

К ВОПРОСУ О РАСПРОСТРАНЕНИИ *HEDYSARUM UCRAINICUM* KASCHM. НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2016 Н.А. Супрун¹, И.А. Шанцер²

¹ Государственное бюджетное учреждение Волгоградской области
«Волгоградский региональный ботанический сад»

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, г. Москва

Статья поступила в редакцию 28.11.2016

На основе морфологических и генетических исследований редких видов растений *Hedysarum ucrainicum* Kaschm. и *H. cretaceum* Fisch. с использованием морфологии и ISSR маркеров показано, что *H. ucrainicum* должен быть исключен из списка редких и исчезающих видов Волгоградской области, так как не произрастает на этой территории.

Ключевые слова: редкие виды, *Hedysarum cretaceum*, *Hedysarum ucrainicum*, Волгоградская область, Средний Дон, ISSR-метод.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01094.

Hedysarum ucrainicum Kaschm. – редкий вид флоры меловых обнажений юга Европейской части России, описанный с мелов рек Айдара и Беленькой в Луганской области [1]. Вид считается узкорегionalным эндемиком и внесен в Красную книгу Российской Федерации [2]. Для территории Волгоградской области *H. ucrainicum* был впервые приведен в работах Н.Г. Володиной [3-5] из окрестностей хуторов Большоголубинский и Малонабатовский Калачевского района в излучине Среднего Дона. Эти местонахождения располагаются дизъюнктивно от основного ареала вида в бассейне р. Айдар. Во Флоре СССР [6] и Флоре европейской части СССР [7] *H. ucrainicum* приводится только для Белгородской (Ровенский район, меловые обнажения близ сс. Айдар, Нагольное, Ровеньки, Кленовское) и Воронежской областей (Кантемировский и Россошанский районы: меловые обнажения близ сс. Волоконовка, Новобелая Кантемировского р-на [8]). На сегодняшний день *H. ucrainicum* сохраняется во флористическом списке для Волгоградской области и внесен в региональную Красную книгу [9], хотя нахождение его на территории области вызывает сомнения.

В Волгоградской области широко распространен и внешне сходный с *H. ucrainicum* вид – *H. cretaceum* Fisch. В Волгоградской области он довольно широко распространен на меловых обнажениях по рр. Дону, Хопру, Бузулуку, Иловле

Супрун Наталья Александровна, кандидат биологических наук, начальник научного отдела.

E-mail: n.suprun@mail.ru.

Шанцер Иван Алексеевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Гербарий.

E-mail: ischanzer@gmail.com

и Медведице [10]. На территории области располагается locus classicus вида – он был описан по сборам из бывшего Камышинского уезда [11,4,7]. Среднедонские находки *H. ucrainicum* на территории Волгоградской области находятся в пределах ареала *H. cretaceum*, в отличие от популяций основной части ареала этого вида, который с ареалом *H. cretaceum* не перекрывается (рис. 1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В анализ были включены 47 образцов копеечников, в том числе 36 образцов *H. cretaceum* (включая 4 образца *H. «ucrainicum»* из Волгоградской области) и 8 образцов *H. ucrainicum* из 11 географически удаленных друг от друга локальных популяций. Список местонахождений, сокращенных обозначений локальных популяций и числа образцов, изученных в каждой из них, приведен в таблице 1.

ДНК выделяли ЦТАБ методом [12] из листьев гербарных образцов или листьев, высушенных в силикагеле.

Для проведения фрагментного анализа ДНК были использованы межмикросателлитные маркеры (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR), зарекомендовавшие себя, как надежные и воспроизводимые в большом числе исследований по изучению популяционной структуры и гибридизационных процессов в природных популяциях разных видов растений [13-17].

В качестве праймеров для проведения ПЦР были использованы 8 олигонуклеотидных последовательностей, комплементарных микросателлитным участкам генома. Состав и температуры отжига праймеров приведены в таблице 2.

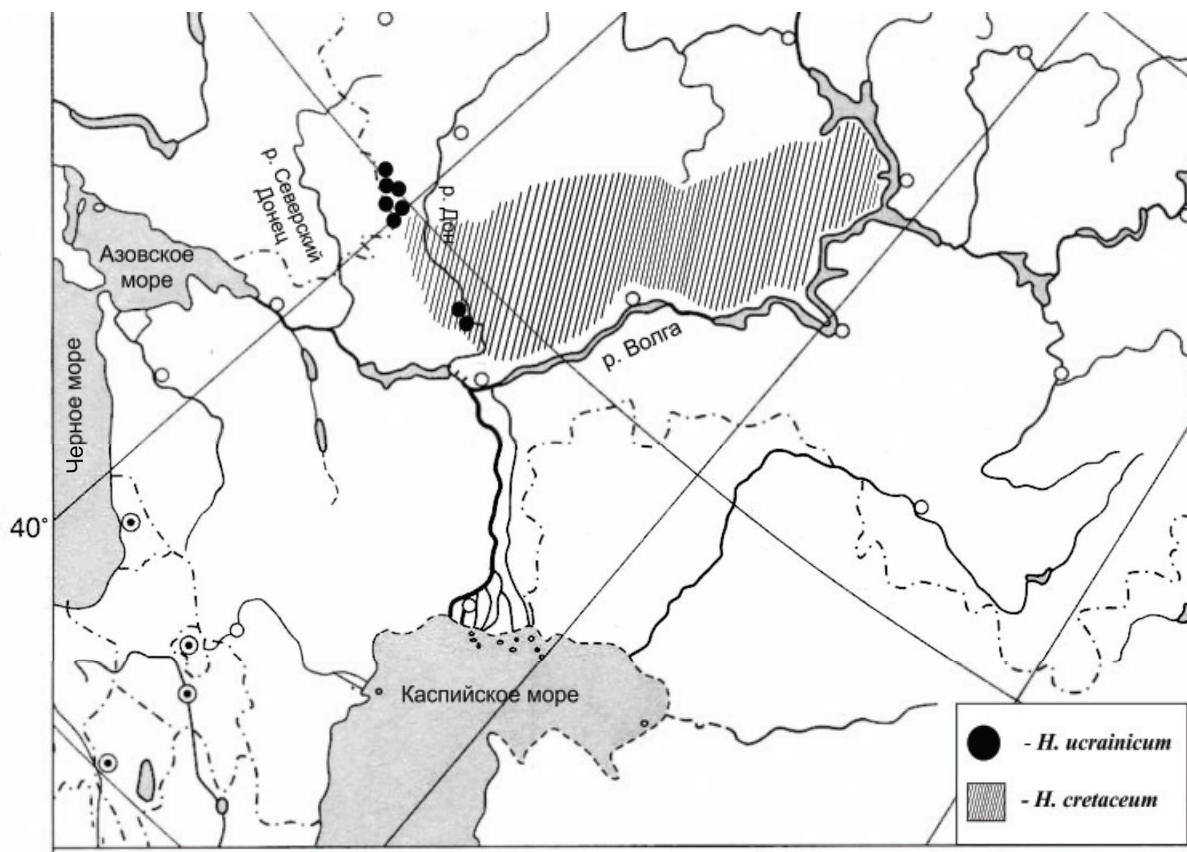


Рис. 1. Ареал *H. ucrainicum* и *H. cretaceum*

Таблица 1. Исследованные популяции видов *Hedysarum*

Популяция	Место сбора	Вид	Место хранения образцов	n
1.	Волгоградская область, Нехаевский район, окр. х. Нехаевский	<i>H. cretaceum</i>	личный гербарий Н.А. Супрун	4
2.	Волгоградская область, Руднянский район, окр. урочища «Синяя гора»	<i>H. cretaceum</i>	личный гербарий Н.А. Супрун	3
3.	Волгоградская область, Дубовский район, окр. с. Полунино	<i>H. cretaceum</i>	личный гербарий Н.А. Супрун	4
4.	Волгоградская область, Иловлинский район, окр. х. Кондраши	<i>H. cretaceum</i>	личный гербарий Н.А. Супрун	4
5.	Волгоградская область, Иловлинский р-н, окр. ст. Сиротинская и Б. Набатовский,	<i>H. cretaceum</i>	личный гербарий Н.А. Супрун, МНА	5
6.	Волгоградская область, Иловлинский р-н, между сс. Михайловка и Каменный Брод	<i>H. cretaceum</i>	МНА	2
7.	Волгоградская область, Ольховский район, окр. х. Захаровка и Михайловка,	<i>H. cretaceum</i>	личный гербарий Н.А. Супрун, МНА	5
8.	Волгоградская область, Жирновский р-н, меловые обнажения по р. Медведицы, с. Меловатка, Ольховка, Красный Яр	<i>H. cretaceum</i>	МНА	3
9.	Волгоградская область, Камышинский р-н, окр. с. Белогорка	<i>H. cretaceum</i>	МНА	1
10.	Волгоградская область, Калачевский район, близ х. Большенабатовский	<i>H. cretaceum</i> , <i>H. "ucrainicum"</i>	личный гербарий Н.А. Супрун, МНА	8
11.	Луганская обл., Меловской р-н, с. Стрельцовка	<i>H. ucrainicum</i>	МНА	8

Примечание: n – число образцов, изученных из отдельной локальной популяции; МНА – Гербарий ГБС РАН

Таблица 2. Последовательности ISSR праймеров, использованных для проведения ПЦР

Название	5'-3' последовательность	Температура отжига, °С
M 2	GAGAGAGAGAGAGAYT	50
M11	ACACACACACACACYT	50
UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAA	48
HB12	GGGTGGGGTGGGGTG	54
HB13	TCTCTCTCTCTCTCRT	50
HB14	GGTCCCTGAC	36
HB15	GTGACGTAGG	36
844A	AGCCAGCGAA	36

Реакционная смесь (20 мкл) содержала 10–20 нг ДНК, 20 пикомоль праймера и 4 мкл готового реакционного микса MasterMix 5X Mag^{DP}MIX-2025 (200 мкМ каждого dNTP, 1,5 мМ MgCl₂, 1,5 ед. Таq-полимеразы и буфер, Диалат ЛТД, Россия). ПЦР с предварительной денатурацией (95°C – 3 мин) проводили в амплификаторе MJ Research PTC-220 DNA Engine Dyad (Biorad Ltd., США) в течение 40 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с; отжиг при соответствующей температуре – для каждого праймера – 30 с.; элонгация при 72°C – 1 мин; финальная элонгация при 72°C – 3 мин.

Фотографии ISSR гелей анализировали с помощью программы Cross Checker [18] с составлением матрицы, в которой наличие или отсутствие в ISSR спектрах одинаковых по размеру фрагментов соответствовало значениям 1 или 0. Предварительный анализ полученной матрицы проводили в программе Microsoft Excel. Анализ методом главных координат проводили в программе PAST 2.0 [19] с использованием расстояния Жаккара.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Проведенное обследование указываемых в литературе [3–5,9] местонахождений *H. ucrainicum* в окрестностях хут. Большеголубинский и Малонабатковский Калачевского района Волгоградской области не дало положительного результата – этого вида нам обнаружить не удалось. В гербарных фондах Волгоградской области (ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад», гербарий ФГБОУ ВПО «ВГСПУ») образцы *H. ucrainicum* также отсутствуют. Единственным подтверждением произрастания *H. ucrainicum* на территории Волгоградской области оказались 2 экземпляра с этикеткой «Волгоградская область, меловые обнажения в устье реки Голубой, х. Малонабатковский Калачевского района, овраг к юго-востоку от села, пологий склон, покрытый мелкой щебенкой, по продольным бороздкам, 24.08.1973, Володина Н.Г. (МНА)», хранящиеся в гербарии ГБС РАН. Однако внимательное морфологическое изучение этих образцов позволило

идентифицировать их, как *H. cretaceum*.

По различным диагностическим ключам *H. ucrainicum* и *H. cretaceum* имеют сходные между собой признаки, такие как жизненная форма, высота растения, окраска цветков, внешние признаки стебля, листовой пластинки и цветоносных побегов. Отличительными признаками данных видов являются наличие и отсутствие шипика на флаге венчика (у *H. cretaceum* он отсутствует), соотношение зубчиков к трубке чашечки (*H. cretaceum* – зубцы в 2–3 раза короче трубки, *H. ucrainicum* – зубцы чашечки в 2–3 раза длиннее трубки); внешними признаками плода (*H. cretaceum* – членики бобов продолговато-эллиптические, коротко прижато волосистые, без шипиков, нередко отделяющиеся перетяжками, грубо-сетчатые, у *H. ucrainicum* – членики бобов округло-яйцевидные, малоопушенные, но с острыми мелкими шипиками). Таким образом, оба вида достаточно хорошо отличаются друг от друга по размерам элементов цветка и характеру опушения плода (рис. 2).

H. ucrainicum близок к *H. gmelinii* Ledeb., от которого отличается цветками отклоняющимися и отчасти поникающими при отцветании (а не прижатыми кверху). Ещё ближе к казахстанскому *H. shellianum* Knjasev, от которого отличается более коротким опушением (волоски около 0.5 мм дл., а не 1–1.5 мм дл.) на стеблях, черешках, чашечках, в среднем более узкими листочками.

Тем не менее, полученные нами данные подтверждаются анализом состава ISSR маркеров методом главных координат, который показывает, что образцы, собранные в Волгоградской области и определенные, как *H. ucrainicum*, группируются вместе с другими образцами *H. cretaceum* из Волгоградской области, а не с образцами настоящего *H. ucrainicum* из Белгородской области (рис. 3).

ВЫВОДЫ

Таким образом, *H. ucrainicum* приводился для Волгоградской области по ошибочным определениям образцов, относящихся к *H. cretaceum*. На самом деле этот вид не заходит так далеко на

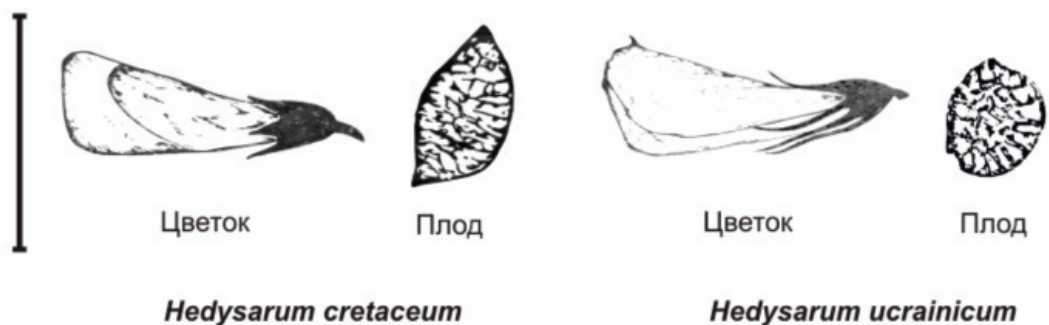


Рис. 2. Внешний вид венчика и плода *H. cretaceum* и *H. ucraïnicum*

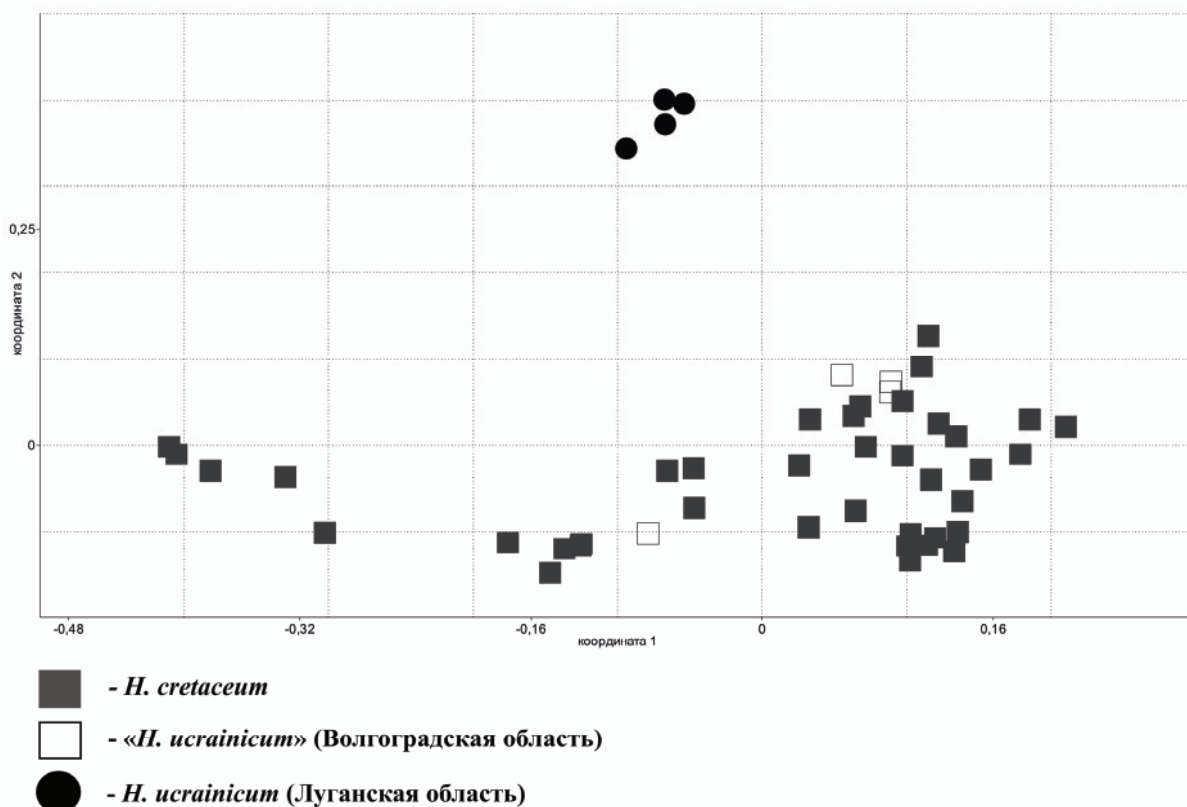


Рис. 3. Результаты анализа образцов *H. cretaceum* и *H. ucraïnicum* из 12 локальных популяций методом главных координат (РСоА) (анализ сделан по молекулярным данным (данные ISSR-маркеров)

восток, оставаясь узколокальным эндемиком бассейна р. Айдар. Растения, ранее определявшиеся, как *H. ucraïnicum*, следует относить к *H. cretaceum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кашменский Б.Ф. *Hedysarum ucraïnicum* (sp.n.) и смежные с ним виды / Б.Ф. Кашменский // Известия Петербургского бот. сада. 1905. Т. 5. № 2. С. 57-65.
2. Киселева К.В. Копеечник украинский (*Hedysarum ucraïnicum* Kaschm.) // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). Москва. 2008. С. 244-245.
3. Володина Н.Г. К флоре меловых обнажений Волгоградской области // Бюллетень МОИП. 1978. Т. 83. Вып. 4. С. 142-148.
4. Володина Н.Г. Флора меловых обнажений Волгоградской области, дис. ...канд. биол. наук. Москва. 1979. 215 с.
5. Володина Н.Г. Флора меловых обнажений Волгоградской области // Флора степей и полупустынь (На примере Нижнего Поволжья). Волгоград. 1982. С. 34-46.
6. Федченко Б.А. Копеечник – *Hedysarum* L. // Флора СССР. Изд-во АН СССР. Москва, Ленинград. 1948. Т. 13. С. 301-318.
7. Васильева Л.И. Род *Hedysarum* L. // Флора Европейской части СССР, том VI, Покрытосеменные, двудольные. Издательство «Наука», Ленинградское отделение. Ленинград. 1987. С. 87-93.
8. Голицын С.В. «Сниженные альпы» и меловые сопки Среднерусской возвышенности // Докл. о работах, предст... канд. биол. наук. Воронеж, 1965. 16 с.
9. Матвеев Д.Е. Копеечник украинский – *Hedysarum ucraïnicum* Kaschm. // Красная книга Волгоградской области. Т. 2: Растения и грибы. Волгоград, 2006а. С. 118.

10. Матвеев Д.Е., Клинова Г.Ю. Копеечник меловой - *Hedysarum cretaceum* Fisch. // Красная книга Волгоградской области. Т. 2: Растения и грибы. Волгоград, 2006б. С. 114.
11. Абрамова Т.И. Растительность меловых обнажений степной части бассейна реки Дона в Ростовской и Волгоградской областях // Ботанический журнал. 1973. Т. 58. № 4. С. 562-570.
12. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 1987. V. 19. P.11-15.
13. Wolfe A.D., Xiang Q.-Y., Kephart S.R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter-simple sequence repeat (ISSR) bands // *Mol. Ecol.* 1998. Vol. 7. N 9. P. 1107-1125.
14. Archibald J.K., Wolfe A.D., Johnson S.D. Hybridization and gene flow between a day and night-flowering species of *Zaluzianskya* (*Scrophulariaceae* s.s., tribe *Manuleeae*) // *Am. J. Bot.* — 2004. Vol. 91. N 9. P. 1333-1344.
15. Шанцер И.А., Войлокова В.Н. Сколько видов, родственных *Rosa majalis*, растет в европейской части России? // *Бот. журн.* 2008. Т. 93. № 11. С. 1690-1704.
16. Шанцер И.А., Вагина А.В., Остапко В.М. Критическое исследование шиповников (*Rosa* L.) заповедника «Хомутовская степь» // *Бюлл. МОИП. Отд. биол.* 2011. Т. 116. Вып. 3. С. 38-48.
17. Супрун Н.А., Шанцер И.А. Генетическая изменчивость видов родства *Hedysarum grandiflorum* Pall. (*Fabaceae*) по данным ISSR маркирования // *Бюл. ГБС РАН.* №4. 2013. С. 42-49.
18. Buntjer J.B. Cross Checker: computer assisted scoring of genetic AFLP data // *Plant & Animal Genome VIII Conference.* San Diego, CA, January 9-12. 2000.
19. Hammer O., Harper D.A., Ryan P.D. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. Vol. 4. N 1. 9 pp.

ON THE EXTENSION OF *HEDYSARUM UCRAINICUM* KASCHM. IN THE VOLGOGRAD REGION

© 2016 N.A. Suprun ¹, I.A. Schanzer ²

¹ Volgograd Regional Botanical Garden

² Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Moscow

On the basis of morphological and genetic studies of rare plant species *Hedysarum ucrainicum* Kaschm. and *H. cretaceum* Fisch. using morphology and ISSR markers indicates, that *H. ucrainicum* should be excluded from the list of rare and endangered species of Volgograd Province, since it does not occur in this area.

Keywords: rare species, *Hedysarum cretaceum*, *Hedysarum ucrainicum*, Volgograd Region, Middle Don, ISSR-method.

Natalia Suprun, Candidate of Biological Science, Head of Scientific Department. E-mail: n.suprun@mail.ru.

Ivan Schanzer, Doctor of Biology, Professor, Leading Research Fellow. E-mail.: ischanzer@gmail.com