуклеотидные последовательности  $(AC)_n$  и  $(CA)_n$ . Установлено, что повтор  $CA$  в составе праймера более эффективен в случае, если он закреплен динуклеотидом  $GG$  с 3'-конца.

Несмотря на узколокальный, эндемичный характер распространения, *Hedysarum theinum* имеет высокие значения генетической вариабельности:  $H_{sp} = 7.71$ ,  $H_{pop} = 5.44$ . Полученный результат

приближен к уровню variability *Hedysarum coronarium* L. (*Sulla coronaria* (L.) Medik.), распространенного на территории Западного Средиземноморья и Туниса:  $H_{sp} = 8.99$ ,  $H_{pop} = 6.28$  [18], что противоречит представлению, согласно которому виды, имеющие узкий ареал, обладают меньшим генетическим разнообразием, чем широкопространенные виды [29, 30]. Тем не менее данный феномен был неоднократно описан для ряда эндемиков из разных семейств: *Oxytropis chankaensis* [31], *Euphorbia faurieri* [32], *Heliantus neglectus* [33] и др. Следовательно, размер ареала не должен рассматриваться как ключевой фактор, обуславливающий уровень variability вида [30]. Наименьшая величина генетической изменчивости, отмеченная для популяции Семинская (табл. 4), вероятно, отражает ее северное, пограничное положение на территории ареала, которое может характеризоваться субоптимальными экологическими условиями, ведущими к снижению variability вида и дифференциации генопула [34, 35].

Анализ показал, что наибольшая variability *H. theinum* отмечена на внутривидовой популяционном уровне:  $H_{pop}/H_{sp} = 70.5$ , что подтверждено коэффициентом внутривидовой изменчивости  $Nei$  и  $Li$  [24], равным 0.475, и значением индекса молекулярной изменчивости AMOVA (88.2%). В то же время уровень межвидовой генетической variability, выявленный для *H. theinum* ( $G_{st} = 0.29$ ), очень близок к уровню variability популяций *Hedysarum coronarium* L. ( $G_{st} = 0.30$ ) [18]. Высокий уровень изменчивости *H. theinum* при значительном генетическом сходстве популяций подтверждается характером полиморфизма запасных белков семян, выявленным для *H. theinum* [19], и соответствует преимущественно перекрестному типу опыления этого вида [36], способствующему свободному скрещиванию и дрейфу генов [37].

Значительный генетический полиморфизм, выявленный для *H. theinum*, свидетельствует об эволюционном потенциале этого вида, который



**Рис. 3.** UPGMA-дендрограмма, отражающая взаимоотношения между четырьмя популяциями *H. theinum* (Or – Озерная, Tl – Тальмень, Rm – Красная, Sp – Семинская), построенная методом расчета коэффициента генетических расстояний  $Nei$  (1972). Цифрами в узлах ветвления обозначена величина бутстреп-поддержки.

тем не менее может обрести тенденцию к сокращению, учитывая неконтролируемые возрастающие темпы заготовок красного корня и медленную смену поколений: продолжительность жизни особей *H. theinum* достигает 80–90 лет и более [5]. Основываясь на особенностях выявленной в ходе исследований популяционно-генетической структуры *H. theinum*, для охраны вида нами были предложены следующие рекомендации. Во-первых, высокий уровень генетической variability *H. theinum* указывает на возможность использования материала из небольшого числа популяций при создании коллекции вида, в том числе *ex situ*. Во-вторых, принимая во внимание незначительную величину популяционной дифференциации вида, для его сохранения *in situ* можно рекомендовать исключение из хозяйственного использования и охрану наиболее полиморфных популяций *H. theinum*. Выявленная высокая variability ISSR-маркеров позволяет рассматривать ISSR-анализ как эффективный и чувствительный метод, пригодный для паспортизации генотипов и сортов *H. theinum*, оценки чистоты семенного материала и идентификации сырья, предназначенного для изготовления лекарственных препаратов.

**Таблица 4.** Значение индекса внутри- и межвидовой изменчивости Шеннона [22, 23] для популяций *H. theinum*

Праймер	Or	Tl	Rm	Sp	$H_{pop}$	$H_{sp}$	$H_{pop}/H_{sp}$ , %	$G_{st}$ , %
(AC) <sub>8</sub> CG	8.90	11.18	11.59	8.78	10.11	13.06	77.4	22.6
(AG) <sub>10</sub> G	4.42	6.60	7.869	3.80	5.67	10.11	56.1	43.9
(CA) <sub>6</sub> AG	2.23	1.49	1.74	1.57	1.76	2.17	81.2	18.8
(CA) <sub>6</sub> GG	10.30	9.32	8.22	5.71	8.39	11.28	74.4	25.7
(CA) <sub>6</sub> RG	6.26	5.10	5.15	0.65	4.29	6.61	64.9	35.1
(CTC) <sub>3</sub> GC	2.36	2.36	2.53	2.45	2.42	3.06	79.3	20.7
$H_0$	5.75	6.01	6.18	3.83	5.44	7.71	70.5	29.5

Примечание. Популяции: Or – Озерная, Tl – Тальмень, Rm – Красная, Sp – Семинская.

Авторы выражают признательность за помощь при сборе материала канд. биол. наук И.А. Артемову (Центральный сибирский ботанический сад СО РАН) и директору Катунского биосферного заповедника А.В. Затееву.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 20 и УрО РАН № 12-С-4-1028 и Программы Президиума РАН “Биологическое разнообразие” № 30.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красноборов И.М., Азовцев Г.П., Орлов В.П. Новый вид рода *Hedysarum* L. (Fabaceae L.) из Южной Сибири // Бот. журн. 1985. Т. 70. № 7. С. 968–973.
2. Курбатский В.И. Род *Hedysarum* L. // Флора Сибири / Ред. Положий А.В и др. Новосибирск: Наука, 1994. Т. 9. С. 153–166.
3. Агафонова (Дорогина) О.В., Володарская С.Б. Продуктивность и содержание олигомерных катехинов у *Hedysarum theinum* Krasnob. в Центральном и Юго-Западном Алтае // Раст. ресурсы. 2000. Т. 4. С. 47–52.
4. Вдовиченко М.Ю., Кузовкина И.Н., Пэтц Х., Шнайдер Б. Культивируемые *in vitro* корни копеечника чайного и образование в них фенольных соединений // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 4. С. 604–613.
5. Карнаухова Н.А. Особенности развития *Hedysarum theinum* (Fabaceae) в природных условиях и при интродукции в Центральный сибирский ботанический сад (г. Новосибирск) // Раст. ресурсы. 2007. Т. 43. № 3. С. 14–25.
6. Красная книга Республики Алтай (растения). Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений / Ред. А.Г. Манеев и др. Новосибирск: ЦСБС СО РАН, 1996. С. 23–24.
7. Красная книга Республики Алтай (растения). Горно-Алтайск: Горно-Алтайский гос. ун-т, 2007. С. 29–30.
8. Красная книга Республики Алтай: особо охраняемые территории и объекты / А.М. Маринин и др. Горно-Алтайск: Горно-Алтайский гос. ун-т, 2000. С. 31, 48, 159, 198.
9. Haig S.M. Molecular contributions to conservation // Ecology. 1998. V. 79. № 2. P. 413–425.
10. Frankham R. Genetics and conservation biology // C. R. Biologies. 2003. V. 326. P. S22–S29.
11. Milligan B.G., Leebens-Mack J., Strand A.E. Conservation genetics: beyond the maintain of marker diversity // Mol. Ecol. 1994. V. 3. P. 423–435.
12. Wolfe A.D. ISSR techniques for evolutionary biology // Methods Enzymol. 2005. V. 395. P. 134–144.
13. Trifi-Farah N., Marrakchi M. Genetic variability of *Hedysarum coronarium* L. using molecular markers // Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses / Ed. Sulas L. Zaragoza (Spain): CIHEAM-IAMZ, 2000. P. 85–89.
14. Marghali S., Trifi-Farah N., Ghariani S., Marrakchi M. Etude du polymorphisme moléculaire par AFLP d'accessions d'*H. coronarium* en Tunisie // Rangeland and pasture rehabilitation in Mediterranean areas / Ed. Ferchichi A. Zaragoza (Spain): CIHEAM-IAMZ, 2004. P. 85–88.
15. Trifi-Farah N., Marrakchi M. *Hedysarum* phylogeny mediated by RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA // Genet. Resour. Crop. Evol. 2001. V. 48. P. 339–345.
16. Lu K.-T., Lee H.-C., Liu F.-S. et al. Discriminating *Astragali radix* from *Hedysarum radix* in chinese medicine preparations using nested PCR and DNA sequencing methods // J. Food Drug. Anal. 2009. V. 17. № 5. P. 380–385.
17. Chennaoui-Kourda H., Marghali S., Marrakchi M., Trifi-Farah N. Genetic diversity of *Sulla* genus (*Hedysaraea*) and related species using Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) markers // Biochem. Syst. Ecol. 2007. V. 35. P. 682–688.
18. Marghali S., Zitouna N., Gharbi M. et al. Evaluation of genetic diversity in *Sulla coronaria* from different geographical populations in Tunisia by inter simple sequence repeat (ISSR) // Afr. J. Biotechnol. 2012. V. 11. № 58. P. 12158–12166.
19. Агафонова М.А., Агафонова (Дорогина) О.В. Полиморфизм полипептидов семян у близкородственных видов *Hedysarum theinum* Krasnob. и *H. neglectum* Ledeb. (Fabaceae) // Turczaninowia. 2002. Т. 5. № 2. С. 72–78.
20. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // Phytochem. Bul. 1987. V. 19. P. 11–15.
21. Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting to potato cultivars // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 107–112.
22. Lewontin R.C. The apportionment of human diversity // Evol. Biol. 1972. V. 6. P. 381–398.
23. King L.M., Schaal B.A. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* // Evolution. 1989. V. 43. № 5. P. 1117–1119.
24. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 10. P. 5269–5273.
25. Nei M. Genetic distance between populations // Am. Nat. 1972. V. 106. P. 283–292.
26. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. P. 288–295.
27. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89. P. 583–590.
28. Miller M.P. Tools for populations genetic analyses (TFPGA). 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Computer software distributed by author.
29. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding and germplasm resources / Eds Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L. et al. Sunderland, Mass.: Sinauer, 1989. P. 43–63.
30. Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Pattern of genetic variation in rare and widespread plant congeners // Am. J. Bot. 2000. V. 87. № 6. P. 783–792.

31. Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М., Журавлев Ю.Н. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD-маркеров // Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С. 877–884.
32. Park K.-R. Comparisons of allozyme variation of narrow endemic and widespread species of Far East *Euphorbia* (Euphorbiaceae) // Bot. Bull. Acad. Sin. 2004. V. 45. P. 221–228.
33. Raduski A.R., Rieseberg L.H., Strasburg J.L. Effective population size, gene flow, and species status in a narrow endemic Sunflower, *Helianthus neglectus*, compared to its widespread sister species, *H. petiolaris* // Int. J. Mol. Sci. 2010. V. 11. P. 492–506.
34. Lesica P., Allendorf F.W. When are peripheral populations valuable for conservation? // Conserv. Biol. 1995. V. 9. № 4. P. 753–760.
35. Eckert C.G., Samis K.E., Loughheed S.C. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond // Mol. Ecol. 2008. V. 17. № 5. P. 1170–1188.
36. Дорогина О.В., Карнаухова Н.А. Антэкология и прогнозирование типа опыления по электрофоретическим спектрам полипептидов семян в популяциях редкого вида *Hedysarum theinum*, произрастающего в Горном Алтае // Растит. мир Азиатской России. 2008. № 1. С. 52–57.
37. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1996. V. 351. P. 1291–1298.

### Genetic Differentiation of Altai–Sayan Endemic *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) Evaluated by Inter-Simple Sequence Repeat Analysis

N. S. Zvyagina and O. V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, 630090 Russia  
e-mail: zviagnat@rambler.ru

The objective of the research described in this paper was to evaluate the level of genetic variability and differentiation between the populations of *Hedysarum theinum* Krasnob., endemic species of Altai–Sayan Mountains. In this study, six inter-simple sequence repeat (ISSR) primers were used and generated a total of 132 molecular markers, 126 of which were polymorphic (95.5%). The large amount of DNA polymorphism at the intrapopulation level ( $H_{\text{pop}}/H_{\text{sp}} = 70.5$ ) was evinced by the analysis of a molecular variance (AMOVA) of 88.2%. The high genetic similarity ( $I = 0.875$ ) detected between the populations of *H. theinum* reflects the strongly restricted endemic range of *H. theinum*, which facilitates the gene flow among populations and outcrossing. Due to the significant genetic diversity revealed among individuals against a background of moderate population differentiation collecting samples for *ex situ* *H. theinum* conservation from a small number of populations is acceptable. Finally, selected highly polymorphic ISSR markers produced consistently repeatable patterns are discussed as a powerful tool for genotype identification and the qualification of root feedstock.