

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им.Н.И. Вавилова
Российской академии наук

На правах рукописи

Трифонова Ая Арслановна

**Генетическое разнообразие в популяциях особо охраняемых
видов растений Волгоградской области**

03.02.07 – генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Кудрявцев Александр Михайлович

Москва –2018

Содержание

Содержание.....	2
Введение	5
Глава 1 Обзор литературы	11
1.1 Сохранение генофондов растений.....	11
1.1.1 Генетические процессы в популяциях	11
1.1.2 Выбор оптимальной стратегии сохранения редких видов растений	15
1.2 Молекулярно-генетические маркеры, применяемые для изучения редких видов растений .	17
1.2.1 Биохимические маркеры.....	17
1.2.2 ДНК-маркеры	18
1.2.2.1 Молекулярно-генетические маркеры, основанные на детекции ПЦР-фрагментов	19
1.2.2.2. ДНК-маркеры, основанные на выявлении однонуклеотидных замен	25
1.3 Характеристика объектов исследования.....	27
1.3.1 Бельвалия сарматская (<i>Bellevaia sarmatica</i> Misc.)	27
1.3.2 Лук регелевский (<i>Allium regelianum</i> A.K. Becker ex Iljin)	31
1.3.3. Полынь беловойлочная (<i>Artemisia hololeuca</i> M. Bieb. ex Besser).....	37
Глава 2 Материалы и методы исследования	41
2.1 Исходный материал	41
2.2 Выделение ДНК из растительных тканей	46
2.3 RAPD-анализ.....	47
2.4 ISSR-анализ	48
2.5 AFLP-анализ.....	48
2.6 NBS-профайлинг <i>B. sarmatica</i> и <i>A. regelianum</i>	49
2.7 SSR- анализ меж- и внутривидовой изменчивости <i>A. regelianum</i>	50
2.8 Визуализация результатов амплификации.....	53
2.9 Амплификация и секвенирование участков ядерного и цитоплазматических геномов <i>B. sarmatica</i> и <i>A. regelianum</i>	53
2.10 Статистический анализ данных.....	55
Глава 3 Результаты и обсуждение	57
3.1 Анализ внутри- и межвидовой изменчивости <i>Bellevaia sarmatica</i>	57

3.1.1 Анализ полиморфизма некодирующих последовательностей ядерного и хлоропластного генома <i>B. sarmatica</i>	57
3.1.1.1 Анализ полиморфизма ITS- последовательностей <i>B. sarmatica</i> и родственных видов подсемейства Scilloideae	57
3.1.1.2 Анализ полиморфизма последовательностей хлоропластного генома <i>B. sarmatica</i>	61
3.1.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>B. sarmatica</i> методами мультилокусного анализа	62
3.1.2.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>B. sarmatica</i> с помощью RAPD-анализа	62
3.1.2.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>B. sarmatica</i> с помощью ISSR-анализа	67
3.1.2.3 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>B. sarmatica</i> с помощью AFLP-анализа	72
3.1.2.4 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>B. sarmatica</i> с помощью NBS-профайлинга	77
3.1.3 Сравнение результатов, полученных разными мультилокусными методами анализа .	81
3.1.4 Обсуждение результатов, полученных при изучении генетического разнообразия <i>B. sarmatica</i>	84
3.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>Allium regelianum</i>	89
3.2.1 Анализ полиморфизма некодирующих последовательностей ядерного и хлоропластного генома <i>A. regelianum</i> и родственных видов <i>Allium</i>	89
3.2.1.1 Анализ полиморфизма последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 <i>A. regelianum</i> и родственных видов <i>Allium</i>	89
3.2.1.2 Анализ вариабельности последовательностей хлоропластного генома <i>A. regelianum</i>	94
3.2.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>A. regelianum</i> методами мультилокусного анализа	99
3.2.2.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>A. regelianum</i> с помощью RAPD-анализа	99
3.2.2.2 ISSR-анализ меж- и внутривидовой изменчивости <i>Allium regelianum</i>	106
3.2.2.3 AFLP-анализ меж- и внутривидовой изменчивости <i>Allium regelianum</i> ...	112

3.2.2.4 Анализ меж- и внутрипопуляционной изменчивости <i>Allium regelianum</i> с помощью NBS-профайлинга	119
3.2.3 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>A. regelianum</i> методами монолокусного анализа	127
3.2.4 Сравнение результатов, полученных различными мульти- и монолокусными методами анализа	135
3.2.5 Обсуждение результатов, полученных при изучении генетического разнообразия <i>A. regelianum</i>	138
3.3 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>Artemisia hololeuca</i>	143
3.3.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>A. hololeuca</i> методами мультилокусного анализа.....	143
3.3.1.1 RAPD-анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости <i>A. hololeuca</i>	143
3.3.1.2 ISSR-анализ меж- и внутрипопуляционной изменчивости <i>A. hololeuca</i>	147
3.3.1.3 AFLP-анализ меж- и внутрипопуляционной изменчивости <i>A. hololeuca</i>	153
3.3.2 Сравнение результатов, полученных разными мульти- и монолокусными методами анализа	160
3.3.3 Обсуждение результатов, полученных при изучении генетического разнообразия <i>A. hololeuca</i>	164
Заключение	168
Выводы	170
Список сокращений.....	172
Список литературы.....	174
Приложения	205

Введение

Актуальность темы исследования. Сохранение биологического разнообразия является одной из важнейших проблем современного мира [Конвенция о биологическом разнообразии]. Возрастающее население оказывает огромное давление на планету, и многие виды растений и животных находятся в уязвимом состоянии. Разрушение мест обитания, загрязнение территорий и изменение климата, вырубка, охота, распространение инвазивных видов являются серьезными угрозами для существования многих видов. Вымирание видов происходит почти в 1000 раз быстрее естественной нормы. Около 80 000 видов занесены в Красный список МСОП (Международного союза охраны природы) и около 30% из них находятся под угрозой исчезновения [IUCN Species Programme].

Более 24 000 видов растений занесено в международный список видов, уже исчезнувших или находящихся под угрозой исчезновения [The IUCN Red List of Threatened Species]. Сохранение существующего разнообразия растений очень важно для поддержания стабильности среды обитания и продовольственной и экологической безопасности человека [Конвенция о биологическом разнообразии]. Поэтому в 1999 году, в рамках Конвенции о биологическом разнообразии, началась разработка Программы по глобальной стратегии сохранения растений (Global Strategy for Plant Conservation) [Конвенция о биологическом разнообразии], в 2011 году она была обновлена и действует до 2020 года.

В Конвенции о биологическом разнообразии особое внимание уделяется сохранению и рациональному использованию генетических ресурсов, потому что выживание видов зависит от поддержания достаточного уровня генетического разнообразия внутри и между популяциями. В целом установлено, что редкие виды имеют меньшее генетическое разнообразие, чем широко распространенные, и соответственно они более подвержены угрозе вымирания при изменении условий окружающей среды [Hamrick, Godt, 1996; Алтухов, 2004].

Изучение генетического разнообразия редких видов (межпопуляционного, внутривидового полиморфизма, генетической дифференциации популяций), наряду с исследованиями их биологии и систематики, геоботаническим описанием популяций и определением особенностей их возрастного спектра, выявлением лимитирующих факторов, позволит наиболее полно понять природу и особенности редких видов и в итоге правильно выбрать механизм сохранения. Сохранение множества генетически отличных локальных популяций – это основная задача, позволяющая предотвратить вымирание вида и сохранить его эволюционный потенциал [Hilborn et al., 2003; Luck et al., 2003; Allendorf, Luikart, 2009]. Однако не всегда возможно сохранить все существующие популяции. Чаще всего необходимо выделить

определенные популяции для сохранения или же отобрать образцы для поддержания их в искусственных условиях и/или в генетических банках.

Еще одной задачей природоохранной генетики становится сохранение генетических ресурсов диких сородичей культурных растений. Важно не потерять пул генов, который может быть использован для улучшения культурных растений [Гаевская, 2007; Гончаров, 2008].

Современные молекулярно-генетические методы позволяют определить уровень генетического разнообразия в популяциях и между ними, установить популяционно-генетическую структуру вида, поэтому их применение очень важно при выборе стратегии сохранения редких видов растений.

В последние десятилетия работа по сохранению биоразнообразия и по ведению Красных книг все больше проводится с упором на региональные системы мониторинга, так как особенности антропогенного влияния и возникающие при этом экологические проблемы специфичны для различных ландшафтов [Снегин, Снегина, 2016].

Флора Волгоградской области отличается самобытностью и богатством, а также высокой долей редких видов, которые не встречаются в других регионах России [Малаева, Власов, 2016]. На территории Волгоградской области произрастает 191 редкий вид растений [Красная книга Волгоградской области, 2006], из них 48 занесены в Красную книгу Российской Федерации [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008]. 16 видов растений считаются исчезнувшими на территории Волгоградской области [Красная книга Волгоградской области, 2006]. Волгоградский региональный ботанический сад проводит большую работу по сохранению и воспроизводству редких видов растений области. Сотрудниками сада проводятся мероприятия по ведению учета и кадастра редких видов растений. Основанием для таких работ являются акты и постановления администрации Волгоградской области: Положение о порядке ведения Красной книги Волгоградской области (утверждено постановлением главы администрации Волгоградской области № 981 от 13 октября 2004 г.), Положение о ведении учета редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов, занесенных в Красную книгу Волгоградской области (утверждено Постановлением главы администрации Волгоградской области № 1025 от 8 августа 2008 г.), а также Приказ Комитета природных ресурсов и охраны окружающей среды Администрации Волгоградской области № 87/01 от 15 февраля 2010 г. «Об общих принципах организации мониторинга на территории природных парков и ведения учета редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, занесенных в Красную книгу Волгоградской области, и видов растений, занесенных в Красную книгу Волгоградской области».

Основными задачами ведения учета являются организация мониторинга объектов, находящихся под угрозой исчезновения, создание единой информационной базы, куда включаются объекты растительного мира, нуждающиеся в сохранении, а также обеспечение информацией администрации Волгоградской области для принятия управленческих решений [Агеева и др. 2012 а].

При мониторинге состояния редких видов растений особое внимание уделяется изучению и сохранению генетического разнообразия. Так, в 2010 году в Волгоградской области создан региональный генетический банк редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений, занесенных в областную Красную книгу [Малаева, Власов, 2016]. Мероприятия по изучению генетического разнообразия вносятся в программы по мониторингу таких редких видов растений, как лук регелевский (*Allium regelianum* A.K. Becker ex Iljin, семейство Amaryllidaceae) [Агеева и др., 2012], и бельвалия сарматская (*Bellevallia sarmatica* Misc., семейство Asparagaceae). Эти виды достаточно долго изучаются сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада, они культивируются в искусственных условиях, включены в банки семян, банк *in vitro*. Однако генетические исследования этих видов ранее не были проведены. Кроме того, одним из специфичных для Волгоградской области ландшафтов являются меловые степи, где произрастает множество редких растений, в том числе полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca* M. Bieb. ex Besser, семейство Asteraceae), также включенная в исследование.

Степень разработанности темы исследования. Исследованиям генетических основ сохранения биоразнообразия посвящено множество работ, начиная с прошлого века [Voipio, 1950; Frankel, Bennet, 1970; Soulé, Wilcox; 1980; Frankel, Soulé 1981] по настоящее время [Loeschcke et al., 2013; Hoban, Schlarbaum, 2014; Whiteley et al., 2015]. Исследование генетического разнообразия редких видов растений с помощью различных молекулярных маркеров проводится как отечественными [Боронникова, 2009, 2010, 2012; Бельтюкова, 2009; Михайлова, 2010; Светлакова, 2012; Муллагулов, 2014; Шигапов, 2014; Снегин, 2016 и др.], так и зарубежными исследователями [Hamilton et al., 2007; Rustaiee et al., 2010; del Hoyo et al., 2012; Ma et al., 2013; Ahrens et al., 2017; Atnaf et al., 2017; Kaulfub, Reisch, 2017; Su et al., 2017 и др.]. Изучение генетического разнообразия *A. regelianum*, *B. sarmatica* и *A. hololeuca* проводится впервые.

Целью работы стало изучение генетического разнообразия особо охраняемых видов растений Волгоградской области для разработки эффективных мер по их рациональному сохранению в природных популяциях и *ex situ*.

В задачи исследования входило:

1. провести сбор образцов для исследования, не нарушая численность популяций выбранных видов растений, и создать коллекцию ДНК собранных образцов редких видов растений;
2. провести анализ внутри- и межпопуляционного полиморфизма выбранных видов растений с помощью молекулярно-генетических маркеров;
3. дать оценку внутри- и межпопуляционному разнообразию выбранных видов растений;
4. дать оценку эффективности используемых молекулярных маркеров;
5. разработать и предложить подходы для определения стратегии рационального сохранения редких и исчезающих видов растений на основе молекулярного маркирования.

Научная новизна. Впервые было проведено изучение генетического разнообразия трех редких видов растений Волгоградской области: *Bellevia sarmatica*, *Allium regelianum* и *Artemisia hololeuca* с использованием методов молекулярно-генетического маркирования, таких как RAPD-, ISSR-, AFLP-, SSR-анализ, NBS-профайлинг. Получены первые данные об уровне генетического разнообразия и уровне генетической дифференциации в популяциях изучаемых видов. В ходе работы были впервые установлены и проанализированы нуклеотидные последовательности ядерного (ITS1-5.8S-ITS2) и хлоропластного (межгенные спейсеры *ndhJ-trnL*, *trnC-petN*) генома у образцов *A. regelianum* и *B. sarmatica*. На основе полученных данных был впервые определен уровень внутривидового полиморфизма и уточнен таксономический статус видов *A. regelianum* и *B. sarmatica*. Впервые даны рекомендации по сохранению генофондов изучаемых видов на основе данных генетического анализа.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данная работа продолжает и значительно дополняет собой направление по изучению генетического разнообразия и популяционно-генетических структур редких видов. Проведенное в ходе работы изучение генетического разнообразия трех редких видов растений (*A. regelianum*, *B. sarmatica* и *A. hololeuca*), их популяционно-генетической структуры поможет лучше понять процессы и выявить закономерности, которые приводят к исчезновению видов. Полученные в результате работы данные о генетическом полиморфизме отдельных участков ядерного и хлоропластного геномов *A. regelianum* и *B. sarmatica* могут быть использованы для решения проблем систематики и уточнения вопросов филогении изучаемых видов.

Результаты исследования могут быть использованы для разработки эффективной, научно обоснованной стратегии сохранения *A. regelianum*, *B. sarmatica* и *A. hololeuca*.

Методология и методы исследования. Методология работы разработана в соответствии с поставленными целями и задачами. В работе применяются методы монолокусного (SSR-анализ, анализ нуклеотидных последовательностей отдельных участков ядерного и хлоропластного геномов) и мультилокусного (AFLP-, ISSR-, NBS-, RAPD-анализ) молекулярно-генетического маркирования. Обработка результатов проводится с применением современных статистических программ, разработанных, в том числе и для анализа популяционно-генетических данных.

Положения, выносимые на защиту:

- Все используемые методы молекулярно-генетического маркирования позволили выявить и оценить уровень генетического полиморфизма в популяциях *B. sarmatica*, *A. regelianum* и *A. hololeuca*. Полученные с помощью разных методов результаты в целом сопоставимы (для всех видов), что говорит о достоверности полученных с помощью каждого метода данных и возможности их использования как в комплексе, так и по отдельности. AFLP-анализ стал наиболее эффективным методом для изучения генетического разнообразия трех редких видов.

- Изучаемые виды отличались между собой по уровню полиморфизма. Наиболее высокие показатели внутрипопуляционного разнообразия отмечены для популяций *B. sarmatica*, наименьшие – для популяций *A. hololeuca*.

- Определен уровень генетической дифференциации популяций изучаемых видов. Наименее дифференцированы популяции *A. regelianum*, наиболее – *A. hololeuca*. Была отмечена взаимосвязь между выявленной с помощью молекулярно-генетического анализа группировкой популяций и их географическим положением. Наличие пространственной дифференциации популяций (групп популяций) изучаемых видов и ее степень зависит от типа размножения, характера распределения подходящих местообитаний, и, вероятно, от времени обособления популяций.

- При определении стратегии сохранения *B. sarmatica*, *A. regelianum* и *A. hololeuca* необходимо учитывать полученные в ходе работы данные. Для *B. sarmatica* необходимо сохранить популяции Кумылженского и Калачевского района и любую из популяций Серафимовичского и Клетского районов. В программе по сохранению *A. regelianum* обязательно должны быть представлены популяции, произрастающие на левом (Заволжье) и правом (территория бассейнов рек Дон и Хопер) берегу реки Волга. Для *A. hololeuca* можно рекомендовать сохранять популяции, произрастающие вблизи разных населенных пунктов. Среди популяций, собранных недалеко от одного и того же населенного пункта для сохранения можно выбрать какую-то одну популяцию.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы были представлены автором на молодежной конференции «Популяционная генетика и геногеография: наука и практика» (Москва, 2013), а также на VI и VII Международных научно-практических конференциях «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» (Ялта, 2014, 2016).

Промежуточные и итоговые материалы исследования были представлены на итоговых годовых отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2012-2016 годах. Диссертация прошла апробацию на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

По материалам работы опубликовано четыре печатные работы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Сохранение генофондов растений

В последнее столетие климатические и антропогенные изменения в окружающей среде привели к исчезновению многих видов растений или к серьезному сокращению их географического ареала [O'Grady et al., 2004]. Многие виды растений, которые имели широкое распространение в начале XX века, сильно сократились в численности и впоследствии были обозначены как редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды. От 9 до 34% видов растений будет под угрозой исчезновения в течение следующих десятилетий [The IUCN Red List of Threatened Species].

Первые международные правовые акты в области охраны растений были приняты на первом Конгрессе по охране природы (Париж, 1923 г.). В 1948 году был создан Международный Союз по охране природы и природных ресурсов (МСОП). В 1964 году МСОП создал международные списки находящихся под угрозой растений и животных (Красные Книги). В 1992 году была принята Конвенция о биологическом разнообразии, подписанная 180 странами. С момента вступления Конвенции в силу сохранению биоразнообразия уделяется значительное внимание.

1.1.1 Генетические процессы в популяциях

Основой биологического разнообразия является его генетическая компонента. Генетическое разнообразие в популяции определяется как числом генов с более чем одним аллелем (так называемых полиморфных генов), так и числом аллелей каждого полиморфного гена [Алтухов, 2004]. Существование полиморфного гена приводит к появлению в популяции гетерозиготных особей, получающих от родителей различные аллели. Сокращение генетического разнообразия представляет угрозу для биосферы, поскольку устойчивость воспроизводства природных экосистем и агроэкосистем непосредственно связана с их генетически обусловленным потенциалом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды [Журавлев, 1999]. Виды с низким уровнем генетического разнообразия также имеют низкий уровень потенциальной адаптации к изменяющимся условиям среды [Ellstrand, Elam, 1993].

На генетический полиморфизм популяции влияют несколько процессов: появление мутаций, генетический дрейф, поток генов и естественный отбор. Вероятность появления новых мутаций в природных популяциях достаточно низкая, и их сохранение в популяции также событие редкое. Генетический дрейф [Wright, 1931] воздействует на генетическое разнообразие путем случайного изменения частот аллелей в популяции и снижения генетического разнообразия популяций со скоростью, обратно пропорциональной размеру популяции. Таким образом, генетический дрейф оказывает достаточно слабый эффект на генетический полиморфизм в популяциях большого размера [Фазалова, 2011]. В природных популяциях влияние генетического дрейфа уравнивается потоком генов. Однако для растительных популяций уровень переноса генов зависит от географических расстояний между популяциями, системой их опыления, природными условиями. Частоту определенного аллеля (чаще всего повышающего приспособленность популяции) увеличивает движущий отбор. Балансирующий отбор поддерживает в популяции равновесие частот различных аллелей. Стабилизирующий отбор поддерживает оптимальный уровень гетерозиготности в популяциях в процессе их адаптации к условиям среды [Фазалова, 2011].

Редкие виды растений часто имеют фрагментированный (разорванный) ареал обитания, а их популяции нередко бывают небольшими по площади. Это происходит из-за разрушения мест обитания, экологической сукцессии, изменения климата и других факторов [Young et al., 1993].

Когда численность популяций сокращается, генетический дрейф может привести к уменьшению генетического разнообразия [Lacy, 1987; Ellstrand, Elam, 1993; Frankham, 1996; Fischer, Matthies, 1998; Cole, 2003]. При фиксации аллеля locus становится гомозиготным, за счет чего уменьшается значение показателя ожидаемой гетерозиготности [Cole, 2003].

В дальнейшем это приводит к увеличению доли инбридинга. Инбридинг не меняет частоту аллелей в популяции, он перераспределяет частоты генотипов, увеличивая долю гомозигот и уменьшая долю гетерозигот. Вредные мутации чаще всего находятся в рецессивном состоянии и, таким образом, увеличение доли гомозигот (в том числе по рецессивным аллелям) приводит к инбредной депрессии. Уровень инбредной депрессии зависит от способа опыления растений. Популяции растений-самоопылителей менее уязвимы к последствиям инбредной депрессии, чем популяции перекрестнопыляемых растений [Charlesworth, Charlesworth 1987], однако это не всегда так [Barrett, Kohn, 1991; Holsinger, Gottlieb, 1991]. Уровень инбредной депрессии также связан с размером популяций. Небольшие популяции сильнее страдают от инбредной депрессии, чем большие. Из-за уменьшения эффективности отбора по сравнению с генетическим дрейфом [Hedrick, Miller, 1992] вредные

рецессивные аллели, не устраненные путем отбора, могут закрепиться в популяции случайно. Но с другой стороны, изначально малочисленные популяции могут иметь низкий уровень инбредной депрессии, если вредные мутации подверглись отбору. Но, несмотря на то, что уровень инбредной депрессии может различаться у разных видов и популяций, последствия инбредной депрессии достаточно существенны, чтобы влиять как на отдельную особь, так и на популяцию. Изучение последствий инбредной депрессии в растительных популяциях показывает, что она влияет на продуктивность растений, прорастание семян, выживаемость и устойчивость к стрессам [Keller, Waller, 2002].

Для малых изолированных популяций также характерно накопление «маловредных» мутаций [Lande, 1995; Lynch et al., 1995] и нарушение семенной продуктивности растений в результате уменьшения разнообразия аллелей совместимости [Byers, 1995].

Фрагментация ареала увеличивает пространственную изоляцию растительных популяций, что приводит к уменьшению генного потока между популяциями и усиливает межпопуляционную дивергенцию [Yuong et al., 1996]. Генный поток важен в генетике редких видов особенно, когда существует более чем одна популяция вида, и когда существуют возможности гибридизации с родственными видами [Ellstrand, Elam, 1993]. Интенсивность генного потока зависит от вида растения, сезона, условий произрастания популяций. Размер популяции также может иметь значение. Так, большие популяции продуцируют больше пыльцы/семян, что соответственно увеличивает шансы их переноса в другую популяцию. Ellstrand и Elam, [1993] показали, что между тремя малыми популяциями дикого редиса, находящимися друг от друга за 200-400 метров, нет генного потока, а между популяциями этого же вида большего размера, даже находящимися за тысячу метров друг от друга, генный поток существует.

Все эти причины (генетический дрейф, инбридинг, нарушение генного потока) приводят к уменьшению уровня генетического разнообразия в популяциях редких видов растений. Информации о том, что в популяциях редких видов растений снижены показатели генетического разнообразия, достаточно много. Так, при сравнении процента полиморфных локусов и числа аллелей на полиморфный локус для растений с ограниченным распространением и более распространенных показано, что для редких растений эти показатели оказались ниже [Karron, 1987, 1991]. Мета-анализ исследований, охватывающих 34 рода растений, показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности выше у более распространенных видов, однако такая корреляция не относится к ожидаемой гетерозиготности [Gitzendanner, Soltis, 2000]. Исследование большего числа видов растений (редких и широкораспространенных) показало, что уровень разнообразия (показатель наблюдаемой и

ожидаемой гетерозиготности) популяций редких видов растений заметно снижен по сравнению с широкораспространенными видами [Hamric, Godt, 1989]. Изучение вариативности аллозимных локусов у 57 родов растений – в каждом роде были рассмотрены как редкие, так и широко распространенные виды – показало сильный уровень снижения генетического разнообразия у редких видов растений [Cole, 2003].

Нонпай и Жаскетун [2008] использовали мета-анализ и изучили влияние фрагментации ареала на популяции редких и широкораспространенных видов. В данном исследовании было показано, что процент полиморфных локусов и аллельное разнообразие имели сильную положительную корреляцию с размером популяции, в то время как корреляции между размером популяции и коэффициентом инбридинга выявлено не было. Также авторы выяснили, что генетическое разнообразие видов-самоопылителей было менее подвержено влиянию уменьшения размера популяции, чем у видов перекрестноопыляемых, а популяции широкораспространенных видов так же или даже более подвержены последствиям фрагментации ареала, как и редкие виды [Honnay, Jacquemyn, 2008].

Снижение уровня генетического разнообразия может привести к потере приспособленности популяций к изменяющимся условиям среды [Ellstrand, Elam, 1993; Fischer, Matthies, 1998; Booy et al., 2000; Keller, Waller, 2002; Reed, Frankham, 2003; Johansson et al., 2007]. Положительная корреляция между признаками, связанными с приспособленностью и гетерозиготностью показана для нескольких видов растений [Linhart, Mitton, 1985; Oostermeijer et al., 1995].

Положительная корреляция между приспособленностью и размером популяции также показана для некоторых популяций растений [Menges, 1991b; Lamont, Klinkhamer, Witkowski, 1993; Widen, 1993; Agren, 1996]. Для редкого вида *Gentianella germanica* показана положительная корреляция между уровнем генетического разнообразия и размером популяций, а также числом семян на растении (в естественных условиях произрастания) и числом цветков на растении (в искусственных условиях произрастания) [Fischer, Matthies, 1998]. Leimu с соавторами [2006] обобщили данные исследований с 1987 по 2005 годы, используя мета-анализ, и показали, что средняя корреляция между размером популяции, приспособленностью и генетическим разнообразием достаточно сильная, причем сила и направление корреляции между этими признаками зависят от продолжительности жизни растений и диапазона числа изучаемых популяций [Leimu et al., 2006]. В среднем корреляция этих признаков у популяций редких видов растений была выше, чем у более распространенных. Также авторы отметили, что ожидаемая гетерозиготность, число аллельных вариантов и процент полиморфных локусов

возрастали вместе с увеличением размера популяции, но коэффициент инбридинга от размера популяции не зависел.

Однако приведенные выше закономерности не всегда верны [Ouborg et al., 2006]. Для многих редких видов растений уровень генетического разнообразия оказывается достаточно высоким [Lewis, Crawford, 1995; Prohens et al., 2007; Perez-Collazos et al., 2008; Mucciarelli et al., 2014]. Умеренный или высокий уровень полиморфизма и низкий уровень популяционной дифференциации у редких видов растений авторы связывают с недостаточностью времени для снижения уровня генетического разнообразия вследствие сокращения размера популяции и изоляцией; с адаптацией генетической системы к малому размеру популяции; с интенсивным генным потоком; с адаптационным ответом на недавние изменения мест обитания, а также с эффектом основателя. Также в некоторых случаях фрагментация ареала приводит к увеличению генного потока среди остатков популяций, но тем самым нарушает локальную генетическую структуру [Young et al., 1993]. Инбредная депрессия – это параметр, более зависящий больше от генотипа, чем от размера популяции. [Ouborg et al., 2006]. Также не всегда отвечают этим закономерностям популяции исконно реликтовых видов. Так, например, большая часть вредных мутаций в таких популяциях могла подвергнуться действию отбора.

К настоящему времени уже накопилось довольно много знаний в области генетики редких видов растений, выявлены генетические процессы, происходящие в популяциях редких видов. Однако имеющиеся сведения не всегда однозначны. Поэтому изучение генетического разнообразия и популяционно-генетической структуры редких растений поможет лучше понять процессы и выявить закономерности, которые приводят к исчезновению видов.

1.1.2 Выбор оптимальной стратегии сохранения редких видов растений

Еще одна важная задача, которую помогает решить изучение генетического разнообразия редких видов, это выработка оптимальной стратегии сохранения этих видов [Holsinger, 1991; Hamrick and Godt, 1996; Francisco-Ortega et al., 2000; Qiu et al., 2006; Allendorf, Luikart, 2009].

МСОП определила три основных уровня разнообразия, на которых должно происходить сохранение – гены, виды, экосистемы [Allendorf, Luikart, 2009]. Сохранение генофондов при этом играет важнейшую роль для долговременного существования вида.

На территориях с богатой флорой и уникальными природными условиями необходимо сохранить все сообщество растений. Этот подход наиболее успешен для долгосрочного сохранения биоразнообразия. Поэтому выделяют территории с высокой концентрацией редких,

уникальных видов (ядровые зоны) и присваивают им статус особо охраняемой природной территории [Современные методы..., 2011].

На видовом уровне сохраняют отдельные популяции или группы популяций. В пределах вида сохранение естественного множества генетически отличных локальных популяций – основная задача, позволяющая сохранить его эволюционный потенциал и предотвратить вымирание [Hilborn et al., 2003; Luck et al., 2003; Allendorf, Luikart, 2009]. Но, при условии ограниченных ресурсов и возможностей для сохранения всех природных популяций, усилия по сохранению должны быть сосредоточены на выборе отдельных популяций. Определить те популяции, которые нужно сохранить в первую очередь, не так просто. Преимущество для сохранения должно быть отдано наиболее генетически разнообразным популяциям, в которых сохраняются аллели, специфичные для этой местности (те аллели, которые чаще встречаются на ограниченной территории, могут показывать, что эти генотипы наиболее адаптированы к специфическим условиям среды) [Frankel et al., 1995]. Распределение генетического разнообразия также играет важную роль в сохранении вида [Soule, Simberloff, 1986; Barrett, Kohn, 1991; Millar, Libby, 1991; Ge et al., 1998]. Если генетическое разнообразие внутри популяций будет больше, чем между популяциями, то меньшее количество популяций необходимо для сохранения и поддержания общего уровня разнообразия в географическом ареале данного вида. Если же генетическое разнообразие между популяциями будет выше внутривидового, то необходимо сохранить большее количество популяций [Szczenińska et al., 2005].

Многие из редких видов достигли критического уровня численности, и поэтому сохранения популяций и мест их обитания недостаточно и для предотвращения вымирания данных видов необходимым является поддержание и размножение в искусственных условиях (культивация в ботанических садах с последующей реинтродукцией, создание банков семян, меристем, пыльцы, а также ДНК-банков) [Современные методы..., 2011]. Сбор материалов надо организовать таким образом, чтобы субпопуляционная структура была максимально полно охарактеризована, также следует обратить внимание на специфические генотипы [Алтухов, 2004].

Также при определении популяций (субпопуляций, определенного числа образцов) для сохранения используют понятие «единица сохранения» или «единица запаса». Ryder [1986], ввел понятие эволюционно значимой единицы, основываясь на генетической структуре и динамике популяций, Moritz [1994] описал Единицу для сохранения, основываясь на аллельных данных, Riddler и Hafner [1999] описывают фундаментальную географическую и эволюционную единицу, основываясь на биогеографических данных и данных популяционной

динамики. Maes с соавторами [2004] описал функциональную единицу сохранения, основываясь на распространении, экологии и расселении видов, Caujapé-Castells и Pedrola-Monfort [2004] ввели понятие важная генетическая единица для сохранения, основанное на распределении как обычных, так и редких аллелей. Животовский [2016] предлагает двухступенчатый подход к изучению популяционной структуры вида, основанной на использовании экологических, географических и генетических данных. Сначала популяции группируют в эко-географические единицы, а затем эти единицы тестируют на соответствие генетическим данным путем сравнения генетической дифференциации между популяциями внутри одной единицы и между популяциями разных эко-географических единиц.

Необходимы методы, которые бы позволили охарактеризовать генетическую структуру популяции, создать «генетический паспорт» каждого отдельного индивидуума и, таким образом, более объективно оценивать своеобразие генофондов популяций, а затем отбирать и сохранять популяции/образцы, выделять единицы запаса [Боронникова, 2009]. В качестве таких методов можно использовать молекулярно-генетические маркеры [Hamrick, Godt 1996; Neel, Ellstrand 2003; Nybom, 2004]. Они могут дать ценную информацию о генетическом разнообразии и генетической структуре популяций растений, с их помощью можно создавать генетические паспорта редких видов, что упрощает процесс отбора в коллекции и генные банки.

1.2 Молекулярно-генетические маркеры, применяемые для изучения редких видов растений

В настоящее время молекулярно-генетические маркеры очень востребованы для изучения генетического разнообразия в популяциях редких видов растений.

1.2.1 Биохимические маркеры

Биохимические маркеры основаны на полиморфизме белков, который выявляется чаще всего методом электрофореза. Биохимическая наследственная изменчивость хорошо изучена у более чем 2000 различных видов — от микроорганизмов до человека [Алтухов, 1995]. Как правило, особи внутри одной популяции отличаются друг от друга особенностями строения определенных белков, и такие отличия передаются неизменными от родителей потомкам. Поэтому эти маркеры активно применялись и применяются в популяционных исследованиях, особенно с конца 1960-х годов, когда были созданы высокоразрешающие методы

электрофореза белков [Алтухов, 2003]. Генетическое разнообразие в популяциях редких видов растений также можно оценивать с помощью биохимических маркеров. Так, с помощью биохимических маркеров был проанализирован генетический полиморфизм в популяциях редких видов растений, таких как *Antirrhinum charidemi* и *A. valentinum* [Mateu-Andres, Segarra-Moragues, 2000], *Iris cristata* [Hannan, Orick, 2000], *Swertia perennis* [Lienert et al., 2002], *A. microphyllum* [Torres et al., 2003], *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* [Neel, Ellstrand, 2003], а также 69 эндемиков Канарских островов [Francisco-Ortega et al., 2000].

Однако биохимические маркеры имеют ряд недостатков: невысокая степень полиморфизма; ограничение анализируемой части генома (только гены, кодирующие ферменты и запасные белки) [Fritsch, Rieseberg, 1996], наличие онтогенетической, тканевой специфичности [Конарев и др., 2000], потенциальная чувствительность к условиям окружающей среды и условиям развития [Smýkal et al., 2008].

Поэтому в настоящее время наиболее популярными стали ДНК-маркеры. Их использование позволяет идентифицировать полиморфизм на уровне генотипа, а не на уровне продуктов генов, как белковые маркеры. Главными преимуществами ДНК-маркеров являются: их огромное количество в геноме; возможность анализировать сразу множество частей генома; их независимость от исследуемой ткани, стадии роста и взаимодействия генотип-среда [Lombard et al., 2001; Smýkal et al., 2008].

1.2.2 ДНК-маркеры

ДНК-маркеры можно разделить на несколько групп в зависимости от метода анализа:

- 1) ДНК-маркеры, основанные на гибридизации: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)-маркеры, VNTR (Variable Number Tandem Repeat)-маркеры;
- 2) ДНК-маркеры, основанные на детекции ПЦР-фрагментов: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) маркеры и др.);
- 3) ДНК-маркеры, основанные на выявлении однонуклеотидных замен: SNP (Single-nucleotide polymorphism), детектируются различными методами, в том числе и с помощью секвенирования
- 4) Маркеры, основанные на ДНК-чипировании: DArT (Diversity Arrays Technology) и др.

В настоящем исследовании мы применяли второй и третий тип маркеров, т.к. они являются простыми в исполнении, а некоторые из них не требуют больших материальных затрат, что важно при анализе больших выборок.

1.2.2.1 Молекулярно-генетические маркеры, основанные на детекции ПЦР-фрагментов

Данный тип маркеров можно разделить на монолокусные и мультилокусные. Мультилокусные молекулярно-генетические маркеры позволяют быстро обнаружить полиморфизм сразу большого числа локусов по всему геному, а также чаще всего не требуют дополнительных знаний о генетике объекта, что является преимуществом при работе с малоизученными видами растений. Монолокусные маркеры анализируют лишь определенные локусы в геноме и в большинстве случаев необходима предварительная работа по разработке праймеров.

Среди мультилокусных маркеров в данной работе применялись RAPD-, ISSR-, AFLP-, NBS-маркеры.

RAPD-маркеры (Random Amplified Polymorphic DNA) [Williams et al., 1990]. Суть метода заключается в амплификации фрагментов ДНК с использованием случайного короткого праймера, обычно длиной 10-11 нуклеотидов. При электрофоретическом разделении амплифицированных продуктов образуются дискретные продукты, которые представляют собой анонимную, как правило, уникальную последовательность ДНК. Методика выявления RAPD-маркеров проста в техническом исполнении, для успешного применения RAPD не требуется знаний о последовательности ДНК [Гостимский и др., 2005], поэтому он может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально при работе с малоизученными видами. Маркеры наследуются доминантно. К недостаткам метода следует отнести низкую воспроизводимость результатов, обусловленную повышенной чувствительностью к условиям реакции, но при должной оптимизации протокола метод RAPD отличается быстротой, удобством и хорошо подходит для анализа полиморфизма генома растений [Дорохов, Клоке, 1997].

Метод RAPD успешно используется для анализа полиморфизма редких видов растений. Так, например, 30 популяций редкого эндемичного растения Центральной Европы *Saxifraga rosacea* subsp. *sponhemica* были изучены с помощью RAPD-анализа [Walisch et al., 2015]. Проведенный анализ позволил выявить уровень полиморфизма в популяциях, наличие изоляции расстоянием. При изучении 264 растений из семи популяций *Fritillaria tubiformis* subsp. *moggridgei* с использованием 8 RAPD-праймеров был выявлен достаточно высокий уровень полиморфизма, большая часть которого приходится на внутрипопуляционное разнообразие (82,9%) [Mucciarelli et al., 2014]. Разнообразие выборки растений *Scirpus ancistrochaetus* из 17 популяций, расстояние между которыми составляло от 4 до 250 км было проанализировано с помощью RAPD-анализа и SNP-маркеров [Cipollini et al., 2013]. И по

результатам RAPD-анализа и по обнаруженным SNP, была выявлена одна популяция, наиболее отдаленная от всех. Эта популяция была предложена как приоритетная при определении стратегии сохранения вида. Была показана корреляция между генетическими и географическими расстояниями, а также локусы и однонуклеотидные замены, специфичные для популяций и групп популяций [Cipollini et al., 2013]. RAPD-анализ был также успешно применен для анализа разнообразия редких видов растений *Solanum conocarpum* и *S. polygamum* с Виргинских островов [Stanford et al., 2013], природных популяций *Rauvolfia serpentina* [Nair et al., 2014], а также редкого вида *Euryale ferox*, собранных на территории Индии [Kumar et al., 2016]. Для всех изученных видов было оценено внутривидовое разнообразие и межвидовая дифференциация и даны рекомендации по сохранению.

ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats). Данный метод основан на анализе полиморфных участков ДНК, амплифицированных между микросателлитами [Zietkiewicz et al., 1994]. Полимеразная цепная реакция проводится с олигонуклеотидными праймерами, состоящими из повторяющихся единиц и «якоря» на 3'- или 5'- конце. Амплифицируемые фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. Повторяющиеся единицы могут состоять из 1-5 пар нуклеотидов. Результатом ПЦР с ISSR-праймерами является набор межмикросателлитных фрагментов ДНК разной длины. Метод не требует предварительного знания последовательности анализируемой ДНК [Nagaoka et al., 1997, Bornet, Branchard, 2001]

ISSR-анализ был применен для исследования генетического разнообразия 10 популяций редкого вида *Rhodiola chrysanthemifolia* [Xia et al., 2007]. Уровень полиморфизма в популяциях варьировал от 21,97% до 48,8%, большая часть изменчивости приходилась на межвидовые различия. Причиной такой дифференциации популяций является географическая и генетическая изоляция в условиях высокогорья. Исходя из этого, авторы предлагают для успешного сохранения вида сохранять как можно большее количество популяций. С помощью RAPD и ISSR маркеров было изучено разнообразие очень редкого растения *Pinus squamata*, уровень гетерозиготности, показанный с использованием ISSR-анализа, был равен 0,029 [Zhang et al., 2005]. Такой низкий уровень разнообразия можно объяснить тем, что ранее популяция могла подвергнуться негативному эффекту «бутылочного горлышка». Генетическое разнообразие популяции *P. squamata*, произрастающей на юго-западном склоне выше, чем у популяции северо-восточного склона, что, возможно связано с более разнообразными условиями среды на юго-западном склоне [Zhang et al., 2005]. Также с использованием ISSR-анализа проанализировано генетическое разнообразие редких видов растений *Ammopiptanthus mongolicum* и *A. nanus* [Ge et al., 2005], эндемика Северных Аппенин

(Италия) *Primula apennina* [Crema et al., 2009], редкого лекарственного растения *Chimonanthus grammatus* [Jiang et al., 2011], и 10 популяций реликтового растения проломника Козо-Полянского (*Androsace kozo-poljanskii*) [Снегин Э.А. и др., 2016].

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-маркеры [Vos et al., 1995]. Эта технология позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции и небольшими инделями внутри рестрикционного фрагмента [Mueller, 1999]. Он основан на избирательной амплификации фрагментов, получаемых при рестрикции геномной ДНК. Для этого ДНК расщепляется при помощи двух разных ферментов рестрикции. Далее специфичные синтетические двухцепочные адаптеры для каждого сайта рестрикции сшиваются с полученными фрагментами ДНК. Затем эти фрагменты амплифицируют, используя праймеры, комплементарные последовательности адаптера и сайту рестрикции и несущие дополнительно одно или более случайно выбранных оснований на 3'-концах [Vos et al., 1995]. Набор полученных фрагментов зависит от рестриктаз и случайно выбранных нуклеотидов на 3'-концах праймеров. Для разделения фрагментов обычно используют полиакриламидный гель. Получаемый спектр высокополиморфен и хорошо воспроизводим. Для постановки AFLP-анализа не требуется знания последовательности ДНК изучаемых объектов. Маркеры наследуются доминантно.

AFLP-анализ часто применяют для изучения генетического разнообразия редких видов растений. Например, с помощью данного метода было проанализировано генетическое разнообразие эндемика Новой Зеландии *Hebe speciosa* [Armstrong, Lange, 2005], редких растений Китая *Cycas fairylakea* [Jian et al., 2006] и *Disanthus cercidifolius* subsp. *longipes* [Yu et al., 2014], единственных оставшихся популяций *Phyllostegia stachyoides* и *Melicope zahlbruckneri* на Гавайях [Raji, Atkinson, 2013], редкого растения тропических лесов Мадагаскара *Bulbophyllum occultum* [Jaros et al., 2016]. В каждом исследовании был установлен уровень генетического разнообразия популяций, а также степень их дифференциации. С помощью AFLP-маркеров были изучены пять популяций *Solanum vespertilio* и три популяции *Solanum lidii*, произрастающих на островах Канарского архипелага [Prohens et al., 2006]. Несмотря на ограниченность района произрастания и небольшой размер популяций *S. vespertilio* и *S. lidii*, они имеют достаточно высокий уровень полиморфизма, что авторы связывают с тем, что количество растений в них было больше в недавнем прошлом, или же с тем, что существует поток генов между популяциями. Авторы считают, что если численность популяций этих видов опустится ниже «минимальной жизнеспособности популяции», то это разнообразие уменьшится через несколько поколений, поэтому необходимо сохранять *S. vespertilio* и *S. lidii* на уровне *ex situ* и *in situ* (т.к. имеется небольшое число популяций и небольшое число растений

в них). Высокий уровень генетического разнообразия был показан для редкого степного вида *Boleum asperum* с помощью AFLP-анализа [Perez-Collazos et al., 2008], и авторы связывают это с тем, что геном изучаемого вида полиплоидный, а также с адаптационным ответом на недавние изменения мест обитания человеком. На базе полученных данных были применены несколько подходов отбора популяций для сохранения [Perez-Collazos et al., 2008].

NBS (Nucleotide Binding Site)-профайлинг – один из методов анализа полиморфизма последовательностей семейства генов устойчивости (R-генов, resistance genes, RGA). Метод основан на специфической амплификации фрагментов ДНК с помощью праймеров, один из которых комплементарен консервативной последовательности NBS-домена R-генов, второй – последовательности адаптера, который лигирован к фрагментам рестрикции геномной ДНК [van der Linden et al., 2004].

Семейство R-генов устойчивости включает гены, кодирующие белки, которые синтезируются в ответ на атаку фитопатогенов. Большинство генов этого семейства относятся к классу NBS-LRR-генов. Гены этого класса содержат нуклеотид-связывающий домен (nucleotide binding site, NBS) и домен, содержащий обогащенный лейцином повтор (leucine rich repeat, LRR) [van der Linden et al., 2004]. В NBS-домеене имеется несколько высоко консервативных последовательностей: Р-петля, киназа 2, GLPL и др. [Saraste et al., 1990; Meyers et al., 1999]. К этим консервативным мотивам и подбирают праймеры для проведения NBS-профайлинга. Учитывая универсальность применяемых праймеров, этот метод можно применять и для исследования растений, геном которых почти не изучен.

Данный метод в основном используют для анализа разнообразия генов устойчивости у культурных растений, таких как картофель [Brugmans et al., 2008], пшеница [Mantovani et al., 2006], яблоня [Савельева и др., 2016], и др. Однако метод NBS-профайлинга позволяет исследовать потенциально адаптивно-значимые фрагменты генома, вовлеченные в адаптивные процессы (устойчивость) и подверженные давлению отбора. Поэтому его интересно применить для изучения популяций редких видов растений, чтобы оценить разнообразие генов устойчивости в популяциях, а также сравнить с некоторыми представителями культурных видов.

К группе мультилокусных маркеров также относятся маркеры на основе LTR-ретротранспозонов: SSAP (Sequence-specific amplification polymorphism), REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism), IRAP (Inter-retrotransposon-amplified-polymorphism) [Waugh et al., 1997; Каледарь, 1999]. Данная группа маркеров имеет большую информативность [Pearce et al., 1999], но для их применения необходимо знать нуклеотидную последовательность ретротранспозона или последовательность его LTR-области. Поэтому чаще

всего данный подход используют для хорошо изученных видов растений [Tam et al., 2004; Kopovalov et al., 2010; Melnikova et al., 2012]. Однако есть исследования, где эти молекулярно-генетические маркеры применяются для изучения редких видов растений *Adenophora lilifolia* [Боронникова, Нечаева, 2012], *Adonis sibirica* и *A. vernalis* [Боронникова, 2009].

Среди монолокусных маркеров в данной работе были использованы SSR-маркеры.

SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats, SSR) – это короткие tandemные повторы нуклеотидных мотивов [Litt, Luty, 1989]. Данные мотивы содержат от одного до десяти нуклеотидов в повторяющейся единице. SSR-метод включает в себя проведение ПЦР с праймерами, фланкирующими короткий микросателлитный повтор. Полиморфизм возникает из-за разного числа tandemных повторов микросателлита, вероятно, возникающих из-за «проскальзывания» репликации и/или неравной рекомбинации [Burstin et al., 2001]. Важной особенностью микросателлитов является то, что они быстро эволюционируют, что приводит к появлению аллелей с различным количеством повторяющихся единиц. Кроме того, количество SSR-локусов в растительном геноме велико [Condit, Hubbell, 1991]. Также микросателлиты наследуются по кодоминантному типу, что удобно для выявления гетерозигот [Календарь и др., 2002]. Все это делает их очень перспективными при использовании в качестве молекулярных маркеров [Paniego et al., 2002; Nguyen, Wu, 2005]. Однако для создания SSR-маркеров необходимо подбирать праймеры к уникальным последовательностям ДНК, фланкирующим микросателлитный повтор, что требует предварительного знания их нуклеотидной последовательности.

Несмотря на сложности в создании этих маркеров, они нашли широкое применение для оценки генетического разнообразия редких видов растений. Так, с помощью микросателлитных маркеров было изучено генетическое разнообразие 29 популяций *Pulsatilla patens*, очень редкого вида в Европе [Szczecinska et al., 2015]. В результате исследования был выявлен низкий уровень генетического разнообразия и высокий уровень инбридинга в популяциях этого вида. Высокий уровень инбридинга авторы связывают с тем, что изучаемый вид самоопылитель, а также с тем, что за последние 50 лет численность популяций сильно сократилась. Также с помощью SSR-маркеров было проанализировано 118 растений (из 7 популяций) *Susac simplicipinna*, исчезающего вида Китая [Feng et al., 2014]. Было проанализировано 16 SSR-локусов, а также полиморфизм участков хлоропластной ДНК и района ITS4-ITS5, выявлен высокий уровень разнообразия внутри вида и высокий уровень дифференциации популяций. Было показано, что популяции *S. simplicipinna* испытывали сокращение в численности во время последнего ледникового периода, и, скорее всего, наблюдаемый ареал обитания *S. simplicipinna* – это рефугиум. В дальнейшем данный вид не вышел за пределы рефугиума. 247 растений из 11

популяций находящегося под угрозой исчезновения растения, эндемика Тибетского нагорья *Isoetes hypsophila*, были проанализированы с использованием 10 микросателлитных локусов [Li et al., 2013]. Авторы изучили генетическую структуру популяций и предположили, что выявленная генетическая структура сложилась в результате ограниченного генного потока, связанного с расчлененностью ландшафта, эффекта «бутылочного горлышка», возникшего в результате изменения уровня подземных вод в месте обитания, а также оставлением и перезаселением мест обитания во время ледникового периода. Выделены четыре единицы сохранения в четырех географических регионах. Внутри этих единиц первоочередное значение имеют популяции с высоким уровнем генетического разнообразия. Сходные причины генетической дифференциации популяции *Borderea chouardii* выявлены в ходе изучения ее генетического разнообразия [Segarra-Moragues et al., 2005]. *B. chouardii* – реликтовое двудомное растение, размножающееся строго генеративно. Популяция этого вида произрастает в довольно труднодоступных местах известнякового утеса предперинейских хребтов (Испания). Растения в популяции разделены на две группы, располагающиеся в верхней и нижней частях утеса. С помощью SSR-маркеров показано сильное отклонение от случайного распределения аллелей внутри этих групп и соответственно их генетическая подразделенность. Эта дифференциация возникла в результате генетического дрейфа и изоляции, которые вызваны эффектом «бутылочного горлышка» (во время ледникового периода) и неэффективной системой распространения пыльцы соответственно. С помощью SSR-анализа было изучено разнообразие *Acer yangbiense* – эндемичного вида клена в Китае, относящегося к видам с очень малой численностью популяций, последние исследования описывают только пять растений [Yang et al., 2015]. В исследование были взяты все известные растения, а также растения, сохраненные в банке семян. Авторы выяснили, что лишь одно из существующих в диком виде растений было связано с растениями, находящимися в банке семян. Генетическое разнообразие в природной популяции *A. yangbiense* было немного выше, чем у искусственно сохраняемых растений, но меньше, чем у других долгоживущих растений [Nybom, 2004]. Было показано, что необходимо сохранить все растения этого вида, не допустить их изоляции, а также ввести все растения в культуру *in vitro* [Yang et al., 2015]. Кроме того, с помощью микросателлитных маркеров было проанализировано генетическое разнообразие исчезающего тропического растения *Swietenia humilis* [White, Powell, 1997]; популяций широко распространенного на территории Бразилии, но уязвимого вида тропических деревьев *Caryocar brasiliense* [Collevatti et al., 2001]; популяций редкого вида подсолнечника *Helianthus verticillatus* [Ellis et al., 2006]; ценного лекарственного растения, редкого вида Китая *Phellodendron amurense* [Yang et al., 2016]; сохранившихся в

Италии популяций дуба македонского *Quercus trojana* [Carabeo et al., 2016]; эндемика Марокко и Юга Испании *Origanum compactum* [Aboukhalid et al., 2017].

Кроме SSR-маркеров, к группе монолокусных маркеров относятся STS-маркеры (Sequence Tagged Sites) [Olson et al., 1989], EST-маркеры (Expressed Sequence Tags) [Adams et al., 1991], SCAR-маркеры (Sequence Characterized Amplified Region) [Kesseliet. al., 1992], CAPS-маркеры (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) [Konieczny, Ausubel, 1993]. Все эти маркеры требуют предварительной разработки, поэтому нечасто применяются для малоизученных видов.

1.2.2.2. ДНК-маркеры, основанные на выявлении однонуклеотидных замен

В качестве метода детекции SNP-маркеров в данной работе использовано прямое секвенирование интересующего участка генома. В качестве таких участков были выбраны последовательности ядерного и цитоплазматического геномов. В настоящее время для оценки межвидовой и внутривидовой вариабельности, а также уточнения филогении и установления таксономической структуры различных растений часто используются нуклеотидные последовательности ядерного и хлоропластного генома. В ядерном геноме с этой целью часто используют последовательность ядерного рибосомального оперона ITS1-5.8S-ITS2 [Feliner, Rossello, 2007], а в хлоропластном геноме – межгенные спейсеры [Glegg, Zurawski, 1992].

ITS1-5.8S-ITS2. Рибосомальные гены в ядерном геноме представляют собой единый кластер ядерных генов, которые содержат сотни tandemно расположенных повторов. Каждый кластер состоит из генов 18S, 5.8S и 26S рРНК, внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2), расположенных по обе стороны от гена 5.8S рРНК, и внешних транскрибируемых спейсеров (ETS1 и ETS2) [Alper et al., 2011]. Наиболее часто используются для исследований участки внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, т.к. они характеризуются значительным полиморфизмом и часто отличаются у близкородственных видов [Baldwin et al., 1995]. Преимущество участка ITS1-5.8S-ITS2 состоит также в его небольшом размере и наличии стандартных праймеров для его амплификации [White et al., 1990].

Межгенные спейсеры хлоропластного генома. Пластидный геном высших растений представлен кольцевой молекулой ДНК, состоящей из двух инвертированных повторов (IRa и IRb), которые разделяют эту молекулу на два уникальных региона – большой и малый (LSC и SSC). Для филогенетических исследований применяются как хлоропластные гены, так и межгенные спейсеры и интроны [Glegg, Zurawski, 1992]. Межгенные спейсеры и интроны более вариабельны, быстро эволюционируют и поэтому чаще используются для анализа филогенетических отношений на низких таксономических уровнях [Gielly, Taberlet, 1994;

Muller et al., 2006], и даже для анализа полиморфизма внутри и между популяциями одного вида [Soltis et al., 1992]. Кроме того, изучение полиморфизма хлоропластной ДНК очень полезно для реконструкции филогении на уровне вида, для определения путей исторической реколонизации вида. Такие исследования возможны благодаря материнскому наследованию хпДНК у большинства покрытосеменных [Fujii et al., 2002; Newton et al., 1999].

Последовательности ITS-спейсеров и межгенных спейсеров хлоропластной ДНК успешно применяются и для изучения внутривидового разнообразия, в том числе и редких видов растений. Так, участок межгенного спейсера *trnL-F* использован для изучения генетического разнообразия популяций редкого вида *Rheum tanguticum* [Wang, Li, 2016]. Для оценки внутри и межпопуляционного разнообразия редкого вида лука *Allium munzii* были использованы два участка хлоропластной ДНК – межгенный спейсер *rpL32-trnL* и интрон *rpoC1* [Mashayekhi, Columbus, 2015]. Выявлена сильная генетическая дифференциация между изучаемыми группами популяций, а внутри этих групп различия были минимальны, отмечено 12 гаплотипов. Одна группа популяций чаще всего была представлена одним гаплотипом. Гаплотипы, общие для нескольких групп популяций, практически не выявлены. Два участка хпДНК (межгенный спейсер *trnL-F*, интрон *rps16*), а также участок ядерной ДНК (ITS) были использованы для оценки внутривидового разнообразия, а также выяснения филогеографической истории *Allium wallichii* – эндемика Восточных Гималаев [Huang et al., 2014]. Детектировано 33 гаплотипа и 25 ITS-риботипов, а также высокий уровень дифференциации, большинство гаплотипов/риботипов специфичны для определенной популяции, что, вероятно, связано с ограниченным генным потоком из-за географической изоляции. В популяциях Сино-Тибетских гор разнообразие гаплотипов больше, чем в популяциях Гималаев и Южно-Китайских гор, и авторы делают предположение, что Сино-Тибетские горы являются центром дивергенции, которая произошла между средне-поздним плиоценом и ранним четвертичным периодом. Для составления эффективной программы по сохранению исчезающего вида *Primula sieboldii* в Японии был изучен внутривидовой полиморфизм последовательностей хлоропластной ДНК [Honjo et al., 2004]. Показано, что выделенные генотипы приурочены к определенному географическому региону, поэтому авторы предлагают тщательно планировать программы по сохранению, в частности аккуратно относиться в пересадке растений из одного региона в другой, чтобы не нарушить местный генофонд. Девять последовательностей хпДНК (межгенные спейсеры и интроны), а также последовательность ITS были изучены у эндемичного вида Эфиопии *Lobelia rhynchopetalum* [Geleta, Bryngelsson, 2012]. На основании проведенных исследований был оценен уровень

внутривидового полиморфизма, а также уровень дифференциации популяций *L. rhynchopetalum*.

Также нуклеотидные последовательности ядерного и хлоропластного генома были использованы для оценки уровня генетического разнообразия и дифференциации таких редких растений, как *Caulanthus amplexicaulis* var. *barbarae* (эндемик серпентиновых почв Америки) [Pepper, Norwood, 2001], *Lychnophora ericoides* (эндемик Бразилии, произрастающий на кварцевых отложениях и песчаных почвах) [Collevatti et al., 2009], *Rhodiola alsia* (эндемик Тибетского нагорья) [Gao et al., 2012].

Исследование нуклеотидных последовательностей ядерной и хлоропластной ДНК применяется в исследованиях редких видов растений и как инструмент для анализа филогенетических отношений, т.к. чаще всего таксономическое положение многих редких видов растений неясно [Gómez-Gómez et al., 2012].

1.3 Характеристика объектов исследования

1.3.1 Бельвалия сарматская (*Bellevaia sarmatica* Misc.)

Бельвалия сарматская (или сарматский гиацинт) – *Bellevaia sarmatica* Misc. (Рисунок 1.1). Относится к семейству Спаржевые (Asparagaceae).



Рисунок 1.1. Вшенный вид *Bellevaia sarmatica* [Красная книга РСФСР (растения), 1989].

Ботаническое описание. *Bellevaia sarmatica* – многолетнее травянистое луковичное растение 30-40 см высотой, с 3-7 прикорневыми, широкими, ланцетными, по краю хрящевыми

реснитчатыми, темно-зелеными листьями. Луковица крупная, овальная, до 5-6 см в диаметре, находится на глубине 20-25 см и потому практически не страдает при выпасе скота. Соцветие – кисть конической формы, многоцветковая, продолговато-овальная. Цветки на длинных цветоножках, от грязно-фиолетового до коричневого цвета, при цветении цветоножки прямостоячие, при плодах – горизонтально отклоненные [Лозина-Лозинская, 1935]. Околоцветник сросшийся, трубчато-колокольчатый, с прямыми зубцами, без перехвата в зеве. Шесть тычинок расположены в один ряд и прикреплены к зеву околоцветника. Завязь трехгнездная, с продолговатым столбиком и притупленным рыльцем. Плод – трехстворчатая коробочка, при созревании плодов соцветие образует перекасти-поле. Семена гладкие, с сизоватым налетом. Цветет в мае. Цветение наблюдается не каждый год [Литвинская и др., 2016]. Размножение семенное. Во время плодоношения образует форму «перекасти-поле» [Литвинская, Мордак, 2007]. Прорастание семян растянуто с осени до весны. Онтогенез длительный, виргинильно-ювенильной жизненной фазы может длиться 28 месяцев [Литвинская, Мордак, 2007].

Экологические особенности. *B. sarmatica* – весенний эфемероид. Геофит. Светолюбивое растение, мезофит.

Произрастает на опустыненных полынно-типчаковых целинных, залежных и каменистых степях; на склонах степных балок на глинистых и солонцеватых почвах; в искусственных лесополосах; на опушках кустарниковых зарослей.

Распространение. В России растет на юго-востоке Европейской части: в южных районах Воронежской области, в Ростовской области (в районе Миллерово, в низовьях Дона от Новочеркасска до Ростова, на крайнем юго-востоке и по побережью Азовского моря), в Волгоградской области (в среднем течении р. Медведица и на правом берегу Дона), Западном, Северо-западном Закавказье, Горном Крыму. Основная часть ареала вне России — степи Украины (Причерноморье), Молдавия и Восточная Румыния, Болгария, Турция, Северный Иран.

Вид маркирует сохранившиеся участки южных понтических степей [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008].

В пределах Волгоградской области *B. sarmatica* известна в Донской излучине и по правобережью р. Хопра, находясь здесь на восточном пределе распространения [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008]. Известны местонахождения: балки Красная и Грушевая напротив г. Калача-на-Дону; хут. Перелазовский и урочище Окопы в Серафимовичском р-не. Бельвалия обнаружена в Кумылженском р-не близ станицы Слащёвской [Красная книга Волгоградской области, 2006].

По наблюдениям В.А. Сагалаева в мае 1998 г. популяция вида в балке Грушевой на площади 0,75 га имела плотность 30-55 особей на 100 м² [Красная книга Волгоградской области, 2006]. Повторное обследование в 2002 г. выявило уменьшение её площади до 0,5 га в результате распашки степных склонов, а также снижение средней плотности до 5-15 особей на 100 м².

Охранный статус. *B. sarmatica* занесена в Красную книгу РФ. Статус: 2а — вид, сокращающийся в численности [Красная книга Российской федерации (растения и грибы), 2008]. Вид включен в Красные книги Республик Дагестан [1998], Северная Осетия-Алания [1999], Краснодарского [2007] и Ставропольского [2002] краев, Ростовской обл. [2004], Волгоградской обл. [2006].

Лимитирующими факторами являются распашка целинных степей и чрезмерная пастбищная нагрузка, уничтожение экотопов при промышленном и рекреационном строительстве, редкость распространения, малочисленность популяций, слабое возобновление: малое число семян и отсутствие их рассеивания, длительный период до цветения [Красная книга Волгоградской области, 2006].

Довольно активно ведутся исследования по состоянию популяций *B. sarmatica* в естественных условиях, а также проводятся работы по изучению этого растения в условиях интродукции. Исследованы три локальные популяции бельвалии, произрастающие на территории Ростовской области, но в различных природных условиях (Донецкий край, Приазовье, Доно-Сальский водораздел), оценено их экологическое состояние. Не было выявлено существенных различий у популяций из разных природных условий, все они характеризовались довольно высокими показателями численности, жизненности, семенной продуктивности [Шмараева и др., 2009]. Изучена семенная продуктивность *B. sarmatica* в естественных условиях и условиях Воронежского ботанического сада. Было показано, что семенная продуктивность выше в условиях культивирования в ботаническом саду, авторы связывают это с отсутствием межвидовой и внутривидовой конкуренции и отсутствием лимитирующих факторов [Кузнецов и др., 2011]. Сходные данные были получены исследователями из Ставропольского края [Магулаев, 2010], которые также отмечают, что и в культуре период прорастания семян бельвалии очень растянут. Разработан протокол микрклонального размножения *B. sarmatica* [Sencenco et al., 2011].

Очень немногие исследования касаются изучения генетики *B. sarmatica*. Было определено, что *B. sarmatica* диплоид ($2n=8$) [Bothmer, Wendelbo, 1981]. Исследований внутривидового разнообразия *B. sarmatica* не проводилось.

По данным The World Checklist of Seed Plants, род *Bellevallia* включает 74 вида [Govaerts, 1996], из них на территории СНГ встречается 18 видов. Feinbrun [1940] опубликовал полное исследование рода, куда включил 50 видов. Wendelbo [1980] включил в род еще 20 видов.

Род делится на 6 секций: *Nutans* (*Nutantes*) Feinbrun, *Conica* (*Conicae*) Feinbrun, *Patens* (*Bellevallia*) Feinbrun, *Muscarioides* Feinbru, *Strangweja* (Bertol.) K. Persson & Wendelbo, *Oxyodonta* (*Oxyodontae*) A. Loz. ex Wendelbo.

Представители рода *Bellevallia*, естественно произрастают на сухих степных участках, каменистых склонах гор в субальпийском и альпийском поясах от Атлантического побережья до Средней Азии (Средиземноморье, Крым, Кавказ, Турция, Иран, Туркмения), в Среднее Приднепровье, Причерноморье, Предкавказье, Нижнем Поволжье и Нижнем Дону. Многие виды бельвалии используются в декоративном садоводстве.

Существует немного хороших морфологических характеристик, отличающих род *Bellevallia* от других близких родов – *Muscari* и даже *Hyacinthus*. Имеются также очень похожие между собой виды бельвалии. При выращивании в культуре некоторые морфологические признаки могут существенно меняться [Johnson, 2003]. Однако хорошим признаком для определения таксономии является число хромосом. Поэтому опубликовано достаточно много цитологических исследований представителей рода *Bellevallia* [von Bothmer, Wendelbo, 1981; Özhatay et al., 1991; Özhatay, Johnson, 1996; Dalgıç, Basak, 1996; Johnson, Brandham, 1997; Dane, 1999; Johnson, 2003; Bareka et al., 2012]. В основном виды бельвалии диплоиды ($2n=8$), кариотипических различий между видами не обнаружено. Существует и полиплоидный ряд $2n=16, 24, 32$. У отдельных видов число хромосом может отличаться. Так, среди 42 растений *B. paradoxa* выявлено 19 диплоидов и 23 тетраплоида [Johnson, 2003]. Обнаружены также анеуплоидные формы, но лишь среди октаплоидов ($2n=32$), с числом хромосом 30, 31, 33, 35 [Johnson, 2003]. Также у некоторых образцов бельвалий разных видов (в том числе и у *B. sarmatica*) обнаружены В-хромосомы (добавочные хромосомы к обычному кариотипу), и их число варьирует от 1 до 4-х [Bothmer, Wendelbo, 1981; Özhatay et al., 1991].

Для уточнения филогении и установления таксономической структуры рода *Bellevallia* используются также нуклеотидные последовательности ядерного и хлоропластного генома. Были проанализированы филогенетические отношения между видами бельвалии, произрастающими в Италии, на основе изучения их морфологии, кариологии и нуклеотидных последовательностей (ITS и межгенный спейсер хпДНК *trnL-trnF*) [Borzatti von Loewenstern et al., 2013].

Нуклеотидные последовательности ядерного и хлоропластного генома также используются для уточнения филогении и на более высоких таксономических уровнях. Род

Bellevallia относится к семейству Asparagaceae, подсемейству Scilloideae [Chase et al., 2009]. Однако некоторые исследователи выносят представителей подсемейства Scilloideae в отдельное семейство Hyacinthaceae [Seberg et al., 2012].

На основе нуклеотидных последовательностей интрона *trnL* и межгенного спейсера *trnL-trnF* была изучена филогения семейства Hyacinthaceae [Pfosser, Speta, 1999]. Основываясь на полученных данных, а также принимая во внимание морфологические и кариологические данные, они подтвердили разделение семейства Hyacinthaceae на 4 подсемейства: Oziroeoideae, Urgineoideae, Ornithogaloideae и Hyacinthoideae [Speta, 1998] и показали монофилетичность данного семейства и многих его родов. В подсемействе Hyacinthoideae выделяются две трибы – Massonieae Baker и Hyacintheae Dumort. Базальное положение в трибе Hyacintheae занимает род *Barnardia*. В данной трибе можно выделить три клады: *Scilla*, *Fessia* и *Hyacinthoides*. К первой кладе относится род *Bellevallia*.

Подробных исследований таксономии *B. sarmatica*, с включением молекулярных данных, проведено не было. Также мало исследований представителей рода *Bellevallia*, где бы применялись молекулярные маркеры.

Однако представители подсемейства Scilloideae изучаются с помощью различных молекулярных маркеров. Так, генетическое разнообразие и таксономические отношения между родами *Drimia*, *Dipcadi* и *Ledebouria* были изучены с помощью RAPD- и SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)-маркеров [Jehan et al., 2014]. Аллозимные локусы были использованы для определения популяционной структуры и генетического разнообразия *Muscari comosum* [Alonso, Reguera, 1986] и *Scilla scilloides* [Ding et al., 1999]. 29 сортов гиацинта были проанализированы с помощью ISSR-маркеров [Fengrong et al., 2015]. С применением RAPD-анализа проанализировано генетическое разнообразие эндемика Южной Африки *Lachenalia bulbifera* [Kleynhans, Spies, 2000], а также видов *Ornithogalum unbellatum* и *O. divergens* [Andric et al., 2015]. Генетическое разнообразие редких видов *Muscari tenuiflorum* и *Leopoldia gussonei* было оценено с помощью данных AFLP-анализа [Hornemann et al., 2012; Vandepitte et al., 2013].

В данной работе с помощью молекулярных маркеров впервые исследовано внутривидовое разнообразие *B. sarmatica*, а также определен таксономический статус данного редкого вида.

1.3.2 Лук регелевский (*Allium regelianum* A.K. Becker ex Iljin)

Allium regelianum A.K. Becker ex Iljin - многолетнее травянистое луковичное растение (Рисунок 1.2). Относится к семейству Амалиллисовые (Amaryllidaceae).

Ботаническое описание. Луковица *A. regelianum* одиночная, яйцевидная, с наружными бурыми кожистыми оболочками, 0,5-2 см в диаметре. Дочерние луковички многочисленные, мелкие, коричневатые, матовые. В чешуях луковиц и в зеленых листьях присутствуют млечники, заполненные млечным соком. Корни тонкие, нитевидные.



Рисунок 1.2. Внешний вид *Allium regelianum* [Красная книга РСФСР (растения), 1989].

Стебель бороздчатый, 20-60 см высотой, на треть одет шероховатыми влагалищами базальных листьев. Листья, обычно 3-4 штуки, дудчатые, полуцилиндрические, шероховатые, редко гладкие, 2-3 мм шириной, короче стебля. Листорасположение – очередное. Соцветие – пучковато-продолговатый густой зонтик – выносится на поверхность земли цветочной стрелкой и до цветения окутан покрывалом. Зонтик многоцветковый, с неравными цветоножками. Шесть листочков яйцевидного околоцветника равные, пурпурные, с более тёмной жилкой, около 4 мм длиной, продолговато-ланцетные, без придатков [Введенский, 1935]. Нити тычинок (их 6) немного превышают околоцветник (красноватые пыльники при этом выступают из околоцветника), наружные шиловидные, внутренние трёхраздельные. Столбик в цветущем состоянии превышает околоцветник. Плод – коробочка, чуть короче околоцветника. Семена – черные трехсторонние, закругленные со спинки, с желобком [Ильин, 1929]. Цветет, как правило, в конце июня-июле. Перекрестноопыляемое растение. Энтомофил. Размножение семенное и вегетативное (луковичками).

Экологические особенности. Галофильно-лугово-степной вид, произрастающий на сухих солонцеватых и солончаковых лугах в поймах рек, по окраинам степных лиманов, на солонцеватых степных склонах. Ксеромезофит, галофит [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008].

Распространение. Впервые в России описан в окрестностях Сарепты [Ильин, 1929]. В настоящее время встречается на юге Европейской России (запад Калмыкии, южная часть

Волгоградской области, Ростовская область, Крым) и на Украине (Днепропетровская, Херсонская, Николаевская и, по-видимому, другие области) [Сагалаев, 2006, Серегин, 2007]. Распространен по территории довольно широко, но неравномерно и в целом редок из-за своей стенофитности и относительной редкости подходящих местообитаний [Серегин, 2007]. Кроме того, вид указывался для Хоперского заповедника в Воронежской области [Сагалаев, 2008] и в Краснодарском крае (Таманский полуостров, станица Старотитаровская, вершина Капустиной балки) [Серегин, 2004]. Известны популяции на территории Саратовской области [Конспект флоры Саратовской области, 1983; Плаксина, 2001].

В Волгоградской области долгое время было известно лишь местонахождение в окрестностях города Красноармейска, которое было уничтожено при застройке территории. В 1984 г. популяции обнаружены в верховьях р. Тингуты и вблизи устья р. Медведицы на ее правом берегу. В 1999-2001 гг. в пойме р. Дон популяции вида находились в стабильном состоянии. Но при позднем (вторая половина июня) сенокосении наблюдается нарушение семенного возобновления. В классическом местонахождении близ Сарепты вид исчез [Сагалаев, 1987, 1997].

В результате недавних экспедиционных обследований ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад» удалось выявить и исследовать 23 локальные популяции. Примечательно наличие большого числа популяций (особенно в Заволжье), которые ранее не были достоверно известны. С другой стороны, некоторые популяции, указанные в научной литературе, найдены не были (Рисунок 1.3) [Агеева и др., 2012].

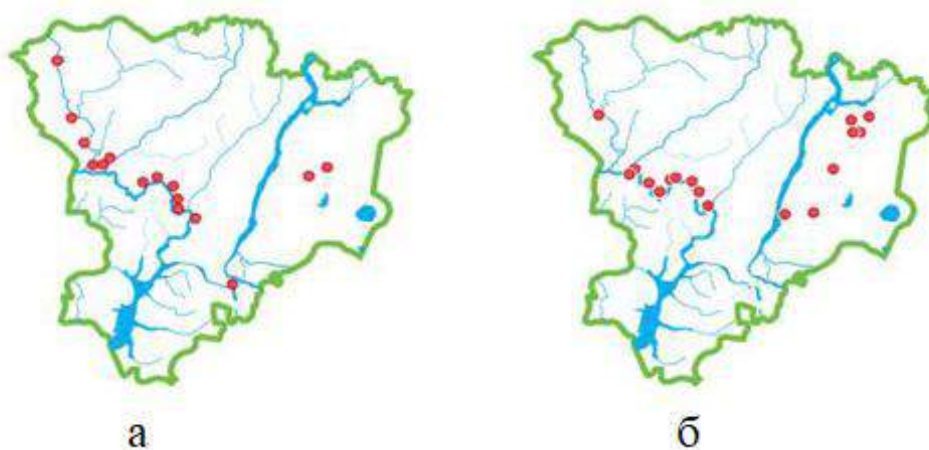


Рисунок 1.3. Карта-схема распространения лука регелевского на территории Волгоградской области: а – по данным Красной книги Волгоградской области; б – по данным исследований Волгоградского регионального ботанического сада [Агеева и др., 2012].

Охранный статус. Внесен в Красную книгу РФ. Статус: 2а – вид, сокращающийся в численности. Эндемик юго-востока Русской равнины [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008].

Лимитирующими факторами являются - хозяйственное освоение территории (городская застройка) и изменения условий обитания (распашка, антропогенные изменения гидрологического режима, выкашивание травостоя, механическое повреждение на пастбищах) [Красная книга РФ (растения и грибы), 2008].

ГБУ ВО «ВРБС» была разработана комплексная программа по изучению и сохранению вида *A. regelianum* на территории Волгоградской области, и в 2010 году эта программа была поддержана Комитетом охраны окружающей среды и природопользования Волгоградской области. Главными задачами программы являются мониторинг за состоянием популяций, исследование их генетического разнообразия, изучение биологических особенностей вида в условиях *ex situ*, создание банка семян, банка ДНК, сохранение вида в условиях *in vitro*.

В рамках этой программы начата интродукция *A. regelianum*. Показано, что вид можно успешно сохранять в условиях *ex situ* в ГБУ ВО «ВРБС» [Агеева и др., 2012]. *A. regelianum* отличается высокой приживаемостью растений, полноценным цветением и плодоношением. Установлен оптимальный способ проращивания семян *A. regelianum* – подзимний посев в ящики с почвой.

Крицкой с соавторами [2015] были проведены исследования по оптимизации протокола микроклонального размножения *A. regelianum*. Индукция морфогенеза *in vitro* возможна посредством механического разрушения апикальной меристемы и активации пазушных почек. Наилучшими эксплантами для микроразмножения являются луковичы, разрезанные вдоль на 2 равные части. Оптимальная питательная среда – без регуляторов роста. Полученные луковички можно сразу адаптировать или использовать для дальнейшего микроразмножения [Крицкая и др., 2015].

Что касается генетики *A. regelianum*, то она не изучена. Однако ряд исследований посвящен другим представителям рода *Allium*, многие из которых – важные продовольственные культуры, лекарственные, декоративные растения.

Род *Allium* L. насчитывает около 780 видов [Friesen et al., 2006]. История систематики рода *Allium* начинается с К. Линнея, в 1753г. он отнес к данному роду 33 вида, включив туда несколько родов (*Allium*, *Cepa*, *Porrum*, *Scorodoprasum*), дальнейшие исследователи также делили род *Allium* на несколько самостоятельных родов. Г. Дон объединил единый род *Allium* в 7 групп, которым присвоил ранг секций [Серегин, 2007]. Большая мировая ревизия рода проведена Регелем в 1875 году, где он описал уже 263 вида. Свои системы классификаций предлагали Веденский [1935], Hermann [1939], Омельчук [1962], Traub H. [1968] (на основании числа хромосом и расположения проводящих пучков). В 1973 г. Р.В. Камелин выделил шесть подродов, объединяющих 44 секции и подсекции [Камелин, 1973]. Последняя система рода, где

не используются молекулярные данные, создана Hanelt с соавт. [1992] которые разделили род *Allium* на шесть подродов и 45 секций.

Затем в систематике рода *Allium* стали применяться молекулярные методы. В 2006 году Friesen с соавт. [2006] предложили новую классификацию рода, основываясь на молекулярных данных (данные анализа последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров). Согласно этим данным, род *Allium* является монофилетическим и включает три эволюционные линии, 15 подродов и 72 секции [Friesen et al., 2006].

Виды в роде *Allium* имеют несколько основных чисел хромосом, но большинство секций характеризуются $x=8$. Для луков также отмечены полиплоидные ряды с $2n=16, 32, 40, 48$ [Омельчук-Мякушко, 1979; Фризен, 1988; Mathew, 1996].

A. regelianum по морфологическим признакам относят к подроду *Allium*, секции *Allium*. [Омельчук-Мякушко, 1979; Mathew, 1996]. *A. regelianum* – это довольно обособленный представитель секции *Allium*, сам в свою очередь дающий производные экологические формы (*A. scythicum*). Ближе всего к этому виду *A. rotundum*, *A. sphaerocephalon* и *A. pervestitum* [Серегин, 2007]. Однако более подробного исследования таксономии *A. regelianum* с включением молекулярных данных проведено не было.

Allium – это крупнейший подрод, включающий 260-280 видов [Klaas, 1998]. По молекулярным данным он разделяется на две основные группы. В первую группу входит секция *Allium*, во вторую – секции *Codonoprasum*, *Brevispatha* и *Kopetdagia*, а также большинство видов из секции *Scorodon*.

Секция *Allium* включает более 100 видов [Hanelt et al., 1992; Mathew, 1996]. Представители этой секции характеризуются внутренними тычиночными нитями, имеющими при основании по зубцу с каждой стороны, и единственным толстым запасующим катафиллом. Секция *Allium* эволюционно молодая и подвижная, для некоторых видов данной секции показано наличие четных и нечетных полиплоидных рядов [Mathew, 1996; Peruzzi et al., 2017]. Поэтому филогения данной секции не до конца выяснена, также неясно положение вида *A. regelianum*.

В настоящий момент представители рода *Allium* изучаются с помощью различных молекулярных маркеров довольно активно. Применяются маркеры RAPD [Buso et al., 2008], ISSR [Chen et al., 2014], AFLP [Филюшин и др., 2011], SSR [Abdou et al., 2015] и другие. Кроме того охарактеризован транскриптом *A. cepa* [Kim et al., 2015], *A. sativum* [Sun et al., 2012] и *A. fistulosum* [Sun et al., 2016], секвенирован пластидный геном лука репчатого *A. cepa* [von Kohn et al. 2013].

Помимо культурных, род включает множество дикорастущих видов, в том числе редких видов, эндемиков и реликтов, которые также изучаются с использованием молекулярно-генетических методов. Например, изучена филогения диких видов луков Северной Америки с помощью последовательностей ITS (Internal Transcribed Spacer) и EST (External Transcribed Spacer) [Nguyen et al., 2008]. Также с использованием последовательностей ITS и EST и последовательностей хлоропластных спейсеров проведен анализ полиморфизма популяций *A. ursinum* на территории Германии [Herden et al., 2012]. Также внутривидовой полиморфизм *A. ursinum*, собранного на территории Белоруссии, был проанализирован с помощью ISSR-маркеров [Дзюбан и др., 2014]. Проведен сравнительный анализ последовательностей хлоропластных геномов трех видов луков (*A. elatum*, *A. obliquum* и *A. paradoxum*), найдены особенности, потенциально связанные с адаптацией к различным условиям произрастания [Беленикин и др., 2013]. С помощью RAPD-праймеров изучено генетическое разнообразие редкого вида Айдахо *A. aaseae* и его таксономическая связь с *A. simillimum* [Smith, 1995], а также 17 диких популяций *A. hirtifolium* [Ebrahimi et al., 2009]. Генетическое разнообразие изолированной популяции *A. tricoccum* var. *burdickii* в Новой Шотландии было изучено с использованием 10 аллозимных маркеров [Vasseur, 2001]. AFLP-анализ был применен для исследования внутри- и межвидового генетического разнообразия трех диких видов луков – *A. acuminatum*, *A. brandegei* и *A. passeyi* [Phillips et al., 2008].

Род *Allium* во флоре Восточной Европы представлен 48 видами [Омельчук-Мякушко, 1979; Серегин, 2007]. На Южном берегу Крыма имеется один из центров видового разнообразия рода (17 видов). Здесь в голоцене происходил процесс формирования флоры луков из средиземноморских, сибирско-центральноазиатских, ирано-туранских элементов [Серегин, 2007]. Много эндемиков Восточной Европы – представители секции *Allium*: *A. nathaliae*, *A. scythicum*, *A. talijevii* и другие, в том числе *A. regelianum*. В Красную книгу России занесено 8 видов рода *Allium* [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008] и многие виды включены в региональные Красные книги.

Активно идет изучение биологии этих видов, ведется их интродукция, создаются программы по их сохранению. Как было описано выше, такая программа существует и для *A. regelianum*, главной ее особенностью является проведение работ по исследованию генетического разнообразия вида. Этим исследованиям посвящена часть диссертации.

1.3.3. Полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca* M. Bieb. ex Besser)

Artemisia hololeuca M. Bieb. ex Besser, семейство Сложноцветные (Asteraceae или Compositae) (Рисунок 1.4).



Рисунок 1.4. Внешний вид *Artemisia hololeuca* [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008].

Ботаническое описание. Полынь беловойлочная — невысокий (15-35 см) полукустарничек с одревесневающими основаниями побегов, весь беловатый от густых паутинистых волосков [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008]. Корень толстый, деревянистый. Вегетативные побеги многочисленные, укороченные, густо облиственные, образуют рыхлую дернину. Плодоносящие побеги более длинные и слабо облиственные, восходящие, ребристые. Листья на бесплодных побегах и нижние на плодоносящих длиной 2,5-6 см на длинных черешках, овальные или продолговатые в очертании, дважды перисторассечённые с продолговато-линейными плоскими дольками длиной 2-6 мм, шириной около 1 мм. [Поляков, 1961]. Средние стеблевые листья просто перистые, а самые верхние — цельные, линейные. Соцветие — узкая пирамидальная метёлка, состоящая из колокольчатых корзинок. Листья обертки бело-волосистые, овальные или овально-продолговатые, с пленчатым краем. Цветоложе выпуклое или плоское, иногда волосистое [Красная книга Волгоградской области, 2006]. Краевые цветки в корзинках пестичные, малочисленные (4-6 штук), с узкотрубчатым венчиком. Цветки диска (20-24 штуки) обоеполые, с коническим венчиком. Столбик длинный, лопасти рыльца линейные, на верхушке реснитчатые, после цветения дуговидно изогнутые. Плод — семянка, продолговато-яйцевидная,

плосковатая, гладкая, длиной до 1,5 мм. [Поляков, 1961]. Цветет в июне-августе. Размножение семенное и вегетативное [Семенова-Тян-Шанская, 1954].

Экологические особенности. Стелющийся полукустарничек, образующий своеобразные серебристо-серые подушки. Растет изолированными группами. Анемохор. Ксерофит. По всему ареалу растение приурочено только к выходам коренных плотных слоев мела, занимая крутые взлобья обнажений, где часто выступает в роли доминанта сообществ [Абрамова, 2000].

Жизненная форма – стержнепридаточнокорневой поликарпик. В ходе онтогенеза *A. hololeuca* проходит 10 возрастных состояний; общая продолжительность жизненного цикла в природных условиях составляет от 10 до 12 лет. Для полыни белой выявлен суточный ритм цветения с пиком в утренние часы, который зависит преимущественно от температуры и влажности воздуха. Анализ данных по семенной продуктивности *A. hololeuca* показал, что вид обладает высокими потенциальными и низкими реальными возможностями для семенного размножения (в условиях Волгоградской области) [Сидорова, 2008]. Недостаточная эффективность семенного возобновления компенсируется вегетативным размножением.

Характерной особенностью возрастной структуры ценопопуляций *A. hololeuca* является наличие двух типов базовых онтогенетических спектров: 1) двuverшинного (с преобладанием виргинильных растений и некоторым преобладанием среднегенеративных особей); 2) одновершинного (с преобладанием виргинильных особей). Это может быть связано с наличием двух способов возобновления (семенного и вегетативного) [Сидорова, 2008].

Распространение. В России встречается на юго-востоке Белгородской, юге Воронежской (Кантемировский и Богучарский районы), западе Волгоградской (по р. Хопёр) и Ростовской (только в Миллеровском р-не на правом берегу реки Камышная и Нагольная) областей. Вне России – на Украине в бассейне р. Северский Донец [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008; Красная книга Волгоградской области, 2006].

Охранный статус. Занесен в Красную книгу Российской Федерации [2008], статус 2 – вид, сокращающийся в численности. Донецко-донской эндемик. Вид также включен в Красную книгу Белгородской [2005], Волгоградской [2006] и Ростовской [2004] областей. Лимитирующими факторами являются уничтожение местообитаний при разработке мела и нарушение их при выпасе скота [Красная книга Российской Федерации (растения и грибы), 2008; Красная книга Волгоградской области, 2006].

Довольно активно ведется работа по исследованию меловых растительных сообществ (куда часто входит и *A. hololeuca*) и их мониторинг [Горелова, Горелова, 2003; Дегтярь, Чернявских, 2006; Слугинова, 2009; Слугинова, 2010; Григорьевская, 2012; Гусев, Ермакова, 2013].

Существуют исследования, затрагивающие экологические особенности *A. hololeuca*. Так, Сидоровой [2011] были изучены особенности ценопопуляций *A. hololeuca* на территории Нижнехоперского природного парка. Показано, что в пределах популяций полыни выделяются скопления особей разной степени агрегированности. Изменения возрастного спектра отдельных скоплений во времени носит тот же характер, что и изменения строения скоплений в пространстве. Эти особенности позволяют виду быстро осваивать новые места обитания и долго существовать на уже занимаемых территориях [Сидорова, 2011]. Для полыни беловойлочной ведущую роль в нормальном функционировании и сохранении популяций играют преимущественно эдафические и орографические экологические факторы. Этим же автором хорошо изучены оттогенез, биоморфология и основные этапы морфогенеза полыни беловойлочной [Сидорова, 2008]. Анализ данных по семенной продуктивности *A. hololeuca* показал, что в условиях региона этот вид обладает высокими потенциальными и низкими реальными возможностями для семенного размножения. Недостаточная эффективность семенного возобновления компенсируется вегетативным размножением [Сидорова, 2008]. Кроме того, Всходы полыни беловойлочной могут появляться весной и осенью при достаточной влажности почвенного субстрата и особенностей микрорельефа. Наблюдения в течение нескольких полевых сезонов показали, что степень закрепления и дальнейшего развития проростков данного вида весьма низка [Сидорова, 2011]. Кроме того, проводились исследования метаболических особенностей *A. hololeuca* и некоторых других видов полыней [Землянухина и др., 2012].

Ведется работа по интродукции *A. hololeuca*. Полынь беловойлочная культивируется в ботанических садах Волгограда, Ростова, Белгорода, Воронежа, Донецка, Харькова. В Волгоградском региональном ботаническом саду ведется работа по созданию банка семян *A. hololeuca*, а также сформирована коллекция данного вида в культуре *in vitro* [Малаева и др., 2008; Агеева и др., 2012a].

Что касается генетики *A. hololeuca*, то она не изучена. Однако род полынь (*Artemisia* L.) ранее изучался с применением молекулярных методов. *Artemisia* – один из самых крупных родов в семействе Asteraceae. Он широко распространен по всему Северному полушарию. Представители данного рода применяются человеком в фармацевтике, парфюмерии, косметологии, кулинарии, некоторые представители используются как кормовые и декоративные растения, а также растения-почвоукрепители. Таксономия рода *Artemisia* до сих пор до конца не определена. За последние десятилетия выделяли от одного рода с более чем 500 видами, до 6-8 родов [Poljakov, 1961; Martin et al., 2001]. Tournefort в 1700 году относил к *Artemisia* три рода *Artemisia*, *Absinthium* и *Abrotanum*, но уже Линней выделял цельный род

Artemisia, который позднее разделили на 4 секции: *Abrotanum* (*Artemisia*) Besse, *Absinthium* (Mill.) DC, *Seriphidium* (Besser) Besser, *Dracunculus* Besser [Watson et al., 2002]. Позже секции *Artemisia* и *Absinthium* были объединены, а секции подняли до уровня подродов (подроды *Artemisia*, *Dracunculus* и *Seriphidium*). Кроме того, некоторыми авторами американские древесные виды полыней выделяются в особый подрод *Tridentatae* [McArthur, Plummer, 1978]. Есть авторы, которые выделяют подрод *Seriphidium* в отдельный род [Poljakov, 1961; Bremer, 1994]. Bremer и Humphries [1994] выделяют так называемую *Artemisia-group*, куда включают род *Artemisia*, род *Seriphidium*, а также несколько небольших родов (*Neopallasia*, *Turaniphytum*, *Mausolea*, *Picrothamnus*). Такое деление подтверждается и некоторыми молекулярными данными [Watson et al., 2002]. Согласно Полякову [1961], *A. hololeuca* относится к роду *Artemisia*, подроду *Artemisia* (ранее секция *Absinthium*).

Род *Artemisia* имеет два основных числа хромосом $x=8$ (с полиплоидным рядом от диплоида до гексаплоида) и $x=9$ (с полиплоидным рядом от диплоида до додекаплоидов) [Valles and McArthur, 2001].

Полыни в основном дикорастущие растения, в том числе редкие и исчезающие. Многие дикорастущие виды рода *Artemisia* широко применяются человеком. Поэтому они активно изучаются, в том числе и с помощью молекулярных маркеров. Так, например, были изучены образцы *A. capillaris* из разных регионов Малазии с помощью ISSR-маркеров [Shafie et al., 2009], изолированные популяции *A. eriantha* с помощью AFLP-маркеров [Sanz et al., 2014], популяции *A. herba-alba*, *A. judaica*, *A. monosperma* с помощью RAPD-маркеров [Badr et al., 2012], культивируемые и дикорастущие популяции *A. umbelliformis* с помощью AFLP-маркеров [Comino et al., 2015], популяции *A. panicicii* с помощью AFLP-маркеров и последовательностей хпДНК [Kitner et al., 2012], дикорастущие популяции *A. annua* из Северного Ирана с помощью AFLP-маркеров [Reza et al., 2016], популяции *A. halodendron* с помощью ISSR-маркеров и ITS-последовательностей [Huang et al., 2011].

A. hololeuca – это уникальный вид, произрастающий в специфических условиях меловых почв. Поэтому интересно изучить генетическое разнообразие и популяционную структуру данного вида, места обитания которого ограничены. Исследования по изучению генетического разнообразия *A. hololeuca* впервые проведены в данной работе.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Исходный материал

Сбор материала вида *Bellevaia sarmatica* проводили на территории Волгоградской области (Рисунок 2.1) в ходе экспедиций ГУ «Волгоградский региональный Ботанический сад». В результате собран 41 образец бельвалии, из пяти точек (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. Образцы *B. sarmatica*, взятые для анализа.

Точка сбора	Место сбора	Количество образцов	№ образцов	Географические координаты	
				Широта (N)	Долгота (E)
1	Волгоградская область, Клетский район, поселок Копонья	9	1-8	48°54'45"	42°44'12"
2	Волгоградская область, Серафимовичский район, хутор Избушенский	9	10-18	49°28'44"	42°27'51"
3	Волгоградская область, Кумылженский район, Слащевское лесничество	9	19-27	49°50'29"	42°17'06"
4	Волгоградская область, Суровикинский, хутор Лобакин	6	28-33	48°47'37"	42°48'01"
5	Волгоградская область, Калачевский, город Калач-на-Дону, балка Красная	8	34-41	48°41'33"	43°27'34"

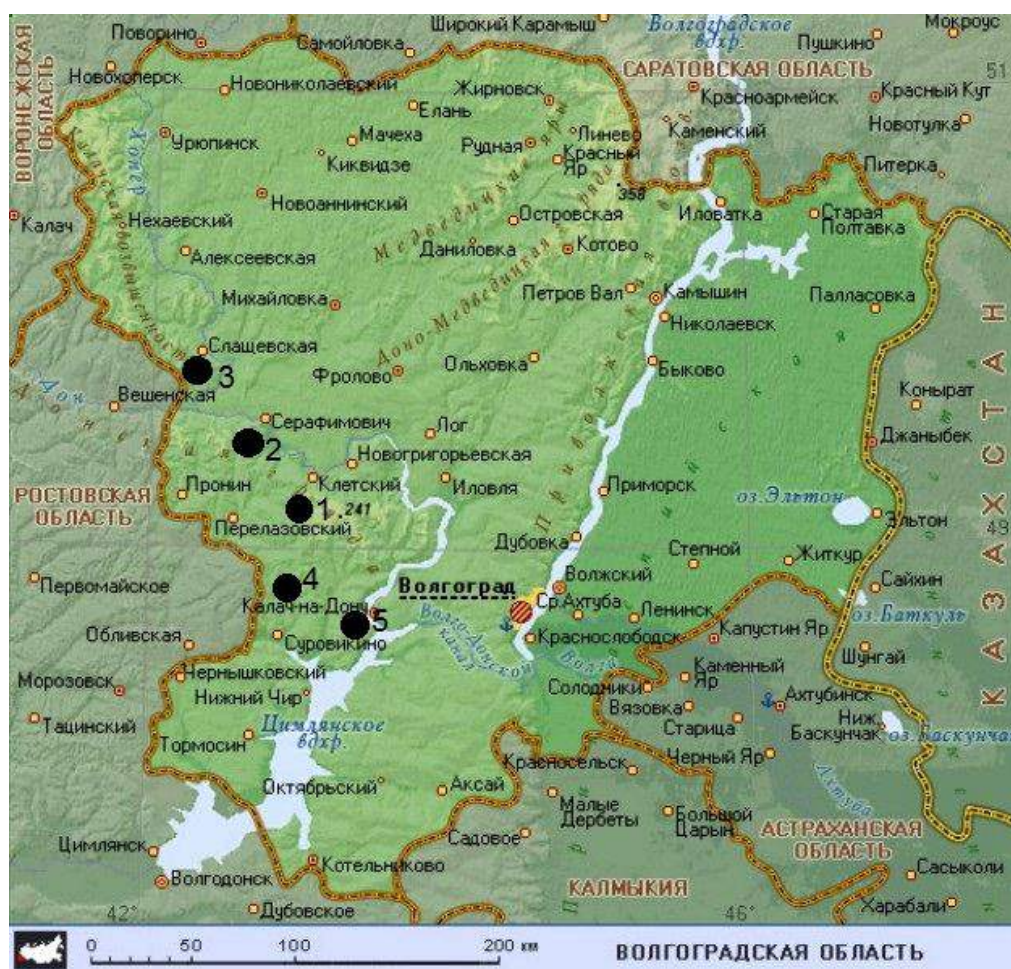


Рисунок 2.1. Расположение точек сбора образцов *V. sarmatica* в Волгоградской области (номера точек сбора соответствуют представленным в Таблице 2.1). Карта взята с <http://planetolog.ru/>.

Сбор материала вида *Allium regelianum* проводили на территории Волгоградской области (Рисунок 2.2) в ходе экспедиций ГУ «Волгоградский региональный Ботанический сад». В результате собрано 93 образца лука из 11 точек (Таблица 2.2). Кроме того, из гербарных коллекций Главного Ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН и Московского Государственного университета имени М.В. Ломоносова было получено 11 образцов *A. regelianum* из других регионов России (Таблица 2.2).

Таблица 2.2. Образцы *A. regelianum*, взятые для анализа.

Точка сбора	Место сбора	Количество образцов	№ образцов	Географические координаты сбора образцов	
				Широта N	Долгота E
№1	Волгоградская область, Быковский район, 4,5 км восточнее поселка Демидов, лиман Тажи	6	1-6	49° 12' 28"	45° 26' 05"
№2	Волгоградская область, Николаевский район, 9 км севернее поселка Красный Мелиоратор, лиман Хреноватый	20	7-26	50° 5' 60"	46° 2' 44"
№3	Волгоградская область, Николаевский район, 3 км южнее поселка Красный Мелиоратор, лиман Медвежий	5	27-31	49° 59' 49"	46° 4' 35"
№4	Волгоградская область, Николаевский район, 6 км юго-восточнее поселка Красный Мелиоратор, лиман Богатырев	11	32-42	49° 59' 49"	46° 10' 16"
№5	Волгоградская область, Иловлинский район, 4,5 км восточнее хутора Ерецкий	1	43	49° 14' 09"	43° 53' 24"
№6	Волгоградская область, Фроловский район, 2 км южнее хутора Выездинский	2	44-45	49° 30' 34"	43° 27' 53"
№7	Волгоградская область, Серафимовичский район, 7,5 км западнее хутора Дружилинский	4	46-48	50° 12' 22"	42° 7' 40"
№8	Волгоградская область, Серафимовичский район, 1 км западнее хутора Красноярский	30	49-78	49° 27' 60"	42° 52' 50"
№9	Волгоградская область, Серафимовичский район, 4 км севернее хутора Буерак-Поповский	6	79-84	49° 35' 26"	42° 37' 13"
№10	Волгоградская область, Серафимовичский район, 2 км южнее хутора Новоалександровский	4	85-88	49° 37' 23"	42° 42' 40"
№11	Волгоградская область, Алексеевский район, 3 км северо-западнее станицы Усть-Бузулукская	5	89-93	49° 21' 11"	43° 4' 58"
	Волгоградская область, Иловлинский район, поселок Качалино	1	94 (APS-016)*		
	Волгоградская область, Фроловский район, между хут Выездинским и станицей Кременской	1	95**		
	Волгоградская область, Иловлинский	1	96**		

	р-он, напротив хутора Зимовский Сиротинской станицы				
	Астраханская область, село Черный Яр	2	97-98**		
	Ростовская область, Пролетарское водохранилище,	1	99 (APS- 017)*		
	Воронежская область, городское поселение Богучар,	1	100 (APS- 014)*		
	Калмыкия, северный берег озера Маныч-Гудило	1	101**		
	Калмыкия, шоссе Элиста- Ставрополь, 20 км ЮЗ Элисты	1	102**		
	Крым, совхоз Перекопский,	1	103 (APS- 018)*		
	Украина, Днепропетровская область, река Самара,	1	104 (APS- 015)*		

* – образцы из гербарных коллекций Государственного университета имени М.В. Ломоносова (в скобках указан гербарный номер образца); ** – образцы из гербарных коллекций Главного Ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН.

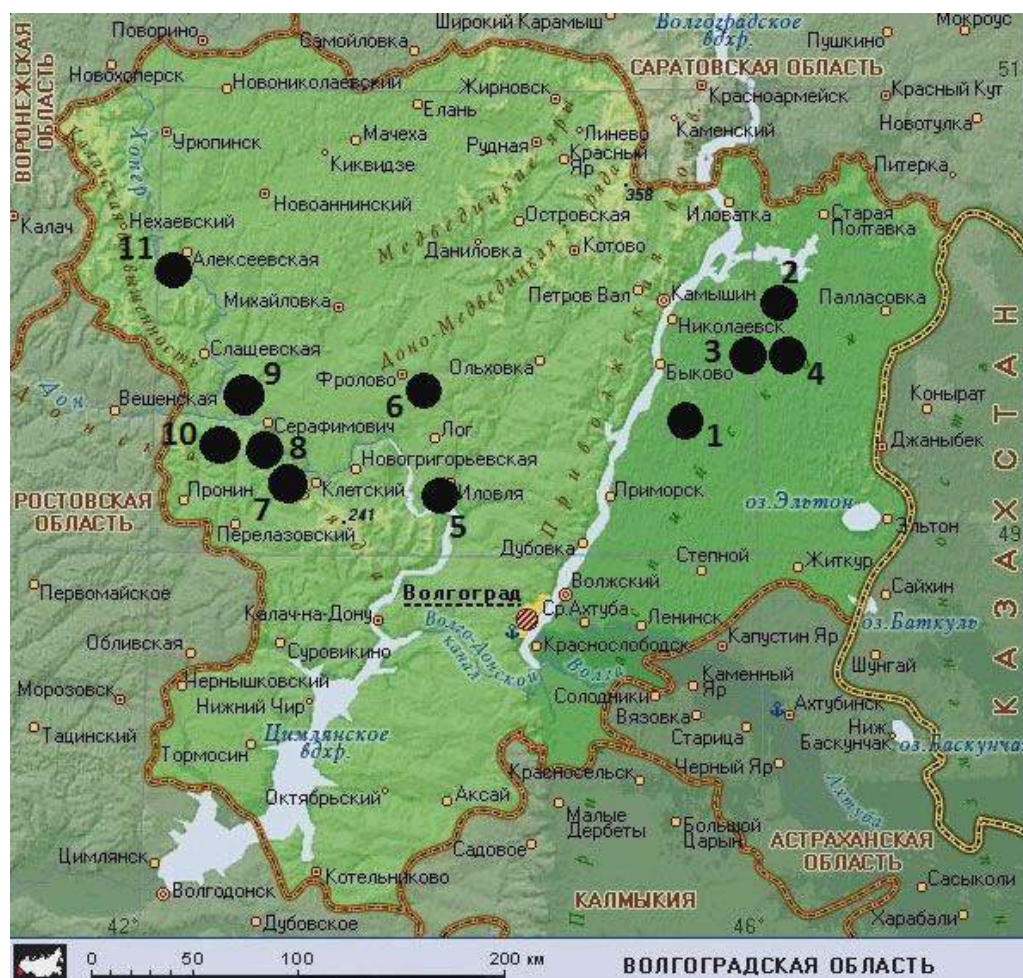


Рисунок 2.2. Расположение точек сбора образцов *A. regelianum* на карте Волгоградской области (номера точек сбора соответствуют представленным в Таблице 2.2). Карта взята с <http://planetolog.ru/>.

Сбор материала вида *Artemisia hololeuca* осуществлен в ходе экспедиций ГУ «Волгоградский региональный Ботанический сад» на территории Волгоградской области. В результате собрано 89 образцов полыни из 13 точек (Таблица 2.3, Рисунок 2.3).

Таблица 2.3. Образцы *A. hololeuca*, взятые для анализа.

Точка сбора	Административный район	Количество образцов	№ образцов	Географические координаты сбора образцов	
				Широта N	Долгота E
№1	Волгоградская область, Алексеевский район, станица Усть-Бузулукская	7	1-7	50°10'33''	42°09'54''
№2	Волгоградская область, Алексеевский район, хутор Помалинский	7	8-14	50°18'54''	42°08'53''
№3	Волгоградская область, Алексеевский район, хутор Самолшинский	7	15-21	51°21'36''	42°04'80''
№4	Волгоградская область, Алексеевский район, хутор Нестеровский №1	7	22-28	50°10'55''	42°00'04''
№5	Волгоградская область, Алексеевский район, хутор Нестеровский №2	7	29-35	50°10'55''	41°59'20''
№6	Волгоградская область, Алексеевский район, хутор Нестеровский №3	5	36-40	50°10'52''	41°58'44''
№7	Волгоградская область, Нехаевский район, станица Акишевская №1	7	41-47	50°15'25''	42°00'11''
№8	Волгоградская область, Нехаевский район, станица Акиншевская №2	7	48-54	50°15'25''	42°00'04''
№9	Волгоградская область, Нехаевский район, хутор Красновский	7	55-61	50°20'46''	41°57'00''
№10	Волгоградская область, Нехаевский район, станица Луковская №1	7	62-68	50°34'26''	41°52'34''
№11	Волгоградская область, Нехаевский район, станица Луковская №2	7	69-75	50°34'26''	41°52'26''
№12	Волгоградская область, Урюпинский район, хутор Белогорский №1	7	76-82	50°38'24''	41°52'41''
№13	Волгоградская область, Урюпинский район, хутор Белогорский №2	7	82-89	50°38'10''	41°52'12''

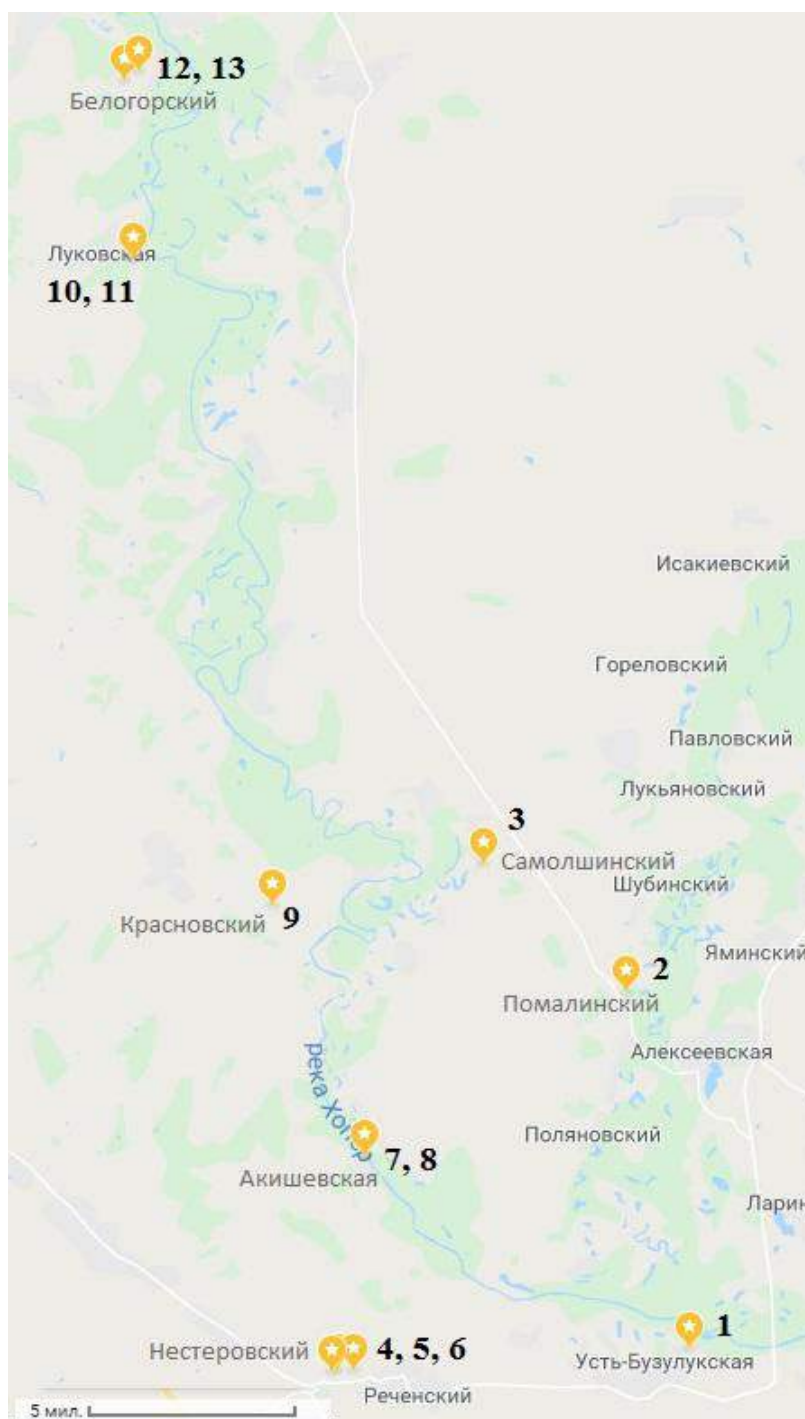


Рисунок 2.3. Расположение точек сбора образцов *A. hololeuca* на карте Волгоградской области (номера точек сбора соответствуют представленным в Таблице 2.3). Карта взята с <https://www.google.ru/maps>.

2.2 Выделение ДНК из растительных тканей

ДНК образцов *B. sarmatica*, *A. regellianum* выделяли из листьев растений стандартным СТАВ-методом [Doyle, 1991]. ДНК образцов *A. regellianum* из гербарных коллекций выделяли с использованием набора Quick-DNA Universal Kit (ZymoResearch, США) согласно протоколу

фирмы производителя. ДНК образцов *A. hololeuca* выделяли из листьев растений по методу Puchooa [2004]. Концентрацию выделенной ДНК определяли при сравнении с ДНК фага λ известной концентрации (Fermentas, США) после электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

2.3 RAPD-анализ

Для проведения RAPD-анализа использовали стандартные 10-членные олигонуклеотидные праймеры серии OPA, OPD, OPK, OPN, OPE.

Для оценки генетического полиморфизма *B. sarmatica*, *A. regelianum*, *A. hololeuca* на ограниченной выборке образцов каждого вида были протестированы 15 праймеров, ранее успешно использованные для маркирования генома представителей различных семейств растений [Горюнова и др., 2004, Кочиева и др., 2006]: OPA03, OPD01, OPD02, OPD03, OPD06, OPD12, OPE05, OPE06, OPE09, OPK04, OPK09, OPK10, OPN13, OPN15, OPN19 (ЗАО Евrogen, РФ). Для каждого вида были отобраны праймеры, которые позволяли детектировать максимальное число полиморфных фрагментов для дальнейшего анализа (Таблица 2.4). Последовательности праймеров указаны в Приложении 1.

Таблица 2.4. Набор праймеров, использованных для RAPD-анализа.

Вид растения	Набор использованных праймеров
<i>B. sarmatica</i>	OPA03, OPD01, OPD02, OPD03, OPD06, OPD12, OPE05, OPK09, OPK10, OPN13, OPN15, OPN19
<i>A. regelianum</i>	OPD06, OPD12, OPE05, OPE06, OPK09, OPK10, OPN15, OPN19
<i>A. hololeuca</i>	OPD06, OPE06, OPE09, OPK04, OPK09, OPK10, OPN15, OPN19

Амплификацию проводили с использованием набора реактивов «Диалат ЛТД» (РФ). Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 1× PCR буфер, 0,2 мМ каждого из нуклеотидов, 2,5 мМ MgCl₂, 400 нМ праймера, 1 ед. BioTaqPol полимеразы, 20 нг ДНК и деионизированную воду до необходимого объема (15 мкл). Режим амплификации: денатурация 5 минут при 94°C, 45 циклов (94°C – 30 сек, 37°C – 1 мин, 72°C -2 мин) и финальная элонгация 72°C – 10 мин. ПЦР проводили на амплификаторе PCT-150TM (MJResearch Inc, США) или ABI GeneAMP 9700 (Applied Biosystems, США).

2.4 ISSR-анализ

Для проведения ISSR-анализа были использованы стандартные праймеры Primer Set №9 University of British Columbia.

Для оценки генетического полиморфизма *B. sarmatica*, *A. regelianum*, *A. hololeuca* на ограниченной выборке образцов каждого вида были протестированы 10 праймеров, ранее успешно использованных для изучения генома родственных видов [Mukherjee, 2013, Son, 2012, Huang et al., 2011, Shafie et al., 2011]: UBC807, UBC810, UBC811, UBC826, UBC841, UBC861, UBC873, UBC880 (ЗАО Евrogen, РФ). Для каждого вида были отобраны праймеры, которые позволяли детектировать максимальное число полиморфных фрагментов, для дальнейшего анализа (Таблица 2.5). Последовательности праймеров указаны в Приложении 1.

Таблица 2.5. Набор праймеров, использованных для ISSR-анализа.

Вид растения	Набор использованных праймеров
<i>B. sarmatica</i>	UBC807, UBC810, UBC811, UBC826, UBC841, UBC873
<i>A. regelianum</i>	UBC807, UBC810, UBC811, UBC826, UBC841, UBC873
<i>A. hololeuca</i>	UBC807, UBC810, UBC811, UBC826, UBC841, UBC873

Амплификацию проводили с использованием набора реактивов «Диалат ЛТД» (РФ). Реакционная смесь состояла из 1х ПЦР буфер, 0,25 мМ каждого дезоксинуклеотида, 1,5 мМ MgCl₂, 500 нМ ISSR-праймера, 1 единицы Taq-полимеразы и 20 нг ДНК, общий объем реакционной смеси 15 мкл. Амплификацию проводили на приборе ABI GenAMP 9700 (Applied Biosystems, США), используя следующую программу: 94°C – 5 мин; 40 циклов: 94°C – 45 с, T_{отж} – 45 с, 72°C – 1 мин; 72°C – 7 мин.

2.5 AFLP-анализ

AFLP-анализ проводили согласно работе Vos [1995]. ДНК расщепляли с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* (New England BioLabs, США) и *MseI* (New England BioLabs, США) в течение трех часов при 37°C. Затем полученную смесь лигировали со специфическими адапторами с помощью T4 DNA лигазы (Invitrogen, США). Реакцию лигирования проводили в течение 6 часов при температуре 37°C, затем инактивировали лигазу в течение часа при 65°C. Реакции проводили в приборе ABI GenAMP 9700 (Applied Biosystems, США).

После реакции лигирования проводили два раунда селективной амплификации. Для первого раунда амплификации использовали олигонуклеотидные праймеры, взаимодополняющие адаптер и сайты рестрикции и содержащие по одному селективному нуклеотиду на 3'-конце, что позволяет отобрать только определенный набор фрагментов. Для всех трех видов были применены праймеры E₀₁ и M₀₂ (ЗАО Евроген, РФ). Последовательности праймеров указаны в Приложении 1.

Затем, продукты амплификации разводили в 2-10 раз и использовали в качестве матрицы для второго раунда амплификации. Для второй селективной амплификации к праймерам добавляли два и больше дополнительных нуклеотида, что позволило осуществить отбор определенного набора фрагментов.

На ограниченной выборке образцов каждого вида были протестированы 15 комбинаций праймеров, отобранных по данным работ [van Heusden et al, 2000, Garcia Lampasona et al, 2003, Ohara et al, 2005, Comino et al., 2015, Sanz et al., 2014, Guo et al., 2004]: E₃₂/M₅₂, E₃₅/M₅₀, E₃₅/M₄₈, E₃₅/M₅₀, E₃₅/M₅₂, E₃₅/M₅₅, E₃₅/M₆₀, E₃₇/M₅₂, E₃₈/M₅₂, E₃₈/M₆₀, E₃₈/M_{52a}, E₃₈/M_{52t}, E₃₈/M_{55g}, E₃₈/M_{55t}, E₄₀/M₅₀, E₄₁/M₆₁ (ЗАО Евроген, РФ). Для каждого вида были отобраны комбинации праймеров, которые позволяли детектировать максимальное число полиморфных фрагментов, для дальнейшего анализа (Таблица 2.6). Последовательности праймеров указаны в Приложении 1.

Таблица 2.6. Набор праймеров, использованных для AFLP-анализа.

Вид растения	Набор использованных комбинаций праймеров (коды праймеров)
<i>B. sarmatica</i>	E ₃₂ /M ₅₂ , E ₃₅ /M ₅₂ , E ₃₅ /M ₅₅
<i>A. regelianum</i>	E ₃₇ /M ₅₂ , E ₃₈ /M ₅₂ , E ₃₈ /M _{55g} , E ₃₈ /M _{55t} , E ₃₈ /M ₆₀
<i>A. hololeuca</i>	E ₃₅ /M ₅₀ , E ₃₅ /M ₅₂ , E ₃₅ /M ₅₅ , E ₃₈ /M ₆₀

2.6 NBS-профайлинг *B. sarmatica* и *A. regelianum*

NBS-профайлинг проводили согласно методике, описанной van der Linden [2004].

Рестрикцию геномной ДНК проводили при помощи 5 ед. эндонуклеазы рестрикции *MseI* (New England BioLabs, США) в течение 4 часов при 37°C. Полученные в результате рестрикции фрагменты лигировали с адаптерными олигонуклеотидами, используя T4 ДНК лигазу (Invitrogen, США). Лигирование проводили в течение 6 часов при 37°C, а затем в течение часа лигазу инактивировали при 65°C. После реакции лигирования проводили два раунда амплификации. В первом раунде использовали адаптерный праймер (последовательность приведена в Приложении 1). Для второго раунда амплификации использовали флуоресцентно

меченные NBS-праймеры (Bio-Synthesis, США). Преварительно было проведено тестирование NBS-праймеров на ограниченной выборке образцов каждого вида, а затем выбраны праймеры, позволяющие получать наиболее полиморфные спектры (Таблица 2.7). Последовательности праймеров указаны в Приложении 1.

Таблица 2.7. Набор праймеров, использованных для NBS- профайлинга.

Вид растения	Набор использованных праймеров
<i>B. sarmatica</i>	NBS2, NBS3
<i>A. regelianum</i>	NBS2, NBS3, NBS5, NBS7, NBS9

При проведении NBS-профайлинга *A. regelianum* в анализ были также включена представители рода *Allium*, принадлежащие к различным секциям: секция *Allium* – *A. ampeloprasum* (4 образца), *A. sativum* (2 образца), *A. porrum* (2 образца), *A. tuncelianum*, *A. rotundum*; секция *Rhizirideum* – *A. nutans*; секция *Cepa* – *A. altaicum*. Образцы ДНК данных видов получены из коллекции группы Молекулярных методов анализа генома Центра «Биоинженерия» РАН.

2.7 SSR- анализ меж- и внутривидовой изменчивости

A. regelianum

К настоящему времени микросателлитные маркеры для *A. regelianum* не разработаны. Однако показано, что некоторые из разработанных для культурных представителей рода *Allium* (*A. cepa* (лук репчатый) и *A. sativum* (чеснок)) SSR-маркеров могут быть использованы для анализа внутривидовой вариативности у других видов рода [Fischer and Bachmann, 2000, Lee et al., 2011, Mallor et al., 2014]. Чтобы оценить возможность использования таких микросателлитных локусов для анализа полиморфизма образцов *A. regelianum*, было проведено тестирование 16 SSR-маркеров [Fischer, Bachmann, 2000, Jakse et al., 2005, Lee et al., 2011, Mallor et al., 2014, McCallum et al., 2008] на ограниченной выборке из 12 образцов, представляющих различные популяции *A. regelianum*. По результатам проведенного тестирования для дальнейшего изучения полиморфизма *A. regelianum* было выбрано четыре микросателлитных локуса: *GB-AS-089*, *GB-AS-091*, *ACM146*, *ACM300*, которые амплифицировались и были полиморфны, остальные локусы или не амплифицировались (*GB-AS-041*, *GB-AS-027*, *AMS07*, *AMS14*, *ACM082*, *ACM134*, *ACM101*), или амплифицировались, но были мономорфны (*ACM045*, *GB-AS-112*, *GB-AS-036*, *ACM018*, *ACM138*) (Таблица 2.8).

Таблица 2.8. Информация о SSR-праймерах, использованных в работе.

SSR-локус	Микросателлитный мотив	Последовательность праймера 5' – 3'	Температура отжига, °C	Результат амплификации, +/-**	Полиморфизм, +/-***	Длина фрагментов, пн.	Ссылка
<i>AMS07</i>	GTTTCTGTTT (CTT)6 (TC)2 TTT(CTT)2	F:TGCGAATGTGAGGTTTTCTGC R:CGACCCGGAAATTTTCGATC	58	-			Fischer, Bachmann, 2000
<i>AMS14</i>	(CA)28 (TA)4	F:CCCCTGAGTAAATTCAAAATCC R:TCCTTAGTATAATTTTCGGGGTAAC	58	-			Fischer, Bachmann, 2000
<i>GB-AS-027</i>	(GGA)4	F:CACCAATAGGCTGCTTCG R:AATGTTCTCTCTCCCCCT	56	-			Lee et al., 2011
<i>GB-AS-041</i>	(TCA)4	F:GCTCAGATCATCGACCCA R:ACACCATCGTACGCCAAG	56	-			Lee et al., 2011
<i>ACM082</i>	(TCT)13	F:CACCGTTCCTCAGCTCACTT R:AGAGGGACGAAATGAAAGCA	56	-			Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005) *
<i>ACM101</i>	(TCC)5	F: CTTTTGCTAACCAAATCCGA R:CTTGTTGAGAAGGAGGACGC	58	-			Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005)
<i>ACM134</i>	(GA)8	F:ACACACACAAGAGGGAAGGG R:CACACACCCACACACATCAA	58	-			Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005)
<i>ACM018</i>	(CTT)6	F: GGGGAATGGTGGAGAATAGA R:AACAGAGGCAAGAGGAGCG	58	+	-	300	Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005)
<i>GB-AS-036</i>	(AT)4	F:GTTGCAGGTCCAGGTTCA R:CAATGCCCAAGCAGTGAT	55	+	-	275	Lee et al., 2011

<i>ACM045</i>	(TC)6	F:AAAACGAAGCAACAAACAAAA R:CGACGAAGGTCATAAGTAGGC	54	+	-	270	Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005)
<i>GB-AS-112</i>	(TA)5	F:GTTGCAGGTCCAGGTTCA R:ACCAGCAACAACACAGGG	56	+	-	260	Lee et al., 2011
<i>ACM138</i>	(CTGC)11	F: ACGGTTTGATGCACAAGATG R:CCAACCAACAGTTGATACTGC	58	+	-	265	Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005)
<i>GB-AS-089</i>	(AG)4 (TAG)3	F:GTCCAAGGAGGCAAGGAC R:GGCTAGCCAATCCATTCC	58	+	+	370–375	Lee et al., 2011
<i>GB-AS-091</i>	(GGA)2 (TGC) (GGA)2	F: CCCC AATTTCTGCCGTAT R:TCCCCTTAGTCTCAATCGC	56	+	+	230–237	Lee et al., 2011
<i>ACM146</i>	(ACA)5	F:ATGTCCCAATTCGACCAGAG R:CGTTACGGCTGAGAACTTCC	58	+	+	235–239	Mallor et al., 2014 (Jakse et al., 2005)
<i>ACM300</i>	(GCA)7	F:AGGTGCAGTTTTCGTGGTAGG R:TTAGCCCCTGGTAAGTGTGG	60	+	+	167–182	Mallor et al., 2014 (McCallum et al., 2008)

Примечание. * - ссылка на статью, где указана последовательность праймера; ** + – фрагмент амплифицирован; - – фрагмент не амплифицирован; *** + – амплифицированный фрагмент полиморфный ; - – амплифицированный фрагмент мономорфный.

Амплификацию проводили с использованием набора реактивов «Диалат ЛТД» (РФ) на амплификаторе ABI GeneAMP 9700 (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь содержала 1× PCR буфер, 0,2 мМ каждого из нуклеотидов, 1,5 мМ MgCl₂, 250 нмоль каждого праймера (Евроген, РФ), 1 ед. BioTaqPol полимеразы, 50 нг ДНК и деионизированную воду до необходимого объема (15 мкл). Режим амплификации: 94°C – 5 мин; 35 циклов: 94°C – 30 с, T_{отж} – 30 с, 72°C – 30 с; 72°C – 7 мин.

2.8 Визуализация результатов амплификации

RAPD и ISSR-анализ

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле, с добавлением раствора бромистого этидия (0,005%) в 1× TBE-буфере, затем гель просматривали в ультрафиолетовом свете и фотодокументировали. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы: 100bp+1,5Kb+3Kb (СибЭнзим, РФ) (0,05 г/л).

AFLP и SSR-анализ

Фракционирование продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) в камере Sequi-Gen® GT Sequencing Cell (Bio-Rad, США) с использованием источника питания 3000/300 POWER SUPPLY (Bio-Rad, США) с небольшими отклонениями от протокола фирмы-производителя. Проявляли гель по методу 3 из работы Benbouza с соавторами [2006]. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 100bp DNA ladder (Invitrogen, США) (0,05 г/л).

NBS-профайлинг

ПЦР-фрагменты разделяли в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле на приборе Li-COR 4300 DNA Analyzer (LI-COR Biotechnology, США) по стандартной методике фирмы производителя.

2.9 Амплификация и секвенирование участков ядерного и цитоплазматических геномов *B. sarmatica* и *A. regelianum*

Амплификацию некодирующих участков ДНК проводили с использованием стандартных праймеров [White et al., 1990, Shaw et al., 2005, 2007]. Последовательности праймеров приведены в Приложении 1.

Амплификацию нуклеотидных последовательностей проводили с использованием набора реактивов ЗАО «Диалат ЛТД» (РФ). Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 10× буфер, 1,5 мкМ $MgCl_2$, 0,2 мМ каждого dNTP, по 0,5 мкМ соответствующих праймеров, 0,2 единиц Taq полимеразы и 100 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере BioRad T100 (Bio-Rad, США). Режим амплификации: 94°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, $T_{отж}$ – 30 с, 72°C – 1 мин; 72°C – 5 мин. Наличие продукта амплификации проверяли элетрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Первичная последовательность ДНК амплифицированных участков была определена с помощью системы Big-Dye (Applied Biosystems) на секвенаторе ABI 310 capillary DNA Analyzer (ЦКП «Биоинженерия» РАН).

Для филогенетического анализа *B. sarmatica* из базы данных NCBI были взяты последовательности ITS1-5.8S-ITS2 пяти видов *Bellevia*, произрастающих на юге Европы (*Bellevia romana* L. (FR851318.1), *B. pelagica* (FR851315.1), *B. trifoliata* (FR851319.1), *B. webbiana* (FR851320.1), *B. dubia* (AM117038.1)) и представителей родственных видов подсемейства Scilloideae (*Lachenalia congesta* (AB625560.1), *Polyxena paucifolia* (AB305012), *Prospero autumnale* (KF873571.1)). Кроме того, в ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН был взят растительный материал видов *Scilla siberica*, *Muscari matritensis*, *Asparagus officinalis* (подсемейство Asparagoideae), который также использован в анализе.

Для проведения филогенетического анализа *A. regelianum* группой молекулярных методов анализа генома ФИЦ Биотехнологии РАН были предоставлены нуклеотидные последовательности ITS1-5.8S-ITS2, *ndhJ*-*trnL*, *trnC*-*petN* других представителей рода *Allium* различных подродов и секций (в скобках указаны номера каталогов или сорт):

- подрод *Allium*, секция *Allium* (*A. ampeloprasum* (03-43-0193-10, 03-27-0001-80), *A. atrovioleaceum* (2520), *A. baeticum* (5646), *A. commutatum* (1662), *A. erubescens* (6234), *A. iranicum* (6384), *A. leucanthum* (6827), *A. longicuspis* (04-34-0065-20), *A. polyanthum* (5628), *A. porrum* (Премьер), *A. pseudoampeloprasum* (5975), *A. pyrenaicum* (1248), *A. rotundum* (09-41-0011-20), *A. scorodoprasum* (2290), *A. sativum* (74Kirgiz), *A. tuncelianum* (05-13-0020-20);
- подрод *Amerallium*, секция *Arctoprasum* (*A. ursinum*);
- подрод *Butomissa*, секция *Butomissa* (*A. odorum* (Априор));

- подрод *Cera* секция *Cera* (*A. altaicum* (3088), *A. cera* (Каскад), *A. fistulosum* (1776));
- подрод *Cera* секция *Schoenoprasum* (*A. schoenoprasum* (Медонос));
- подрод *Polyprason* секция *Oreiprasum* (*A. obliquum* (2092));
- Подрод *Rhizirideum* секция *Rhizirideum* (*A. nutans* Лидер).

Образцы *A. ampeloprasum*, *A. atrovioleaceum*, *A. baeticum*, *A. commutatum*, *A. erubescens*, *A. iranicum*, *A. leucanthum*, *A. longicuspis*, *A. polyanthum*, *A. pseudoampeloprasum*, *A. pyrenaicum*, *A. rotundum*, *A. scorodoprasum*, *A. tuncelianum* взяты из коллекции Н.Фризена и Р.Фритча (Германия); *A. porrum*, *A. odorum*, *A. altaicum*, *A. cera*, *A. fistulosum*, *A. schoenoprasum*, *A. obliquum*, *A. nutans* – из коллекции ВНИИССОК; *A. sativum* – из коллекции ВИР; *A. ursinum* – из коллекции ГБС.

2.10 Статистический анализ данных

Статистический анализ данных, полученных с помощью монолокусных и мультилокусных маркеров

Подсчет фрагментов в спектрах был произведен вручную. В статистический анализ были включены только четкие, воспроизводимые фрагменты. Для проверки воспроизводимости фрагментов реакции ПЦР (а также рестрикции) были проведены в 2-х кратной повторности. Результаты анализа были представлены в виде бинарной матрицы в программе Microsoft Excel, где 1 – наличие фрагмента, 0 – отсутствие.

Показатели внутривидового разнообразия (число эффективных аллелей, информационный индекс Шеннона и ожидаемая гетерозиготность), а также уровни межвидовых различий (генетические расстояния Нея между популяциями, уровень подразделенности и анализ молекулярной дисперсии) были определены с помощью макроса GenAlEx 6.41 [Peakall, Smouse, 2006] и программы POPGEN 1.32 [Yeh, Boyle 1997]. В программе Microsoft Excel были рассчитаны среднее число аллелей (μ) и доля редких аллелей (h_r) в популяциях по формулам Животовского (Животовский, 1991). Показатель μ – показывает, сколько в популяции разных фенотипов и изменяется от 1 (монотипное распределение) до m (при равных частотах всех генотипов), где m – количество аллелей. Показатель h_r равен нулю, если распределение частот аллелей равномерное, при неравномерности, этот показатель больше нуля.

На основании бинарных матриц в программе PAST 3.16 [Hammer et al., 2001] были рассчитаны коэффициенты генетического сходства Дайса между образцами. Коэффициент сходства Дайса не учитывает одновременное отсутствие полосы как показатель сходства для

сравнения образцов [Laurentin, 2009]. На основе рассчитанных индексов сходства Дайса были проведены анализы методом главных координат. Статистическая оценка достоверности была подсчитана методом бутстреп-анализа по 1000 реплик.

Анализ структуры популяций проводили с помощью байесовской кластеризации в программе Structure v.2.3.4 [Pritchard et al., 2000]. Параметры анализа были следующими: количество тестируемых кластеров (K) от 1 до 10, каждый с 5 повторностями, смешанная модель популяции (admixture), с независимыми частотами аллелей локусов (independent allele frequencies), отжиг (burn-in) 500000 шагов, суммарное количество шагов марковских цепей методом Монте-Карло (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 500000. Последующий выбор оптимального количества кластеров осуществляли с помощью сервиса Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) методами максимального правдоподобия и ΔK , который оценивает степень разброса значений логарифма вероятности разбиения для каждого K [Earl, 2012].

Сходство результатов, полученных с помощью разных методов, было проверено с помощью теста Мантеля, выполненного в программе PAST 3.16. Так, был рассчитан коэффициент корреляции между матрицами попарных значений индексов генетического сходства Дайса, а также между матрицами значений генетических расстояний Нея между популяциями, полученными по результатам разных методов (Приложение 11, 12, 13).

Анализ полиморфизма некодирующих последовательностей генома

Полученные первичные последовательности анализировали с помощью программ Chromas 1.45 и MEGA 6.0 [Tamura et al., 2013]. Построение дендрограмм проводили методом Neighbor joining с использованием трехпараметрической модели Тамуры, в программе MEGA 6.0. Вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК была построена с помощью программы mFold [Zuker, 2003].

Глава 3 Результаты и обсуждение

3.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *Bellevallia sarmatica*

3.1.1 Анализ полиморфизма некодирующих последовательностей ядерного и хлоропластного генома *B. sarmatica*

Для определения уровня внутривидового полиморфизма и уточнения таксономического статуса *B. sarmatica* был проведен анализ последовательностей ядерного (ядерного рибосомального оперона ITS1-5.8S-ITS2) и хлоропластного генома (спейсеры *ndhJ-trnL*, *trnC-petN*). В анализ были взяты семь образцов *B. sarmatica* из популяций Калачевского (№36 и №41), Клетского (№1), Кумылженского (№20), Серафимовичского (№10 и №15), Суровикинского (№28) районов Волгоградской области.

3.1.1.1 Анализ полиморфизма ITS- последовательностей *B. sarmatica* и родственных видов подсемейства Scilloideae

У всех взятых в анализ образцов *B. sarmatica* последовательность ядерного рибосомального оперона ITS1-5.8S-ITS2 была амплифицирована и секвенирована. Полученные последовательности были депонированы в базу данных NCBI под следующими номерами: №1 (KT898142), №10 (KT898140), №15 (KT898139), №20 (KT898144), №28 (KT898141), №36 (KT898143), №41 (KT898138).

Также, для филогенетического анализа были амплифицированы, секвенированы последовательности ITS1-5.8S-ITS2 *Scilla siberica*, *Muscari matritensis* и *Asparagus officinalis* (подсемейство Asparagoideae). Нуклеотидные последовательности ITS1-5.8S-ITS2 данных видов тоже депонированы в базу данных NCBI (*A. officinalis* (KT898135), *M. natritensis* (KT898136), *S. siberica* (KT898137)).

Кроме того, для анализа межвидового полиморфизма, а также определения положения *B. sarmatica* внутри рода, из базы данных NCBI были взяты последовательности ITS1-5.8S-ITS2 пяти видов *Bellevallia* (см. Материалы и методы).

Выравнивание последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 изучаемых видов приведено в Приложении 5.

Общая длина последовательности ITS1-5.8S-ITS2 у анализируемых видов Scilloideae варьировала от 596 п.н. у *B. sarmatica* до 628 п.н. у *A. officinalis*, GC-состав - от 62% (*B. sarmatica*) до 72 % (*P. autumnale*). Всего для 11 видов было выявлено 286 (42,7%) переменных позиций, из которых 172 парсимонически-информативных.

Анализ внутривидового полиморфизма B. sarmatica. Длина ITS-последовательностей *B. sarmatica* варьировала незначительно (от 596 п.н. до 598 п.н.), различия связаны с однонуклеотидными делециями. У образцов *B. sarmatica* в последовательностях ITS спейсеров было выявлено 7 SNPs: A/T₁₆, A/G₂₅, A/C₂₆, C/T₆₇, C/T₁₁₇, A/G₅₅₃, G/A₅₇₆. Последовательность гена 5.8S рРНК была инвариантна.

Уровень внутривидовой изменчивости у *B. sarmatica* составил 1,3%, что, исходя из небольшого размера выборки растений, а также учитывая ограниченность территории сбора образцов, можно считать относительно высоким показателем. На дендрограмме (Рисунок 3.1), все семь образцов *B. sarmatica* образуют единый кластер (ИБ=100), внутри которого анализируемые образцы разделяются на три группы, причем в каждую из этих групп попали растения, представляющие различные популяции. Интересно отметить, что образцы *B. sarmatica*, представляющие популяции Калачевского (№36 и №41) и Серафимовичского (№10 и №15) районов попадают в разные группы.

Анализ межвидового полиморфизма и определение положения вида B. sarmatica внутри рода Bellevalia. Анализ ITS последовательностей 6 видов *Bellevalia* позволил выявить ряд родоспецифичных замен и инделей в последовательности спейсера ITS1, включающих замены (C/T₈₃, T/G₁₂₂), однонуклеотидную инсерцию (C) в положении 150 и четырехнуклеотидную делецию в положении 211.

На дендрограмме все взятые в анализ виды рода *Bellevalia* образуют единый кластер (ИБ=96) (Рисунок 3.1). При этом анализируемые виды *Bellevalia* формируют два четких, достаточно удаленных друг от друга подкластера. Первый подкластер образуют виды секции *Bellevalia* - *B. romana* и *B. pelagica* (ИБ=100). Второй подкластер с ИБ=100, образуют представители секции *Nutantes* – *B. dubia*, *B. trifoliata* и *B. webbiana*, также включающие образцы *B. sarmatica*. Представители двух секций, образующие разные подкластеры, отличаются друг от друга 36 SNPs и двумя однонуклеотидными делециями. Таким образом, полученные данные позволяют отнести вид *B. sarmatica* к секции *Nutantes*.

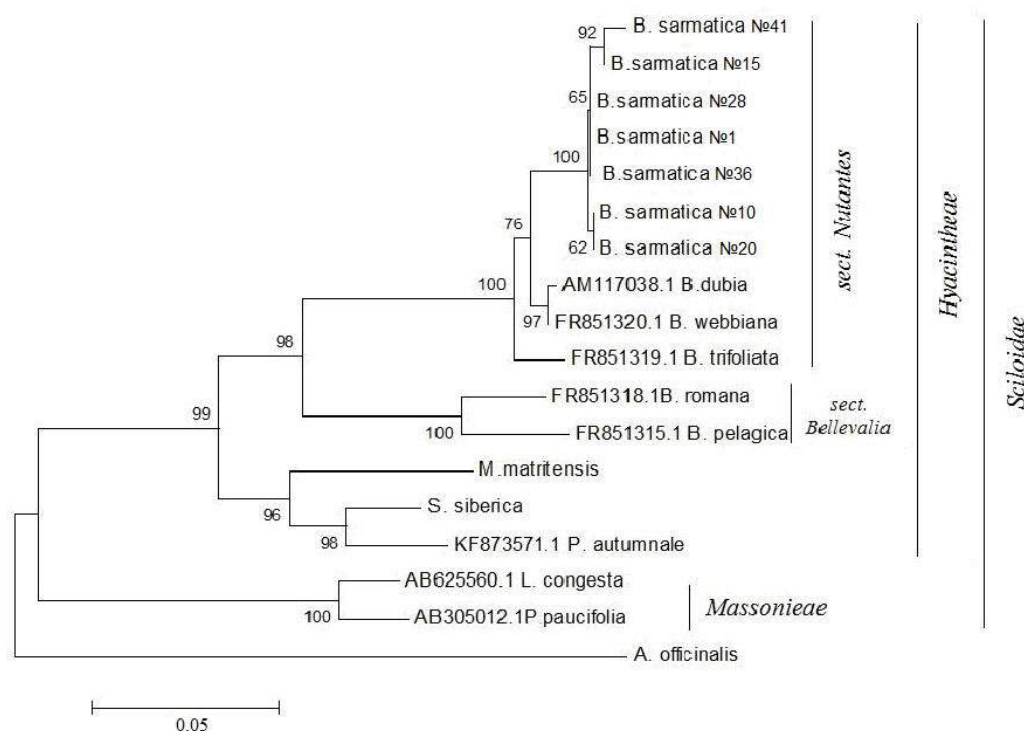


Рисунок 3.1. Дендрограмма, построенная по результатам анализа последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 у анализируемых видов Scilloideae, методом Neighbor Joining. Масштабный отрезок показывает число нуклеотидных замен на один сайт.

Анализ филогенетических отношений *B. sarmatica* внутри секции *Nutantes* показал наибольшее сходство *B. sarmatica* с видами *B. webbiana* и *B. dubia* (96,7% гомологии), но при этом следует отметить большую обособленность *B. sarmatica* от этих видов (Рисунок 3.1). Для *B. sarmatica* были выявлены 6 видоспецифичных SNPs (G/T₄₈, C/T₉₃, C/T₁₀₉, G/A₁₂₈, C/A₁₅₂, G/C₂₁₇), однонуклеотидная инсерция G₂₂₂ и трехнуклеотидная индель в положении 224, в то время как образцы *B. webbiana* и *B. dubia* отличаются друг от друга только по одной точковой замене.

Как показано на Рисунке 3.1, виды рода *Bellevalia* образуют общий кластер (ИБ=98) с представителями других родов трибы Hyacintheae, а представители родов *Lachenalia* и *Polyxena* трибы Massonieae образуют отдельный кластер. Также у видов *L. congesta* и *P. paucifolia* трибы Massonieae в спейсере ITS2 идентифицирована вставка 26 и 23 п.н. соответственно, отличающая их от видов трибы Hyacintheae. Таким образом, проведенный нами анализ ITS-последовательностей подтверждает разделение подсемейства Scilloideae на две трибы, как и отмечалось ранее [Pfosser et al., 1999].

В отличие от ITS спейсеров, последовательность гена 5.8S является более консервативной, что связано, прежде всего, с функциональностью 5.8S рРНК. Длина

последовательности гена 5.8S рРНК у всех анализируемых Scilloideae составила 164 п.н. у *A. officinalis*, *L. congesta* и *P. paucifolia* и 165 п.н. у всех остальных образцов. GC-состав варьировал от 53,7% у *A. officinalis* до 57% у *P. autumnale*.

Для исследуемых видов в последовательности данного гена было идентифицировано 14 SNPs (8%). При этом интересно, что ген 5.8S рРНК у представителей рода *Bellevallia* отличался значительной вариабельностью: было выявлено 7 SNPs (4,2%), локализованных преимущественно на 5'-конце гена. Таким образом, уровень межвидового полиморфизма был только в два раза меньше, чем между представителями триб Hyacintheae и Massonieae.

Интересно отметить различия, выявленные в последовательности гена 5.8S у секций рода *Bellevallia*. Так, для видов секции *Bellevallia* (*B. romana* и *B. pelagica*) было выявлено три однонуклеотидные замены, отличающие эти виды от видов секции *Nutantes*. Также у вида *B. trifoliata* из секции *Nutantes* в последовательности гена 5.8S рРНК выявлено две видоспецифичные транзиции (C/T₅ и C/T₆₁).

Вторичная структура 5.8S рРНК у B. sarmatica. С помощью программы mFold построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *B. sarmatica* (Рисунок 3.2). Рибосомные РНК образуют специфические вторичные структуры, с которыми ассоциируются рибосомные белки. Эти рибопотеиновые комплексы имеют большое значение в процессе правильной сборки рибосом и последующей трансляции. Вторичная структура гена 5.8S рРНК состоит из четырех петель – 1a, 1b, 2 и 3. На Рисунке 3.2 серым фоном выделены консервативные мотивы и отмечены нуклеотидные замены, идентифицированные у взятых в анализ видов. Петля 1b включает присущий всем высшим растениям высоко консервативный 14-нуклеотидный мотив 5'-GAAUUGCAGAAUCC-3' [White et al., 1990, Harpke and Peterson, 2008].

SNPs, идентифицированные у взятых в анализ представителей подсемейства Scilloideae, локализованы преимущественно в районе третьей шпильки, которая не содержит консервативных мотивов. Выявленные нуклеотидные замены не меняют топологию шпильки (Рисунок 3.2).

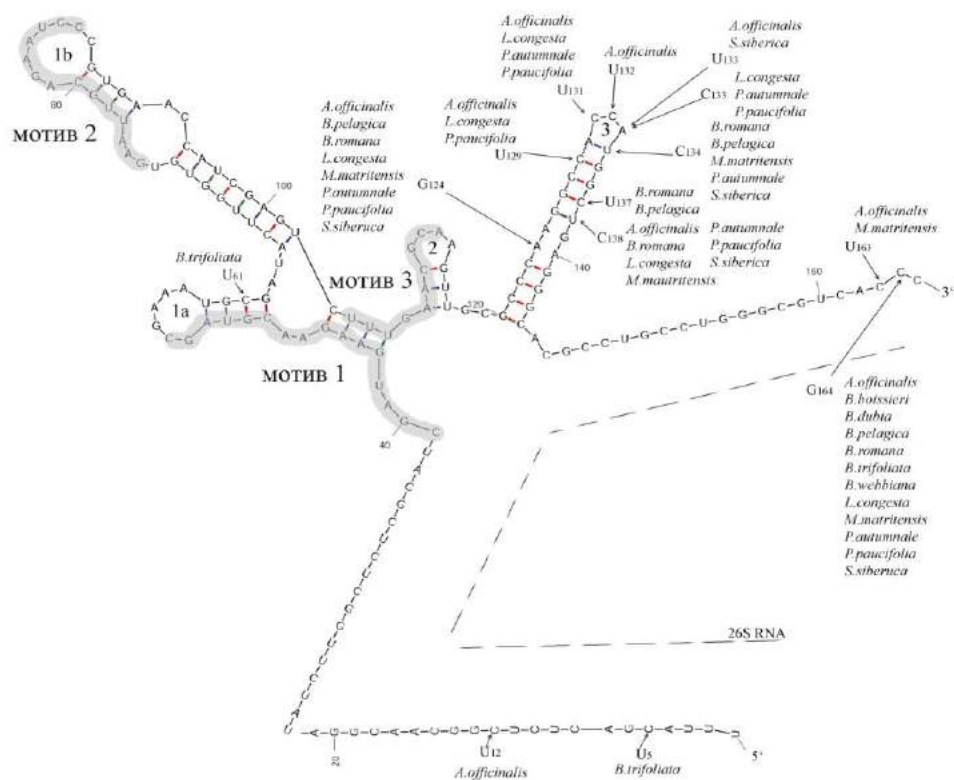


Рисунок 3.2. Вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *B. sarmatica*.

3.1.1.2 Анализ полиморфизма последовательностей хлоропластного генома *B. sarmatica*

Для проведения анализа внутривидового полиморфизма хлоропластного генома у *B. sarmatica* были выбраны межгенные спейсеры *ndhJ-trnL* и *trnC-petN*.

Данные последовательности были амплифицированы и секвенированы у 7 образцов *B. sarmatica*.

Последовательности данных спейсеров других представителей рода *Bellevia* и подсемейства Scilloideae для анализа межвидового полиморфизма в базах данных найдены не были. Поэтому был оценен лишь уровень внутривидовой вариабельности.

Пластидный спейсер *trnC-petN*. Длина данного спейсера варьировала от 763 п.н. до 764 п.н., что связано с наличием однонуклеотидной делеции у образцов №15 и 28 (Серафимовичского и Суровикинского районов) в положении 712. Кроме того, у изучаемых образцов *B. sarmatica* выявлены 3 SNPs: C/T₂₂₁, C/T₃₆₅, G/C₆₆₃. Замены в положении 221 и 663 отличают образцы из Клетского (№1), Кумылженского (№20) и Калачевского районов (№36,41), а замена в положении 365 – образец №10 из Серафимовичского района. Уровень

внутривидовой вариабельности у *B. sarmatica* составил 0,4%. Выравнивание последовательностей *trnC-petN* изучаемых видов приведено в Приложении 6.

Пластидный спейсер *ndhJ-trnL*. Длина данного участка составила 749 п.н. и была инвариантна. Выравнивание последовательностей *ndhJ-trnL* изучаемых видов приведено в Приложении 7.

Полиморфизм проанализированных участков хлоропластного генома *B. sarmatica* оказался крайне низким, поэтому их нельзя рекомендовать для анализа внутривидового разнообразия этого вида.

3.1.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *B. sarmatica* методами мультилокусного анализа

3.1.2.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *B. sarmatica* с помощью RAPD-анализа

В результате RAPD-анализа 41 образца *B. sarmatica* было идентифицировано 175 фрагментов, 171 (97,7%) фрагмент оказался полиморфным. Спектр фрагментов, полученный в результате RAPD-анализа *B. sarmatica* представлен на Рисунке 3.3.

Число ДНК фрагментов, амплифицируемых одним праймером, составило от 8 (OPD02) до 20 (OPD01). Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймеров OPA03 и OPD01 (18), минимальное – OPD02 (8). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером, колебался в пределах от 84,6% (для праймера OPK10) до 100% (для праймеров OPA03, OPD02, OPD03, OPD06, OPD12, OPE05, OPK09, OPN13, OPN15, OPN19). Подробная информация об информативности праймеров приведена в Приложении 2.

Кроме того, были выявлены 2 уникальных фрагмента, специфичных для популяции Кумылженского района: первый фрагмент получен с праймером OPD01 (№20, размер 1000 п.н.), второй – с праймером OPD02 (№8, размер 650 п.н.). Эти фрагменты можно использовать для создания генетического паспорта популяции.

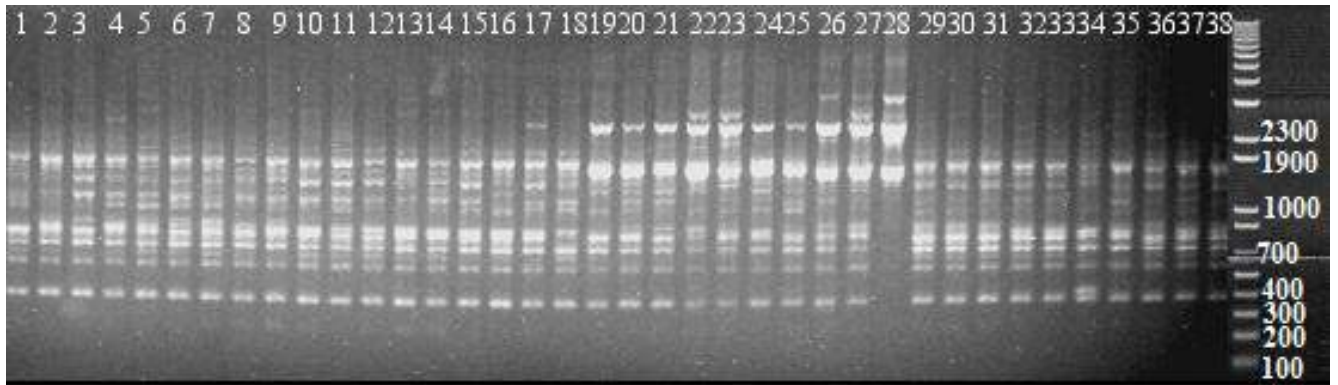


Рисунок 3.3. RAPD-спектр образцов *B. sarmatica*, полученный с использованием праймера OPN19 (фрагмент геля). 1-9 – популяция Клетского р-на; 10-18 – популяция Серафимовичского р-на; 19-27 – популяция Кумылженского р-на, 28-33 – популяция Суровикинского р-на, 34-38 – популяция Калачевского р-на. Крайняя правая дорожка – маркер молекулярных масс.

Определение уровня внутрипопуляционного полиморфизма. При оценке показателей внутрипопуляционного разнообразия *B. sarmatica* наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяции Калачевского района, а для популяции Кумылженского района отмечены высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности (Таблица 3.1). Наиболее генетически однородной по показателям эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности была популяция из Клетского района. Анализируя среднее число аллелей и долю редких аллелей в популяциях, можно сказать, что наиболее равномерно частоты аллелей распределены в популяции Серафимовичского района, для данной популяции в большинстве случаев наблюдается наибольшее среднее число аллелей и наименьшая доля редких аллелей. Наибольшая доля редких аллелей и соответственно наименьшее среднее число аллелей отмечено для популяции Калачевского района.

Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной по этому показателю оказалась популяция из Калачевского района, наименее – популяция из Серафимовичского района.

Кроме того, были рассмотрены индексы генетического сходства Дайса между всеми образцами (для оценки межпопуляционного разнообразия и сравнения его с внутрипопуляционным). Максимальное значение данного индекса (0,88) выявлено между образцами №5 (популяция Клетского р-на) и №14 (популяция Серафимовичского р-на), минимальное (0,51) – между №22 (популяция Кумылженского р-на) и №40 (популяция Калачевского р-на). Таким образом, диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из Калачевской популяции практически сопоставим с диапазоном для всей выборки, что говорит о достаточном генетическом разнообразии внутри этой популяции.

Таблица 3.1. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *B. sarmatica*, рассчитанные по результатам RAPD-анализа.

Показатель	Популяция					
	Калачевский р-н	Клетский р-н	Кумылженский р-н	Суворовинский р-н	Серафимовичский р-н	Общая выборка
% полиморфизма	73,71	56,57	70,86	64,57	57,14	97,70
Число эффективных аллелей, n_e , $\pm Se^*$	1,490 $\pm$ 0,029	1,375 $\pm$ 0,030	1,528 $\pm$ 0,031	1,469 $\pm$ 0,031	1,391 $\pm$ 0,030	1,451 $\pm$ 0,014
Информационный индекс Шеннона, I , $\pm Se$	0,410 $\pm$ 0,021	0,314 $\pm$ 0,023	0,421 $\pm$ 0,022	0,378 $\pm$ 0,023	0,323 $\pm$ 0,023	0,369 $\pm$ 0,010
Ожидаемая гетерозиготность, H_e , $\pm Se$	0,278 $\pm$ 0,015	0,213 $\pm$ 0,016	0,291 $\pm$ 0,016	0,260 $\pm$ 0,016	0,220 $\pm$ 0,016	0,252 $\pm$ 0,007
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu^{**}$	1,577 $\pm$ 0,212	1,581 $\pm$ 0,214	1,651 $\pm$ 0,191	1,633 $\pm$ 0,234	1,742 $\pm$ 0,178	1,780 $\pm$ 0,079
Доля редких аллелей, $h_\mu \pm S_h^{**}$	0,211 $\pm$ 0,106	0,209 $\pm$ 0,107	0,174 $\pm$ 0,095	0,183 $\pm$ 0,117	0,129 $\pm$ 0,089	0,110 $\pm$ 0,040
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,57- 0,83	0,71- 0,86	0,67- 0,83	0,70- 0,86	0,73- 0,86	0,51- 0,88

*Se – стандартная ошибка; ** S_μ и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Определение уровней межпопуляционных различий. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *B. sarmatica* варьировал от 0,045 (между популяциями из Клетского и Серафимовичского района) до 0,252 (между популяциями из Калачевского и Кумылженского района). Наибольшие значения генетических расстояний наблюдались между популяцией из Кумылженского района и остальными популяциями (Таблица 3.2).

Анализ генетической структуры пяти изученных популяций *B.sarmatica* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_s) составила 0,252, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) – 0,344. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,266. Показатель генного потока составил $Nm=1,383$.

Проведенный анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что в составе общей генетической гетерогенности вида 25% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия и 75% составляет доля внутривидового полиморфизма.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием демонстрирует корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *B. sarmatica* ($R^2=0,3994$, $p=0,03$).

Таблица 3.2. Индексы генетических расстояний Ней между популяциями *B.sarmatica*, рассчитанные по результатам RAPD-анализа.

Популяция Калачевского р- на	Популяция Клетского р-на	Популяция Кумылженского р-на	Популяция Суrowикинского р-на	Популяция Серафимовичск ого р-на	
0,184	0				Популяция Клетского р-на
0,252	0,195	0			Популяция Кумылженского р- на
0,155	0,102	0,231	0		Популяция Суrowикинского р-на
0,198	0,045	0,215	0,107	0	Популяция Серафимовичского р-на

Далее с помощью программы PAST 3.09, на основе индексов генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.4).

На графике главных координат, построенном по результатам RAPD- анализа, образцы бельвалии формировали 3 группы (Рисунок 3.4). Наиболее заметно обособленную группу сформировали образцы из Кумылженского района (группа 1). Эта популяция и географически наиболее удалена от остальных. Еще одну группу сформировали популяции Клетского и Серафимовичского районов (группа 2). В эту же группу попали четыре образца из популяции Суrowикинского района. Другие образцы из этой же популяции формируют, вместе с образцами из Калачевского района, третью группу (группа 3).

Такое подразделение популяций в целом совпадает с их географическим расположением. Однако, интересно положение образцов из популяции Суrowикинского р-на. Географически эта популяция располагается ближе к популяции Клетского р-на, но генетически часть образцов близки к популяции Калачевского района.

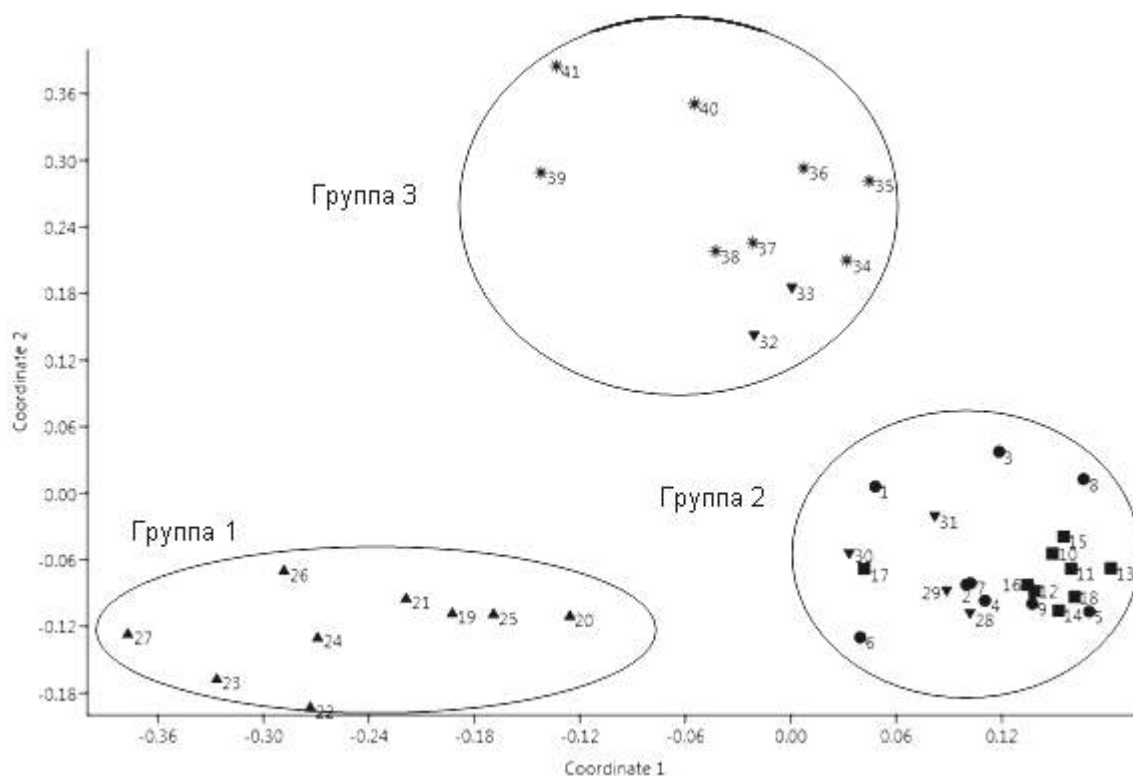


Рисунок 3.4. Дифференциация изучаемых образцов *B. sarmatica*, выявленная по данным RAPD-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами - номера образцов: 1-9(●) – популяция Клетского р-на; 10-18(■) – популяция Серафимовичского р-на; 19-27(▲) – популяция Кумылженского района, 28-33(▼) – популяция Суrowикинского р-на, 34-41(*) – популяция Калачевского р-на.

Анализ популяционной структуры *B. sarmatica* проведен в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью методов *deltaK*, наилучшие результаты были получены для $K=3$ (Рисунок 3.5). На Рисунке 3.6 представлена кластеризация популяций *B. sarmatica* при $K=3$. Кластеризация образцов в большей степени совпадает с группировкой, полученной при использовании метода главных координат. Образцы бельвалии делятся на три группы: 1- образцы из Клетского и Серафимовичского р-на; 2- образцы Кумылженского р-на; 3- образцы Калачевского р-на. Популяцию Суrowикинского р-на сложно четко отнести к одной из групп, однако большая часть образцов попадает в первый кластер.

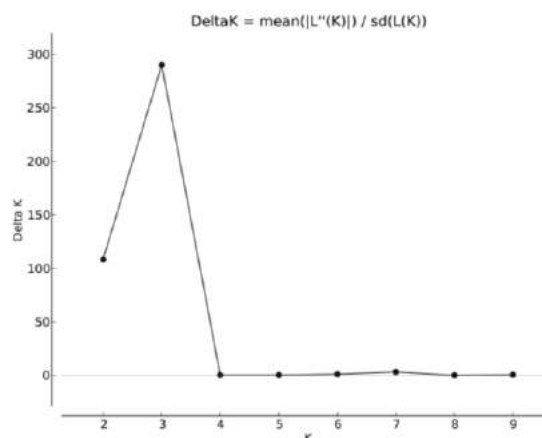


Рисунок 3.5. График параметра *deltaK* в зависимости от числа кластеров.

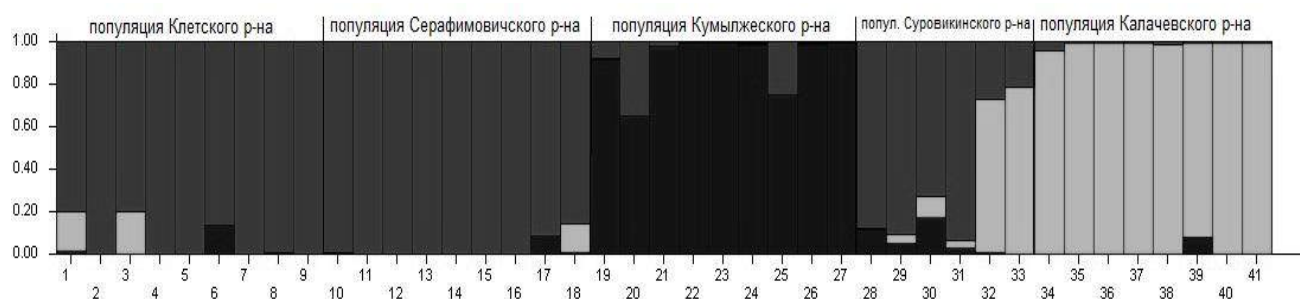


Рисунок 3.6. Вероятность отнесения исследованных образцов *B. sarmatica* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=3$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы.

3.1.2.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *B. sarmatica* с помощью ISSR-анализа

В результате ISSR-анализа 41 образца *B. sarmatica* было идентифицировано 87 фрагментов, 69 (68,9%) из них оказались полиморфными. Число фрагментов, амплифицируемых одним праймером, составило от 12 (UBC826) до 17 (UBC841). На Рисунке 3.7 представлен спектр фрагментов, полученный в ходе ISSR-анализа *B. sarmatica*.

С помощью праймеров UBC841 и UBC811 получено максимальное число полиморфных фрагментов (13), а с помощью праймеров UBC807 и UBC873 – минимальное (10). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером колебался в пределах от 76,5% (для праймера UBC841) до 91,7% (для праймера UBC826) (данные об информативности каждого праймера приведены в Приложении 2). Фрагментов, специфичных для какой-либо популяции, выявлено не было.

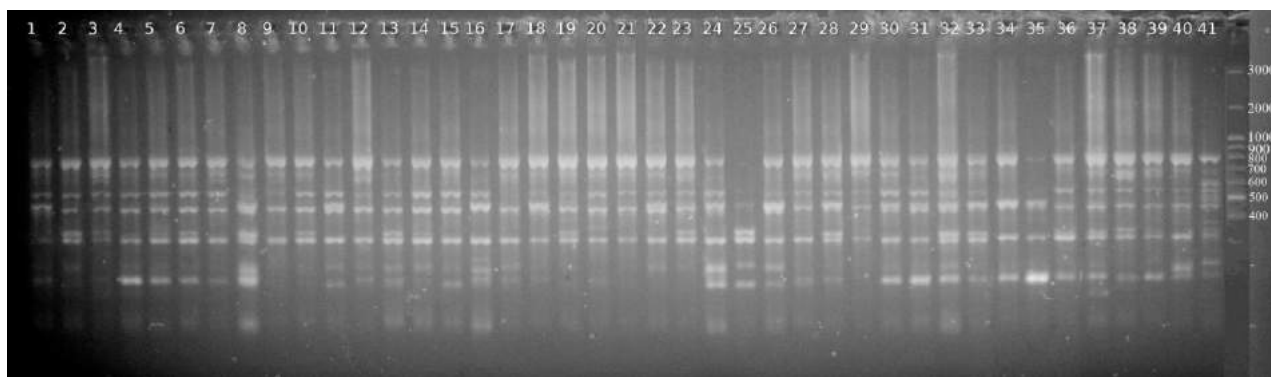


Рисунок 3.7. ISSR–спектр образцов *B. sarmatica*, полученный с использованием праймера UBC826 (фрагмент геля). 1-9 – популяция Клетского р-на; 10-18 – популяция Серафимовичского р-на; 19-27 – популяция Кумылженского р-на, 28-33 – популяция Суровикинского р-на, 34-41 – популяция Калачевского р-на. Крайняя правая дорожка – маркер молекулярных масс.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. При оценке показателей генетического разнообразия внутри каждой популяции было выявлено, что популяция из Серафимовичского района наиболее генетически однородна, а популяции Калачевского и Суровикинского районов наиболее разнообразны. Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяции Калачевского и Суровикинского района, наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности выявлены для популяции Суровикинского района (Таблица 3.3). Наименьшие значения всех рассматриваемых показателей отмечены для популяции Серафимовичского района, за исключением среднего числа аллелей в популяции и доли редких аллелей. Для этой популяции отмечено наибольшее среднее число аллелей, а доля редких аллелей в этой популяции минимальна. Среди исследованных популяций минимальное значение среднего числа аллелей отмечено у популяции Клетского района, а доля редких аллелей в этой популяции самая большая. Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция из Калачевского района, наименее – популяция из Клетского района (Таблица 3.3).

Максимальное значение индекса генетического сходства Дайса между всеми образцами составило 0,92 (выявлено между образцами №9 (популяция Клетского р-на) и №14 (популяция Серафимовичского р-на)), а минимальное 0,58 (между №22 (популяция Кумылженского р-на) и №36 (популяция Калачевского р-на)). По данным ISSR-анализа диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами всей выборки больше, чем для отдельных популяций.

Таблица 3.3. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *B. sarmatica*, рассчитанные по результатам ISSR-анализа.

Показатель	Популяция					
	Калачевский р-н	Клетский р-н	Кумылженский р-н	Суворовский р-н	Серафимовичский р-н	Общая выборка
% полиморфизма	63,22	54,02	58,62	63,22	51,72	68,9
Число эффективных аллелей, $n_e \pm Se^*$	1,414 $\pm$ 0,042	1,381 $\pm$ 0,044	1,427 $\pm$ 0,045	1,470 $\pm$ 0,045	1,355 $\pm$ 0,042	1,410 $\pm$ 0,020
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	0,349 $\pm$ 0,031	0,312 $\pm$ 0,033	0,343 $\pm$ 0,033	0,375 $\pm$ 0,033	0,294 $\pm$ 0,033	0,335 $\pm$ 0,015
Ожидаемая гетерозиготность, $H_e \pm Se$	0,236 $\pm$ 0,022	0,214 $\pm$ 0,023	0,236 $\pm$ 0,023	0,259 $\pm$ 0,023	0,201 $\pm$ 0,023	0,229 $\pm$ 0,010
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu^{**}$	1,497 $\pm$ 0,230	1,486 $\pm$ 0,224	1,527 $\pm$ 0,217	1,573 $\pm$ 0,250	1,617 $\pm$ 0,208	1,681 $\pm$ 0,085
Доля редких аллелей, $h_r \pm S_h^{**}$	0,251 $\pm$ 0,115	0,257 $\pm$ 0,112	0,236 $\pm$ 0,108	0,214 $\pm$ 0,125	0,192 $\pm$ 0,104	0,159 $\pm$ 0,042
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,67-0,86	0,78-0,90	0,76-0,89	0,74-0,86	0,77-0,90	0,58-0,92

*Se – стандартная ошибка; ** S_μ и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Определение уровней межпопуляционных различий. Проведенный анализ межпопуляционных различий *B. sarmatica* выявил достаточно низкие значения индекса генетических расстояний Нея. Минимальное расстояние (0,041) было отмечено между популяциями из Клетского и Серафимовичского района, а максимальное расстояние (0,226) – между популяциями из Калачевского и Кумылженского района) (Таблица 3.4).

Анализ генетической структуры пяти изученных популяций *B. sarmatica* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_s) составила 0,229, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) составила 0,314. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,270. Показатель генного потока составил $Nm=1,349$.

Проведенный анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что 25% от общего генетического разнообразия *B. sarmatica* приходится на межпопуляционные различия, а 75% на внутривидовые.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием демонстрирует достаточно высокую ($R^2=0,4505$) и статистически значимую ($p=0,030$) корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *B. sarmatica*.

Таблица 3.4. Индексы генетических расстояний Нея между популяциями *B. sarmatica*, рассчитанные по результатам ISSR-анализа.

Популяция Калачевского р-на	Популяция Клетского р-на	Популяция Кумылженског о р-на	Популяция Суrowикинско го р-на	Популяция Серафимовичс кого р-на	
0,167	0				Популяция Клетского р-на
0,226	0,175	0			Популяция Кумылженского р- на
0,136	0,084	0,203	0		Популяция Суrowикинского р- на
0,188	0,041	0,187	0,093	0	Популяция Серафимовичского р-на

Далее на основе коэффициентов генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.8).

На графике главных координат, построенном по результатам данных ISSR- анализа, образцы бельвалии можно объединить в 3 группы, однако, границы между группами нечеткие (Рисунок 3.8). В первую группу можно объединить образцы из Кумылженского района (группа 1), во вторую группу – образцы из Клетского, Серафимовичского и Суrowикинского районов (группа 2), в третью группу – образцы из Калачевского района (группа 3).

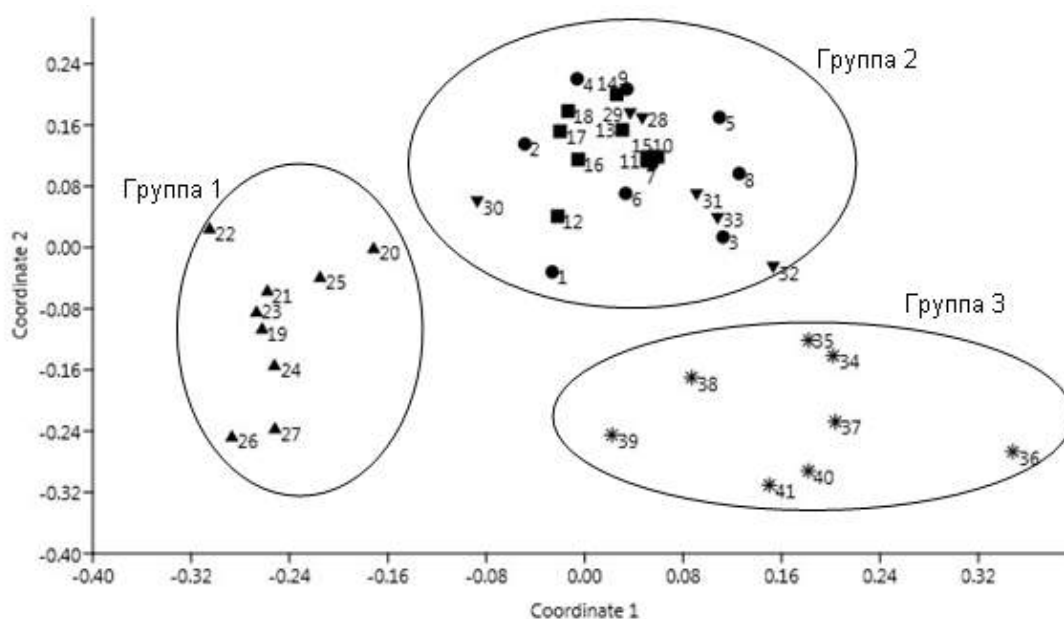


Рисунок 3.8. Дифференциация изучаемых образцов *B.sarmatica*, выявленная по данным ISSR-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами - номера образцов: 1-9(●) – популяция Клетского р-на; 10-18(■) – популяция Серафимовичского р-на; 19-27(▲) – популяция Кумылженского р-на, 28-33(▼) – популяция Суровикинского р-на, 34-41(*) – популяция Калачевского р-на.

Также был проведен анализ популяционной структуры *B. sarmatica* в программе Structure. Оптимальное количество кластеров составило три ($K=3$) (Рисунок 3.9). На Рисунке 3.10 представлена кластеризация популяций *B. sarmatica* при $K=3$. Образцы из Клетского и Серафимовичского р-на образуют первую группу, образцы Кумылженского р-на образуют вторую группу, а образцы Калачевского р-на – третью. В образцах из популяции Суровикинского района преобладает компонент первой группы, однако, присутствует и компонент третьей группы. В целом дифференциации образцов на графике главных координат и в программе Structure сходны.

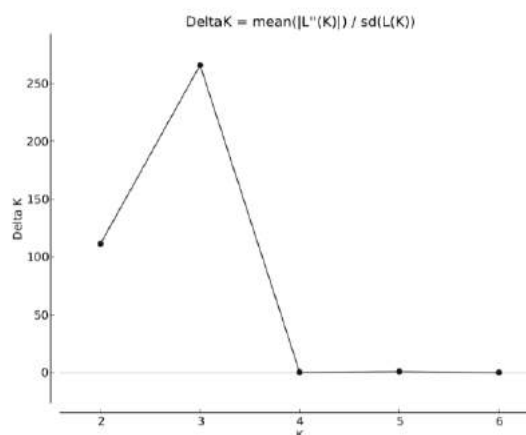


Рисунок 3.9. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

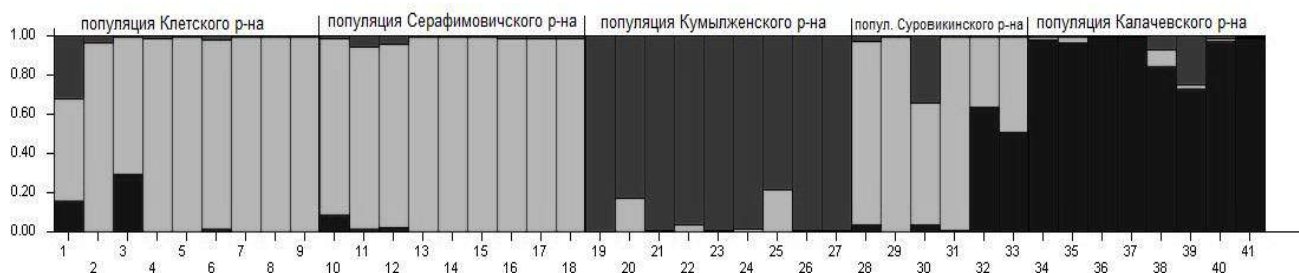


Рисунок 3.10. Вероятность отнесения исследованных образцов *B. sarmatica* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=3$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы.

Такая дифференциация образцов в целом соответствует географическому положению образцов. Наиболее удаленные друг от друга популяции (Калачевского и Кумылженского районов) образовали отдельные группы, наиболее близко расположенные друг к другу популяции (Клетского и Серафимовичского районов) объединялись в одну группу.

3.1.2.3 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *B. sarmatica* с помощью AFLP-анализа

При проведении AFLP-анализа 41 образца *B. sarmatica* было получено 143 фрагмента, 131 (91,6%) из которых оказался полиморфным. Число ДНК фрагментов, амплифицируемых одной комбинацией праймеров составило от 45 (E_{35}/M_{55}) до 52 (E_{32}/M_{32}). Фрагмент AFLP-спектра *B. sarmatica* представлен на Рисунке 3.11.

Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью комбинации праймеров E_{32}/M_{32} (48), минимальное – E_{35}/M_{52} (40). Уровень полиморфизма, выявляемого одной комбинацией праймеров колебался в пределах от 86,96% (E_{35}/M_{52}) до 95,56% (E_{35}/M_{55}) (данные об информативности комбинаций праймеров приведены в Приложении 2).

Кроме того, был выявлен уникальный фрагмент, специфичный для популяции Кумылженского района. Этот фрагмент получен с помощью комбинации праймеров E_{35}/M_{52} , его размер 320 п.н.



Рисунок 3.11. AFLP-спектр образцов *B. sarmatica*, полученный с использованием комбинации праймеров E₃₅/M₅₂ (фрагмент геля). 1-9 – популяция Клетского р-на; 10-18 – популяция Серафимовичского р-на; 19-27 – популяция Кумылженского р-на, 28-33 – популяция Суровикинского р-на, 34-40 – популяция Калачевского р-на.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяции *B. sarmatica* из Кумылженского района, наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона, ожидаемой гетерозиготности, среднего числа аллелей также были выявлены для этой популяции. Для популяции из Суровикинского района были отмечены наиболее низкие показатели внутрипопуляционного полиморфизма, кроме показателя доли редких аллелей. Данный показатель имел минимальное значение в популяции Клетского района.

Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция из Кумылженского района, наименее – популяция из Клетского района (Таблица 3.5).

Индекс генетического сходства Дайса между всеми образцами варьировал от 0,87 – между образцами №32 и №33 (популяция Суровикинского р-на) до 0,38 – между образцами №23 (популяция Кумылженского р-на) и №29 (популяция Суровикинского р-на). Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами всей выборки больше, чем для отдельных популяций.

Таблица 3.5. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *B. sarmatica*, рассчитанные по результатам AFLP-анализа.

Показатель	Популяция					
	Калачевский р-н	Клетский р-н	Кумылженский р-н	Суrowикийский р-н	Серафимовичский р-н	Общая выборка
% полиморфизма	65,93	54,81	77,04	47,41	54,07	91,60
Число эффективных аллелей, $ne \pm Se^*$	1,379 $\pm$ 0,032	1,334 $\pm$ 0,032	1,503 $\pm$ 0,034	1,305 $\pm$ 0,033	1,356 $\pm$ 0,035	1,375 $\pm$ 0,031
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	0,336 $\pm$ 0,024	0,291 $\pm$ 0,025	0,420 $\pm$ 0,023	0,258 $\pm$ 0,025	0,295 $\pm$ 0,026	0,320 $\pm$ 0,015
Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	0,223 $\pm$ 0,017	0,195 $\pm$ 0,017	0,284 $\pm$ 0,017	0,174 $\pm$ 0,018	0,201 $\pm$ 0,018	0,215 $\pm$ 0,011
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu^{**}$	1,576 $\pm$ 0,206	1,570 $\pm$ 0,215	1,745 $\pm$ 0,179	1,578 $\pm$ 0,257	1,664 $\pm$ 0,200	1,749 $\pm$ 0,085
Доля редких аллелей, $h_\mu \pm S_h^{**}$	0,212 $\pm$ 0,103	0,215 $\pm$ 0,107	0,127 $\pm$ 0,089	0,211 $\pm$ 0,128	0,168 $\pm$ 0,100	0,126 $\pm$ 0,042
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,58-0,85	0,73-0,83	0,51-0,83	0,69-0,87	0,73-0,85	0,38-0,87

*Se – стандартная ошибка; ** S_μ и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Определение уровней межпопуляционных различий. Изучаемые популяции *B. sarmatica* достаточно сходны генетически. Так, наибольшее значение индекса генетических расстояний Нея составило 0,228 и наблюдалось между популяциями Кумылженского и Клетского районов, а наименьшее (0,064) наблюдалось между Суrowикийской и Калачевской популяциями (Таблица 3.6).

Для изучаемой выборки *B. sarmatica* показано, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,215, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) не превышала 0,304. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,291. Показатель генного потока составил $Nm=1,215$.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что в составе общей генетической гетерогенности вида 24% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия и 76% составляет доля внутривидового полиморфизма.

Таблица 3.6. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *B.sarmatica*, рассчитанный по результатам AFLP-анализа.

Популяция Калачевского р-на	Популяция Клетского р-на	Популяция Кумылженского р-на	Популяция Суrowикинского р-на	Популяция Серафимовичского р-на	
0,166	0				Популяция Клетского р-на
0,159	0,228	0			Популяция Кумылженского р-на
0,064	0,163	0,191	0		Популяция Суrowикинского р-на
0,144	0,067	0,201	0,153	0	Популяция Серафимовичского р-на

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием не выявил статистически значимую корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *B. sarmatica*.

Далее на основе коэффициентов генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.12).

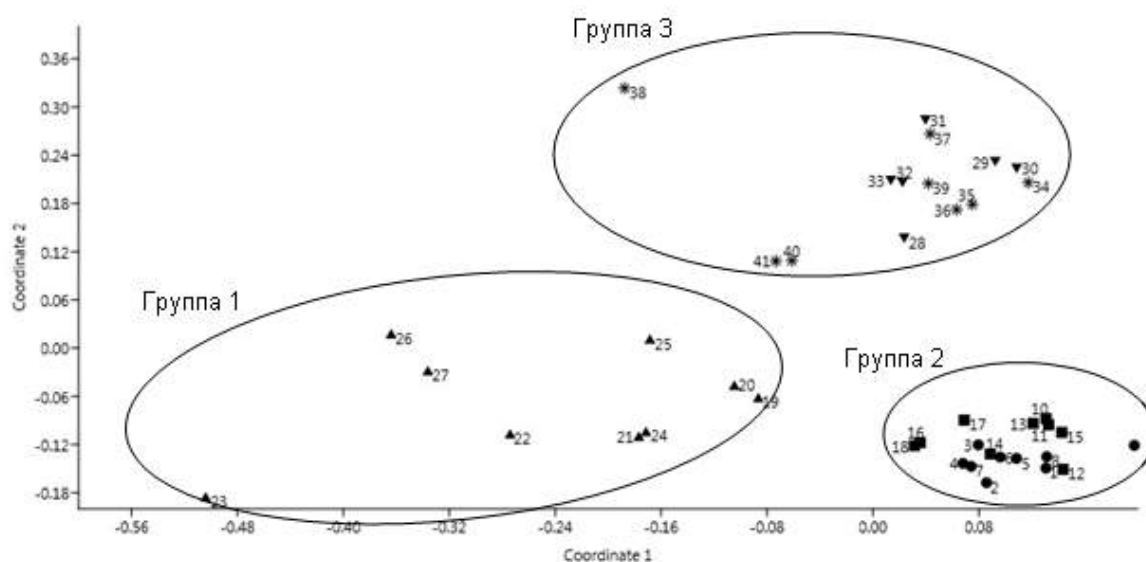


Рисунок 3.12. Дифференциация изучаемых образцов *B.sarmatica*, выявленная по данным AFLP-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-9(●) – популяция Клетского р-на; 10-18(■) – популяция Серафимовичского р-на; 19-27(▲) – популяция Кумылженского р-на, 28-33(▼) – популяция Суrowикинского р-на, 34-41(*) – популяция Калачевского р-на.

На графике главных координат, построенном по результатам AFLP-анализа, образцы бельвалии сформировали 3 группы (Рисунок 3.12). Образцы из популяции Кумылженского района можно объединить в первую группу. Данная группа, по сравнению с остальными, менее компактна, что говорит о разнообразии этой популяции (это подтверждается высокими показателями внутривидовой изменчивости). Вторую группу образуют популяции Серафимовичского и Клетского районов. Популяции Калачевского и Суровикинского района составляют третью группу. Здесь также можно говорить о достаточном разнообразии этой группы, несколько образцов из Калачевского р-на располагаются на графике немного отдельно от своей группы.

Анализ популяционной структуры *B. sarmatica* был также проведен в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество, на которые следует разделить исследуемые образцы, равнялось трем (Рисунок 3.13). На Рисунке 3.14 представлена кластеризация популяций *B.sarmatica* при $K=3$. На данном рисунке видно, что образцы из Кумылженского района формируют отдельную группу, а еще две группы формируют образцы из Клетского и Серафимовичского районов и образцы из Суровикинского и Калачевского района соответственно.

Данная дифференциация образцов в целом совпадает с их географическим расположением. Некоторые образцы Калачевского и Кумылженского районов включают компоненты другого кластера. Как и на графике главных координат, эти образцы расположены немного отдельно от своей группы.

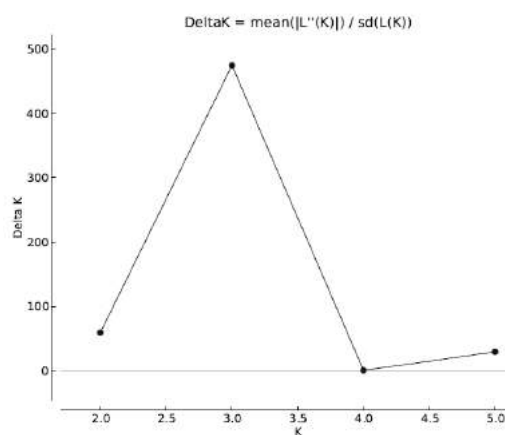


Рисунок 3.13. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.



Рисунок 3.14. Вероятность отнесения исследованных образцов *B. sarmatica* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=3$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы.

3.1.2.4 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *B. sarmatica* с помощью NBS-профайлинга

В результате NBS-профайлинга 41 образца *B. sarmatica* было идентифицировано 238 фрагментов, из которых 228 (95,8%) оказались полиморфными. Число ДНК фрагментов, амплифицируемых одной комбинацией праймеров составило от 60 (NBS3) до 178 (NBS2). На Рисунке 3.15 показан спектр фрагментов, полученный в результате проведения NBS-профайлинга образцов *B. sarmatica*.

С помощью комбинации NBS2/*Tru1I* получено 175 полиморфных фрагментов (98,3%), а с помощью комбинации NBS3/*Tru1I* – 53 (83,3%).

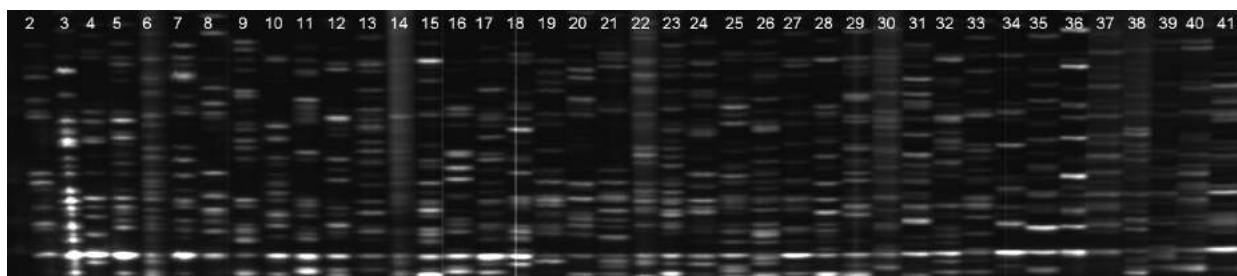


Рисунок 3.15. NBS-спектр образцов *B. sarmatica*, полученный с использованием комбинации NBS2/*Tru1I* (фрагмент геля). 2-9 – популяция Клетского р-на; 10-18 – популяция Серафимовичского р-на; 19-27 – популяция Кумылженского р-на, 28-33 – популяция Суровикинского р-на, 34-41 – популяция Калачевского р-на.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Наиболее высокий уровень полиморфизма, а также наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности были выявлены для популяции Кумылженского района. Максимальное среднее число аллелей в популяции и соответственно наименьшая доля редких аллелей отмечена для популяции Серафимовичского

района. Наименее разнообразной (по всем показателям) оказалась популяция Клетского района (Таблица 3.7). Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция из Калачевского района, наименее – популяция из Серафимовичского района (Таблица 3.7).

Таблица 3.7. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *B. sarmatica*, рассчитанные по результатам NBS-профайлинга.

Показатель	Популяция					
	Калачевский р-н	Клетский р-н	Кумылженский р-н	Суворовинский р-н	Серафимовичский р-н	Общая выборка
% полиморфизма	74,91	57,58	71,89	66,62	59,15	95,8
Число эффективных аллелей, $ne \pm Se^*$	$1,489 \pm 0,029$	$1,377 \pm 0,030$	$1,530 \pm 0,031$	$1,468 \pm 0,031$	$1,393 \pm 0,030$	$1,452 \pm 0,027$
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	$0,412 \pm 0,021$	$0,314 \pm 0,023$	$0,420 \pm 0,022$	$0,375 \pm 0,023$	$0,325 \pm 0,023$	$0,367 \pm 0,018$
Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	$0,278 \pm 0,015$	$0,215 \pm 0,016$	$0,290 \pm 0,016$	$0,261 \pm 0,016$	$0,222 \pm 0,016$	$0,254 \pm 0,013$
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_{\mu}^{**}$	$1,577 \pm 0,218$	$1,574 \pm 0,219$	$1,665 \pm 0,192$	$1,631 \pm 0,239$	$1,729 \pm 0,187$	$1,691 \pm 0,093$
Доля редких аллелей, $h_{\mu} \pm S_h^{**}$	$0,212 \pm 0,109$	$0,213 \pm 0,109$	$0,168 \pm 0,096$	$0,184 \pm 0,119$	$0,135 \pm 0,093$	$0,154 \pm 0,046$
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,58-0,81	0,71-0,83	0,65-0,80	0,71-0,82	0,72-0,83	0,48-0,84

*Se – стандартная ошибка; ** S_{μ} и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами всей выборки больше, чем для отдельных популяций.

Так, максимальное значение данного индекса (0,84) выявлено между образцами №5 (популяция Клетского р-на) и №14 (популяция Серафимовичского р-на), минимальное (0,48) – между №23 (популяция Кумылженского р-на) и №36 (популяция Калачевского р-на).

Определение уровней межпопуляционных различий. Для определения уровня межпопуляционных различий был вычислен индекс генетических расстояний Нея между популяциями *B. sarmatica*. Наибольшее значение индекса генетических расстояний Нея

наблюдалось между популяциями Кумылженского и Калачевского районов (0,256), наименьшее – между популяциями Серафимовичского и Клетского районов (0,052) (таблица 3.8).

Таблица 3.8. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *B. sarmatica*, рассчитанный по результатам NBS-профайлинга.

Популяция Калачевского р-на	Популяция Клетского р-на	Популяция Кумылженского р-на	Популяция Суровикинского р-на	Популяция Серафимовичского р-на	
0,185	0				Популяция Клетского р-на
0,256	0,193	0			Популяция Кумылженского р-на
0,157	0,104	0,230	0		Популяция Суровикинского р-на
0,198	0,052	0,216	0,108	0	Популяция Серафимовичского района

Анализ генетической структуры изученных популяций *B. sarmatica* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,251, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) не превышала 0,345. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,275. Показатель генного потока составил $Nm=1,381$.

Как показывает анализ молекулярной дисперсии (AMOVA), в составе общей генетической гетерогенности вида 23% генетического разнообразия *B. sarmatica* приходится на межпопуляционные различия и 77% составляет доля внутривидового полиморфизма.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием не выявил статистически значимой корреляции между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *B. sarmatica*.

На основе коэффициентов генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.16).

На графике главных координат, построенном по результатам NBS-профайлинга, можно выделить три группы образцов, которые сформировали образцы бельвалии сарматской (Рисунок 3.16). В первую группу можно выделить образцы из Кумылженского района. Эта популяция и географически наиболее удалена от остальных.

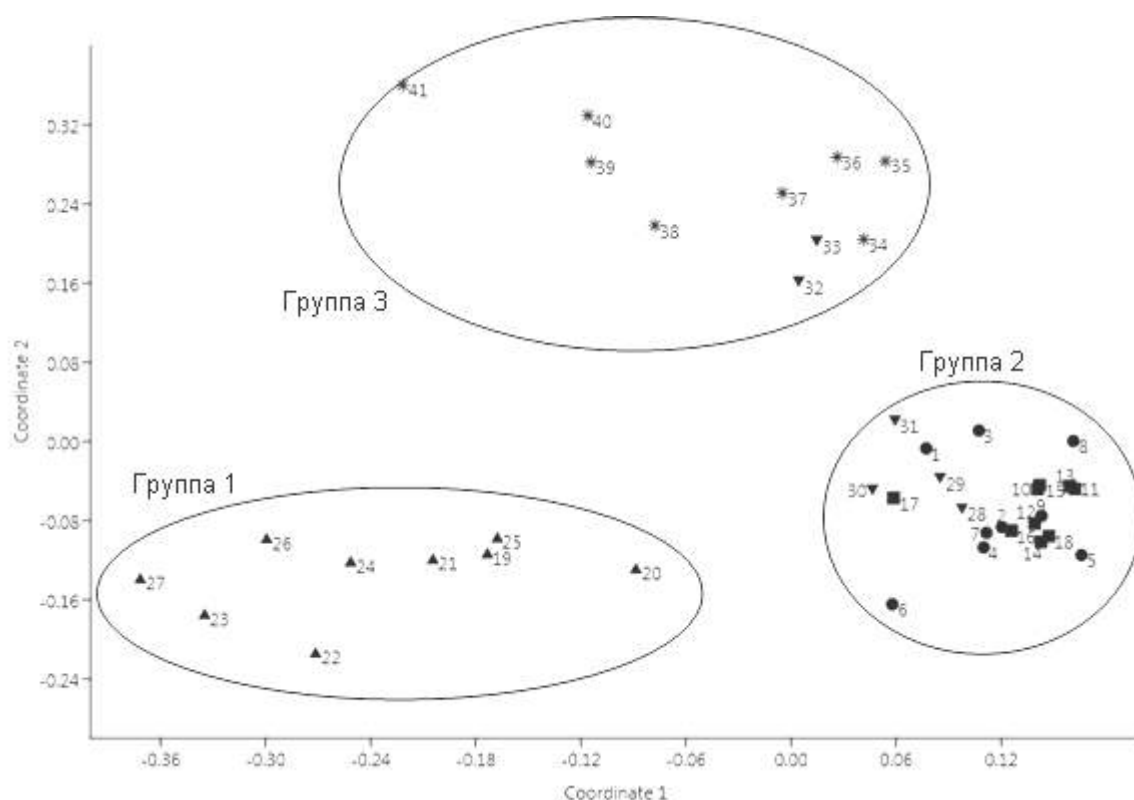


Рисунок 3.16. Дифференциация изучаемых образцов *B. sarmatica*, выявленная по данным NBS-профайлинга с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-9(●) – популяция Клетского р-на; 10-18(■) – популяция Серафимовичского р-на; 19-27(▲) – популяция Кумылженского р-на, 28-33(▼) – популяция Суrowsикинского р-на, 34-41(*) – популяция Калачевского р-на.

Вторую группу сформировали образцы из популяций Клетского и Серафимовичского районов. К этой же группе можно отнести четыре образца из популяции Суrowsикинского района (№28-31). Другие образцы из этой же популяции (№32,33) формируют, вместе с образцами из популяции Калачевского района, третью группу.

Кроме того, был проведен анализ популяционной структуры *B. sarmatica* в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров составило три (Рисунок 3.17). На Рисунке 3.18 представлена кластеризация популяций *B. sarmatica* при $K=3$. Кластеризация образцов в большей степени совпадает с группировкой, полученной при использовании метода главных координат. Изучаемые образцы делятся на три группы: первая группа – образцы из Клетского и Серафимовичского р-на; вторая группа – образцы Кумылженского р-на; третья группа – образцы Калачевского р-на. Часть образцов из популяции Суrowsикинского р-на можно отнести ко второй, а часть к третьей группе.

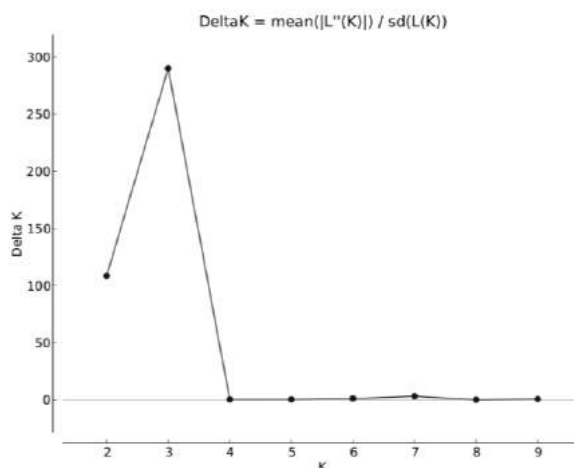


Рисунок 3.17. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

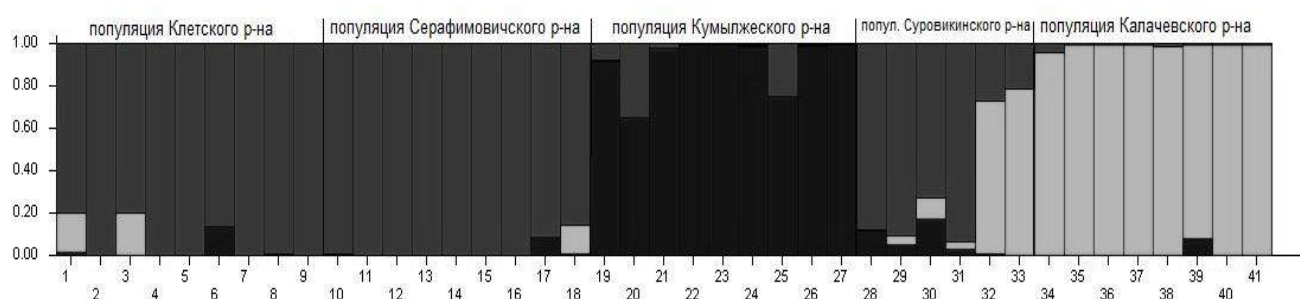


Рисунок 3.18. Вероятность отнесения исследованных образцов *B. sarmatica* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=3$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы (номера образцов указаны на Рисунке 3.16).

3.1.3 Сравнение результатов, полученных разными мультилокусными методами анализа

Для анализа генетического разнообразия популяций *B. sarmatica*, нами были выбраны методы мультилокусного анализа, такие как RAPD-, ISSR-, AFLP- анализ, а также NBS-профайлинг. Все использованные мультилокусные методы анализа позволили выявить полиморфизм исследуемых образцов.

Наиболее полиморфными оказались RAPD- и NBS-маркеры, наименее – ISSR (Таблица 3.9).

Показатели разнообразия внутри популяций *B. sarmatica*, а также для общей выборки, полученные с помощью разных методов, в целом сопоставимы (Таблица 3.10), что говорит о достоверности полученных с помощью каждого метода данных и возможности их использования как в комплексе, так и по отдельности.

Таблица 3.9. Общие данные по разнообразию *B. sarmatica*, полученные с помощью каждого из методов анализа.

Показатель	Тип маркера			
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS
Число праймеров	12	6	3	2
Число фрагментов	175	87	143	238
Уровень полиморфизма, %	97,7	68,9	91,6	95,8

Таблица 3.10. Показатели разнообразия для общей выборки *B. sarmatica*, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.

Показатель	Тип маркера			
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS
Число эффективных аллелей, n_e	1,451	1,410	1,375	1,452
Информационный индекс Шеннона, I	0,369	0,335	0,320	0,367
Ожидаемая гетерозиготность, H_e	0,252	0,229	0,215	0,254
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu$	1,780	1,681	1,749	1,691
Доля редких аллелей, $h_\mu \pm S_h$	0,110	0,159	0,126	0,154
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,51-0,88	0,58-0,92	0,38-0,87	0,48-0,84

Анализируя межпопуляционное разнообразие, также можно отметить сходство результатов, полученных разными методами (Таблица 3.11). Наибольший уровень подразделенности отмечается при AFLP-анализе, наименьший – при RAPD. Диапазон генетических расстояний H_e между популяциями больше всего при RAPD-анализе и NBS-профайлинге, меньше всего – при ISSR.

Дифференциация образцов *B. sarmatica* на графиках главных координат и в программе Structure также сходна для всех применяемых мультилокусных методов. Все изучаемые популяции *B. sarmatica* делятся на три группы: первая – популяция Кумылженского района, вторая – популяции Клетского и Серафимовичского, третья – популяция Калачевского района. Различия возникают по положению образцов *B. sarmatica* из популяции Суровикинского района. При RAPD-анализе и NBS-профайлинге часть образцов из этой популяции относится ко второй, часть образцов к третьей группе. При ISSR-анализе эта популяция на графике главных координат приближена к третьей группе, а при анализе в программе Structure часть образцов имеют компоненты и второй и третьей группы. При AFLP-

анализе данная популяция относится ко второй группе. Результаты дифференциации образцов, проведенной по данным NBS-профайлинга, в целом не отличаются от дифференциации, полученной с помощью данных других мультилокусных методов.

Таблица 3.11. Показатели межпопуляционной дифференциации *B. sarmatica*, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.

Показатель	Тип маркера			
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS
Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S)	0,252	0,229	0,215	0,251
Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T)	0,344	0,314	0,304	0,345
Подразделенность популяций (G_{ST})	0,266	0,270	0,291	0,275
Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) доля межпопуляционной изменчивости/доля внутривидовой изменчивости, %	25/75	25/75	24/76	23/77
Диапазон значений индекса генетических расстояний Нея между популяциями	0,045-0,252	0,041-0,226	0,064-0,228	0,052-0,256

Кроме того, анализ методом главных координат был также проведен на основе объединенных данных всех мультилокусных методов (Рисунок 3.19). Расположение образцов на данном графике больше совпадает с графиком, построенном на основе данных RAPD-анализа и NBS-профайлинга.

Между матрицами значений индекса генетического сходства Дайса и генетических расстояний Нея, рассчитанными по результатам разных методов выявлена статистически значимая, положительная корреляция (Приложение 11).

Таким образом, все применяемые методы анализа позволили получить достоверные, воспроизводимые сходные друг с другом результаты, что говорит о возможности применения каждого из них как по отдельности, так и в комплексе. Наиболее информативным методом оказался NBS-профайлинг (с его помощью выявлено больше всего полиморфных фрагментов), однако данный анализ был проведен на специальном оборудовании с использованием флуоресцентно-меченных праймеров, что препятствует его широкому использованию. Методы AFLP- и RAPD-анализа также оказались достаточно эффективным при исследовании разнообразия *B. sarmatica*. Наименее информативным из применяемых методов был ISSR.

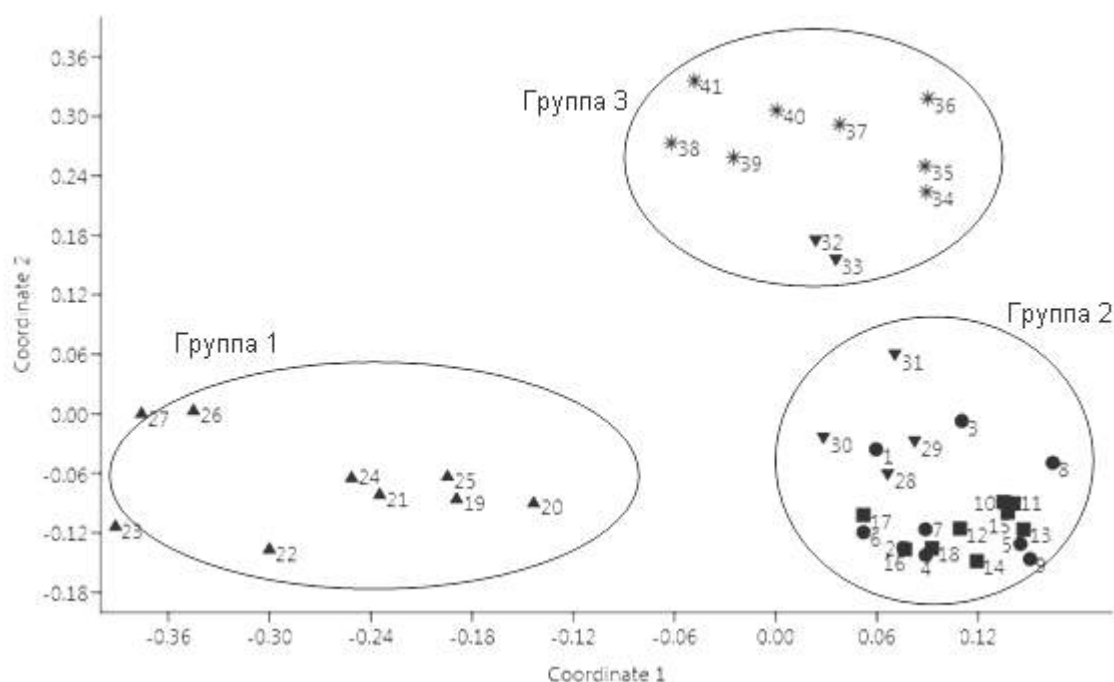


Рисунок 3.19. Дифференциация изучаемых образцов *B. sarmatica*, выявленная по объединенным данным мультилокусных методов анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-9(●) – популяция Клетского р-на; 10-18(■) – популяция Серафимовичского р-на; 19-27(▲) – популяция Кумылженского р-на, 28-33(▼) – популяция Суровикинского р-на, 34-41(*) – популяция Калачевского р-на.

3.1.4 Обсуждение результатов, полученных при изучении генетического разнообразия *B. sarmatica*

Было проанализировано генетическое разнообразие редкого вида *B. sarmatica*, произрастающего на территории Волгоградской области, с помощью мультилокусных методов (RAPD, ISSR, AFLP, NBS), а также проанализирован полиморфизм отдельных участков генома *B. sarmatica*.

С помощью анализа полиморфизма нуклеотидной последовательности ядерного рибосомального оперона (ITS1-5.8S-ITS2) у *B. sarmatica* и других родственных видов подсемейства Scilloideae удалось определить филогенетическое положение *B. sarmatica* внутри рода *Bellevalia*. *B. sarmatica* относится к трибе Hyacintheae, секции *Nutantes* (Рисунок 3.1). Наиболее близкими видами являются *B. webbiana* и *B. dubia*. Также построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *B. sarmatica*. Топология вторичной структуры молекулы 5.8S рРНК у *B. sarmatica* аналогична предложенной и описанной ранее для представителей родов *Poa* [Носов и др., 2008], *Cyperus* [Xiao et al., 2010], *Amaranthus* [Слугина и др., 2014].

Анализ последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 и пластидного спейсера *trnC-petN* у *B. sarmatica* позволил также выявить внутривидовой полиморфизм. Он составил 0,4% - для участка *trnC-petN* и 1,3% для ITS1-5.8S-ITS2. Интересно отметить, что и у других представителей рода *Bellevia* внутривидовой полиморфизм различается существенно. Так, у образцов видов *B. webbiana* и *B. dubia*, собранных на небольшой территории острова Сицилия, уровень внутривидовой вариабельности ITS-спейсеров оказался довольно высоким – 11,3% и 5,1% соответственно, в то время как у *B. boissieri*, образцы которого были собраны на территории Италии и Греции, уровень внутривидовой вариабельности составил лишь 0,7% [Borzatti Von Loewenstern et al., 2013].

Все использованные мультилокусные методы анализа позволили выявить полиморфизм исследуемых образцов. Каждый из анализируемых образцов *B. sarmatica* был охарактеризован специфичным спектром фрагментов.

Уровень внутривидового полиморфизма был довольно высоким и составил от 68,9% (по результатам ISSR-анализа) до 97,7% (по результатам RAPD-анализа). При анализе генетического разнообразия 21 образца *Lachenalia bulbifera* (подсемейство *Scilloideae*, эндемик Южной Африки) был использован RAPD-анализ, получено 104 фрагмента, 88% из которых были полиморфны [Kleynhans and Spies, 2000].

При RAPD и AFLP-анализе были получены фрагменты, специфичные для популяции Кумылженского района, что можно использовать для создания генетического паспорта популяции.

Наибольший уровень разнообразия отмечен в популяциях Кумылженского и Калачевского районов, а по результатам ISSR-анализа и в популяции Суровикинского района. Для популяций Серафимовичского и Клетского районов отмечен меньший уровень разнообразия, а по результатам AFLP-анализа и для популяции Суровикинского района. Также интересно отметить, что наиболее однородно частоты аллелей распределены в популяции Серафимовичского и Кумылженского района (эти популяции в большинстве случаев имели наибольшее среднее число аллелей и наименьшую долю редких аллелей), и соответственно наименее однородное распределение аллелей отмечено для популяции Клетского района и популяции Суровикинского района (по результатам AFLP-анализа).

Учитывая полученные данные о внутривидовом разнообразии (уровень гетерозиготности, информационном индексе Шеннона) можно говорить об относительно благополучном состоянии популяций *B. sarmatica*. Так, значения ожидаемой гетерозиготности у других редких видов порядка *Piperia yadonii*, произрастающего в Калифорнии, ISSR-анализ, выполненный

в 2006 и 2007 гг., показал, что уровень ожидаемой гетерозиготности равен 0,062 (в 2006) и 0,059 (в 2007) [George et al., 2009]. Уровень ожидаемой гетерозиготности другого редкого вида подсемейства *Scilloideae*, *Muscari tenuiflorum*, рассчитанный по данным анализа полиморфизма четырех аллозимных локусов и AFLP-анализа, был немного выше, чем полученный нами ($H_e=0,348$ (аллозимные локусы), $H_e=0,245$ (AFLP)). Но, некоторые популяции данного вида имели и значительно более низкие показатели генетического разнообразия. Значения ожидаемой гетерозиготности для некоторых популяций *Muscari tenuiflorum* составили 0,110 (AFLP- анализ) и 0,077 (аллозимные локусы), а процент полиморфных локусов (при AFLP-анализе) – 21,9% [Hornemann et al., 2012]. По сравнению с эндемиком Средиземноморского бассейна *Leopoldia gussonei* ожидаемая гетерозиготность *B. sarmatica* также была выше (Уровень H_e у популяций *Leopoldia gussonei* составил 0,13) [Vandepitte et al., 2013]. О достаточном уровне разнообразия говорит и диапазон значений коэффициента генетического сходства Дайса (от 0,51-0,88 по результатам RAPD-анализа, до 0,38-0,87 по результатам AFLP-анализа).

Анализируя диапазон генетических расстояний N_{ST} между популяциями, можно сказать, что наиболее близкими генетически являются популяции Клетского и Серафимовичского районов (эти популяций и географически более близки друг к другу, чем остальные), а по результатам AFLP-анализа – популяции Калачевского и Суровикинского районов. Наиболее отдаленными генетически являются популяции Кумылженского и Калачевского района, а также Кумылженского и Клетского района. Популяция Кумылженского района наиболее удалена от остальных географически. В целом же генетические расстояния между популяциями *B. sarmatica* Волгоградской области были невысокими, так максимальное значение этой величины составило 0,252.

Уровень подразделенности популяций (G_{ST}) был на среднем уровне (около 30% для всех методов). Анализ молекулярной вариации показал, что на долю межпопуляционной изменчивости у *B. sarmatica* приходится не более 25%, а все остальные различия связаны с внутривидовой изменчивостью. Для других родственных видов, которые также являются редкими, значения уровня подразделенности были сопоставимы с полученными нами данными. Так, в ходе анализа разнообразия популяций *Muscari tenuiflorum*, уровень межпопуляционных различий составил 26% (данные AFLP-анализа) и 17% (данные по аллозимным локусам) [Hornemann et al. 2012]. Для *Leopoldia gussonei* уровень подразделенности составил 30% [Vandepitte et al., 2013], для *Piperia yadonii* межпопуляционные различия составили 40% от общей гетерогенности вида [George et al., 2009]. При изучении разнообразия популяций эндемика *Nolina parviflora* (*Asparagaceae*), произрастающего на

территории Мексиканского вулканического пояса, с помощью анализа ядерных и хлоропластных участков ДНК, показатели подразделенности популяций были различны. Так, были обнаружены значения $G_{ST}=0,702$ (при анализе хлоропластных участков) и $G_{ST}=0,295$ (при анализе участков ядерной ДНК). Авторы связывают эту высокую подразделенность с особенностями местности (гористая местность) и с тем, что семена этого растения переносятся ветром, а пыльца насекомыми [Ruiz-Sanchez, Specht, 2013].

Такой уровень подразделенности *B. sarmatica* может быть объяснен наличием изоляции расстоянием. Тест Мантеля в некоторых случаях (RAPD- и ISSR-анализ) показывал положительную корреляцию между географическими и генетическими расстояниями.

Анализируя дифференциацию образцов *B. sarmatica* на графиках главных координат, а также результаты анализа в программе Structure, полученные по результатам применяемых методов, можно говорить о наличии трех групп популяций.

Первую группу составляют образцы из Кумылженской популяции. Эта популяция географически наиболее удалена от остальных и, кроме того, для нее идентифицированы специфичные фрагменты и зафиксированы наибольшие генетические расстояния от других популяций. Вторую группу образуют образцы из Калачевского района. Чаще всего эта группа наименее компактна, что говорит о достаточном разнообразии внутри популяции (это подтверждается и показателями внутрипопуляционной изменчивости, а также диапазоном индекса генетического сходства Дайса между образцами). Третья группа объединяет образцы из популяций Клетского и Серафимовичского районов. Положение образцов из популяции Суровикинского района по данным разных методов отличается. По результатам ISSR-анализа данная популяция скорее относится к третьей группе образцов (популяции Клетского и Серафимовичского районов) (Рисунок 3.8), а по результатам AFLP-анализа – ко второй группе образцов (популяция Калачевского района) (Рисунок 3.12). RAPD-анализ, NBS-профайлинг, а также анализ, проведенный по объединенным данным, показали, что часть образцов *B. sarmatica* из суровикинской популяции можно объединить со второй группой (популяция Калачевского района), а часть образцов с третьей (популяции Клетского и Серафимовичского районов) (Рисунок 3.4, Рисунок 3.16, Рисунок 3.19). Географически суровикинская популяция располагается между популяциями Калачевского и Клетского районов. Поэтому, можно предположить, что популяция Суровикинского р-на, образовалась из генотипов популяций Калачевского, Серафимовичского и Клетского районов или же до сих пор существует обмен генами между этими популяциями.

Такая дифференциация популяций позволяет говорить о том, что существует пространственная изоляция образцов *B.sarmatica*. Это наиболее проявляется для популяции

Кумылженского района. Данная популяция наиболее удалена от других географически и по результатам всех проводимых анализов была достаточно обособлена. Для оставшихся популяций эффект изоляции расстоянием проявляется в меньшей степени. Можно предположить, что в прошлом эти популяции представляли собой единую популяцию или их ареалы были шире и существовал интенсивный обмен генами, однако со временем ареал единой популяции фрагментировался или же ареал отдельных популяций сокращался, и поток генов уменьшился. В настоящий момент мы наблюдаем географически изолированные, но еще не сильно различающиеся в генетическом плане популяции, между которыми, возможно, существует поток генов, что вполне вероятно, учитывая, что *B.sarmatica* перекрестноопыляемое растение, анемофил.

При выработке стратегии сохранения *B. sarmatica* необходимо сохранить популяции из каждой группы популяций, выявленной в ходе генетического анализа. В программу по сохранению следует включить популяцию Кумылженского района, как наиболее уникальную в генетическом плане, а также высокополиморфную, кроме того, популяцию Суровикинского района (она включает генотипы разных групп популяций). Среди популяций Серафимовичского и Клетского районов, вероятно, можно выбрать любую, т.к. генетически они схожи. При выборе популяций для отбора необходимо учитывать также данные полевых исследований, данные о демографической структуре популяций, особенности произрастания растений. Также необходимо продолжить мониторинг (в том числе и за генетическим разнообразием) популяций, что даст дополнительные сведения об изменениях популяций во времени и, возможно, основываясь на этих данных изменять стратегию сохранения.

Для отбора образцов при сохранении *ex situ* можно также использовать данные генетического анализа и выбирать наиболее генетически отдаленные образцы.

3.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *Allium regelianum*

3.2.1 Анализ полиморфизма некодирующих последовательностей ядерного и хлоропластного генома *A. regelianum* и родственных видов *Allium*

Для определения внутривидового полиморфизма *A. regelianum* и уточнения его таксономического статуса был проведен анализ последовательностей ядерного (ядерный рибосомальный оперон ITS1-5.8S-ITS2) и хлоропластного генома (спейсеры *ndhJ-trnL*, *trnC-petN*). В анализ были взяты 12 образцов *A. regelianum* из разных популяций Волгоградской области: №1, 4 (Быковский район, лиман Тажи), №11, 21 (Николаевский район, лиман Хреноватый), №30 (Николаевский район, лиман Медвежий), №41 (Николаевский район, лиман Богатырев), №43 (Иловлинский район, хутор Ерецкий), №44 (Фроловский район, хутор Выездинский), №70, 77 (Серафимовичский район, хутор Красноярский), №79 (Серафимовичский район, хутор Буерак-Поповский), №91 (Алексеевский район, станица Усть-Бузулукская).

Для анализа межвидового полиморфизма, а также определения положения *A. regelianum* внутри рода, группой молекулярных методов анализа генома ФИЦ Биотехнологии РАН были предоставлены нуклеотидные последовательности ITS1-5.8S-ITS2, *ndhJ-trnL*, *trnC-petN* других представителей рода *Allium* различных подродов и секций (см. Материалы и методы).

3.2.1.1 Анализ полиморфизма последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 *A. regelianum* и родственных видов *Allium*

У всех взятых в анализ образцов *A. regelianum* последовательность ядерного рибосомального оперона была амплифицирована и секвенирована. Выравнивания последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 изучаемых видов приведены в Приложении 8.

Общая длина последовательности ITS1-5.8S-ITS2 у анализируемых видов рода *Allium* варьировала от 570 п.н. у *A. schoenoprasum* до 584 п.н. у *A. odorum*. GC-состав – от 45,2% (*A. nutans*) до 49,1 % (*A. regelianum* №30).

Анализ внутривидового полиморфизма A. regelianum. Длина ITS-последовательностей *A. regelianum* была инвариантна и составила 580 п.н. У образцов *A. regelianum* в последовательностях ITS1-5.8S-ITS2 было выявлено 29 варьируемых позиций (5%), из

которых 15 – парсимонически-информативных. В последовательностях ITS1 и ITS2 было выявлено 25 SNPs, а в последовательности гена 5.8S рРНК – 4 SNPs. Четыре SNPs в гене 5.8S рРНК (T/C₂₃₇, A/G₂₅₂, G/T₃₇₀, G/C₃₈₆) локализовались преимущественно в начале и в конце гена. Однонуклеотидные замены были характерны как для отдельных образцов, так и для групп образцов. Например, шесть образец-специфичных замен отмечены для образца №43 (T/C₁, G/C₉₀, G/T₉₁, G/T₃₈₆, G/T₄₀₆, G/T₄₇₃), пять – для образца №4 (G/T₁₁₀, A/G₁₇₀, G/C₂₂₈, A/G₂₅₂, C/A₅₂₈), две – для образца №21 (T/A₄₉, C/G₅₄), одна – для образца №77 (T/A₉₉). Четыре замены отличали образцы №30, 70, 79 от других образцов (последовательности образцов №70 и 79 были идентичны и характеризовались 12 общими заменами), по одной замене отличались группы образцов №4, 43 и №11, 21, 91. Среднее значение индекса генетических расстояний между двумя образцами *A. regelianum* составило 0,016 и варьировало от 0 (между образцами №70 и 79) до 0,031 (между №70 и №43).

На дендрограмме (Рисунок 3.20), построенной по результатам анализа ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей, образцы *A. regelianum* образуют единый кластер (ИБ=100), внутри которого анализируемые образцы разделяются на несколько субкластеров, причем в каждый из этих субкластеров попали растения, представляющие различные популяции из разных районов. Также отметим, что растения из одной популяции попадали в разные субкластеры.

Анализ межвидового полиморфизма и определение положения вида A. regelianum внутри рода Allium. Анализ последовательности ITS1-5.8S-ITS2 24 видов рода *Allium* позволил выявить 312 (52,7%) переменных позиций, из которых 177 парсимонически-информативны. Длина последовательности спейсера ITS1 составила от 233 до 241 п.н., а ITS2 – от 177 до 183 п.н. В последовательности ITS1 выявлено 170 переменных позиций (69,7%), 92 полиморфные позиции были парсимонически-информативными. Последовательность спейсера ITS2 была чуть менее переменной, в ней выявлено 118 переменных сайтов (63,1%), 75 из них парсимонически-информативные.

Длина последовательности гена 5.8S была инвариантна и составила 164 п.н. Последовательность гена была более консервативной, чем последовательности спейсеров. Всего было выявлено 24 переменные позиции (15%) и они были представлены исключительно однонуклеотидными заменами. GC-состав варьировал от 49,4% у *A. altaicum* до 51,3% у *A. ursinum*, GC-состав *A. regelianum* в среднем составил 50,1%.

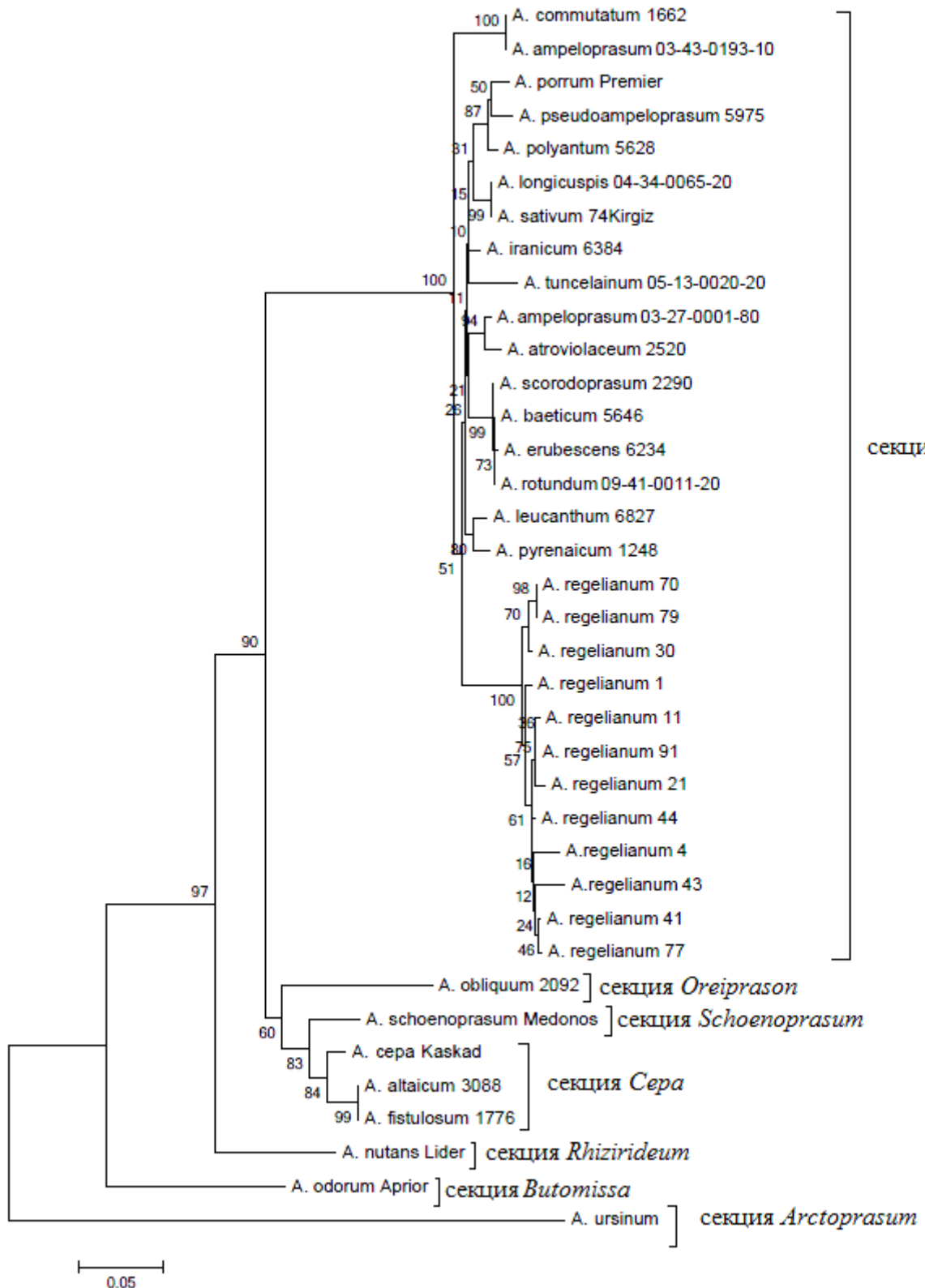


Рисунок 3.20. Дендрограмма, построенная по результатам анализа последовательности ITS1-5.8S-ITS2 у анализируемых видов рода *Allium*, методом Neighbor Joining. Масштабный отрезок показывает число нуклеотидных замен на один сайт.

На дендрограмме (Рисунок 3.20) изучаемые виды рода *Allium* образуют два кластера: первый образует один вид – *A. ursinum*, второй – все остальные виды. *A. ursinum* представляет

подрод *Amerallium*, секцию *Arctoprasum* и относится к первой эволюционной линии в отличие от других образцов, которые относятся к третьей эволюционной линии [Fritsch, 2001]. В последовательности *A. ursinum* выявлено много SNP и инделей. Так, в гене 5,8S обнаружено 9 видоспецифичных однонуклеотидных замен, в последовательности ITS1 – 44 однонуклеотидные замены и 2 однонуклеотидные индели, а в последовательности ITS2 – 35 замен и 2 индели.

Во втором кластере отдельные подкластеры образовали виды *A. odorum* (секция *Arctoprasum*), *A. nutans* (секция *Rhizirideum*). Также с индексом бутстрепа 60 формируется группа видов, представляющих секции *Oreiprasum* (*A. obliquum*), *Schoenoprasum* (*A. schoenoprasum*), и *Cepa* (*A. cepa*, *A. altaicum*, *A. fistulosum*).

Отдельный подкластер (ИБ=100) формируют образцы подрода *Allium*, секции *Allium*. К данному подкластеру относится и изучаемый нами вид – *A. regelianum*, что подтверждает существующую классификацию [Hanelt et al., 1992, Mathew, 1996]. Образцы данной секции отличаются 7 SNPs в последовательности ITS1 и 9 SNPs в последовательности ITS2, а также две однонуклеотидные замены в последовательности гена 5,8S (Т/А₃₅₈ и А/Т₃₇₇).

Разнообразие внутри секции *Allium* достаточно высоко, было выявлено 119 (20,1%) переменных позиций, 80 из них – парсимонически-информативные.

Образцы *A. regelianum* на дендрограмме образуют отдельный кластер (ИБ=100) (рисунок 3.20). Для *A. regelianum* выявлена одна видоспецифичная транзигия в гене 5,8S (С/Т₃₃₉), а также 7 видоспецифичных SNPs в последовательностях ITS1 и ITS2: Т/С₆₂, А/Г₁₂₅, Т/С₁₆₄, А/Т₄₂₄, А/Т₄₃₂, Т/А₄₄₈, А/С₅₀₂. *A. regelianum* показал наибольшее сходство с видом *A. pyrenaicum*, между ними отмечено наименьшее значение генетического расстояния (0,065). Вид *A. ampeloprasum*, который считается близким к *A. regelianum* (синоним *A. regelianum* – *A. ampeloprasum* var. *regelianum* (А.К.Беккер) Nyman) на дендрограмме расположен достаточно далеко, генетическое расстояние между видами составило 0,073. Однако следует отметить, что два образца *A. ampeloprasum*, взятые в анализ, на дендрограмме располагаются в разных подкластерах, что может говорить о том, что они достаточно разнообразны и, возможно, имеют гибридное происхождение, что затрудняет уточнение филогенетических отношений между видами.

Анализ филогенетических отношений внутри секции *Allium* установить довольно трудно, четких кластеров внутри данной секции не выявлено. Секция *Allium* является активно развивающейся, многие виды этой секции имеют общий ареал и могут скрещиваться друг с другом, и поэтому возникают трудности с установлением границ видов и значительно усложняется изучение филогении данной секции [Hanelt, 1996].

Вторичная структура гена 5.8S рРНК у *A. regelianum*. С помощью программы mFold построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *A. regelianum* (Рисунок 3.21). Вторичная структура гена 5.8S рРНК состоит из четырех петель – 1а, 1b, 2 и 3. На рисунке 3.21 серым фоном выделены консервативные мотивы и отмечены нуклеотидные замены, идентифицированные у взятых в анализ видов. Петля 1b включает присущий всем высшим растениям высоко консервативный 14-нуклеотидный мотив 5'-GAAUUGCAGAAUCC-3' [White et al., 1990, Harpke and Peterson, 2008].

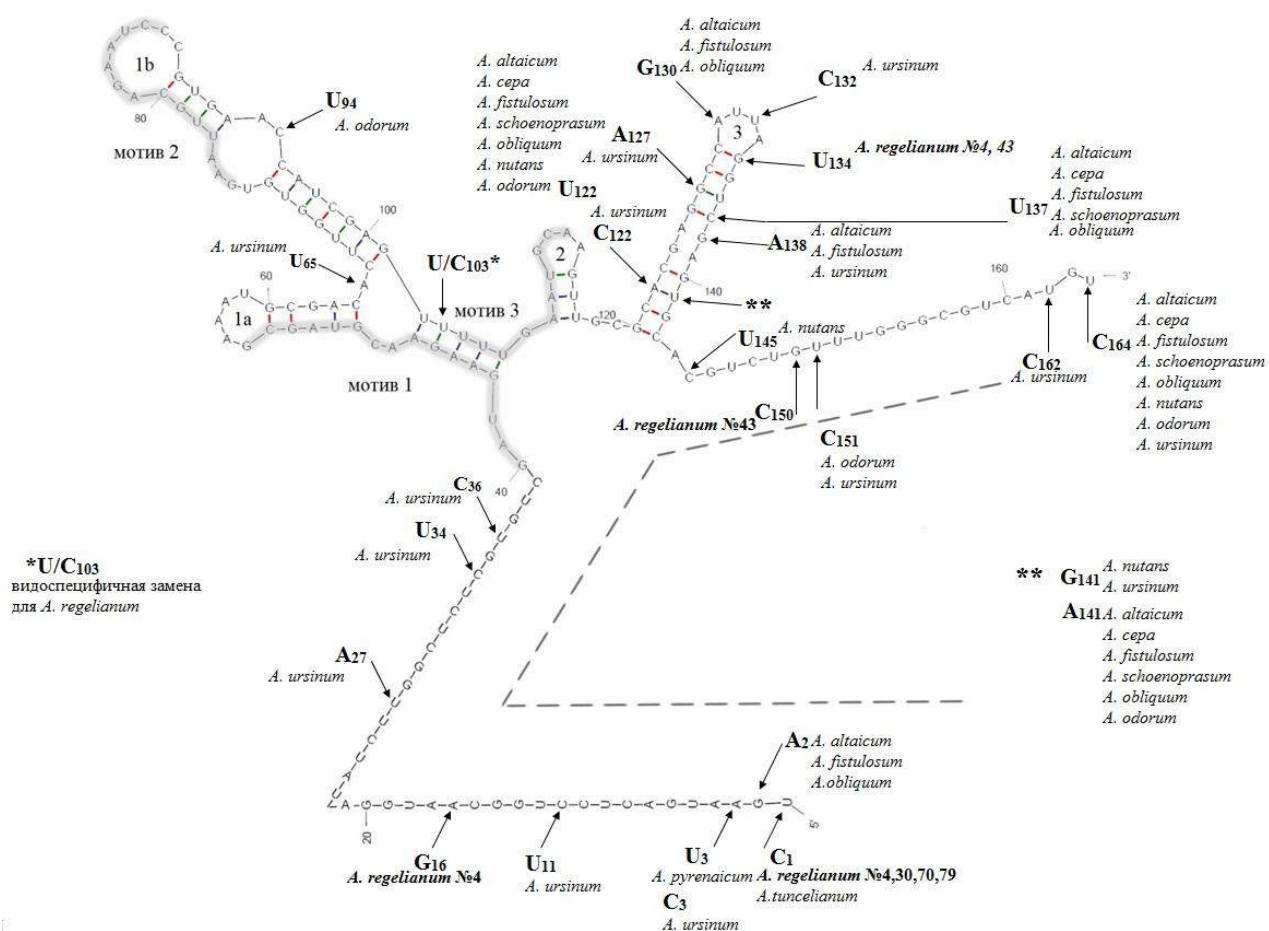


Рисунок 3.21. Вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *A. regelianum*.

SNPs, идентифицированные у взятых в анализ представителей рода *Allium*, локализованы преимущественно в районе третьей шпильки, которая не содержит консервативных мотивов. Выявленные нуклеотидные замены не меняют топологию шпильки (Рисунок 3.21).

3.2.1.2 Анализ variability последовательностей хлоропластного генома *A. regelianum*

Для анализа полиморфизма участков хлоропластного генома *A. regelianum* и представителей рода *Allium* было выбрано две последовательности *ndhJ-trnL* и *trnC-petN*, которые располагаются в большом однокопийном районе (LSC).

Последовательности спейсеров *ndhJ-trnL*, *trnC-petN* были амплифицированы и секвенированы у всех образцов *A. regelianum*, взятых в анализ.

Пластидный спейсер *ndhJ-trnL*. Длина спейсера *ndhJ-trnL* составила от 887 п.н. у образцов *A. pseudoampeloprasum* и *A. iranicum* до 1009 п.н. у *A. ursinum*. GC-состав варьировал от 28,8% (*A. baeticum*, *A. erubescens*, *A. sativum*) до 30,7 (*A. fistulosum*). Всего была выявлена 131 варибельная позиция (11,8%), из которых 56 парсимонически-информативных. Выравнивания последовательностей *ndhJ-trnL* изучаемых видов приведены в Приложении 9.

Длина спейсера *ndhJ-trnL* у *A. regelianum* составила 895 п.н., GC- состав – 29,4%. Внутривидового полиморфизма выявлено не было.

Для *A. regelianum* отмечена одна видоспецифичная замена A/G₂₁₂, а также однонуклеотидная делеция в положении 16. Последовательность спейсера *ndhJ-trnL* *A. regelianum* наиболее сходна с последовательностями этого спейсера *A. ampeloprasum* (их отличает одна нуклеотидная замена), а также *A. commutatum*. Для этих трех видов характерна вставка 5 п.н. в положении 421, а также 4 SNPs (C/T₂₆₉, A/C₂₉₂, C/T₄₈₈, T/C₇₂₃).

Между образцами секции *Allium* (к которой по результатам анализа ITS1-5.8S-ITS2 последовательности относится *A. regelianum*) выявлено 33 варибельные позиции (14 парсимонически-информативных). Данную секцию отличает 24 SNPs, три однонуклеотидные делеции, а также делеция в 5 п.н.

Пластидный спейсер *trnC-petN*. Длина данного спейсера варьировала от 681 п.н. у *A. atrovioleaceum* до 919 п.н. у *A. ursinum*, а GC-состав от 30% (*A. polyanthum*) до 31,8% (*A. regelianum*). Для всех анализируемых видов выявлено 96 варибельных сайтов (9,6%), парсимонически-информативных из них 33. Выравнивания последовательностей *trnC-petN* изучаемых видов приведены в Приложении 10.

У *A. regelianum* длина спейсера *trnC-petN* составила от 685 п.н. для образцов №1, 4, 11, 21, 21, 30, 41 до 683 п.н. для образцов №43, 44, 77, 79, 91. Это различие возникло из-за двух однонуклеотидных инделей в положении 668 и 672. GC-состав был равен 31,8%. В последовательности данного спейсера была также отмечена однонуклеотидная замена Т на А у образца №4 в положении 59.

От всех анализируемых видов рода *Allium* *A. regelianum* отличает делеция 5 п.н. в положении 368. Наиболее близким по нуклеотидной последовательности видом к *A. regelianum* стал вид *A. ampeloprasum*. Образец №03-27-0001-80 отличается от *A. regelianum* двумя SNPs (T/A₁₆₉ и G/A₃₆₅), а образец №03-43-0193-10 – тремя ((T/A₁₆₉, T/A₃₁₅ и A/C₅₄₂). Также очень похожи на *A. regelianum* образцы *A. commutatum*, *A. polyanthum*, *A. porrum* и *A. pyrenaicum*. Вместе с *A. ampeloprasum* их отличает от других видов секции *Allium* 4 однонуклеотидные замены (C/T₁₈₅, A/T₂₀₃, T/A₃₇₉, G/A₃₉₆) и инсерция в 5 п.н.

Секцию *Allium* характеризует обширная делеция (около 200 п.н.) в положении 55, а также две инсерции – 5 п.н. в положении 359 и 4 п.н. в положении 550. Внутри секции отмечено 33 переменные позиции (19 парсимонически-информативных).

Далее полученные для каждого образца последовательности двух пластидных спейсеров были объединены в единую последовательность и использованы при построении дендрограммы методом Neighbor joining (с использованием трехпараметрической модели Тамуры, в программе MEGA 6.0) (Рисунок 3.22).

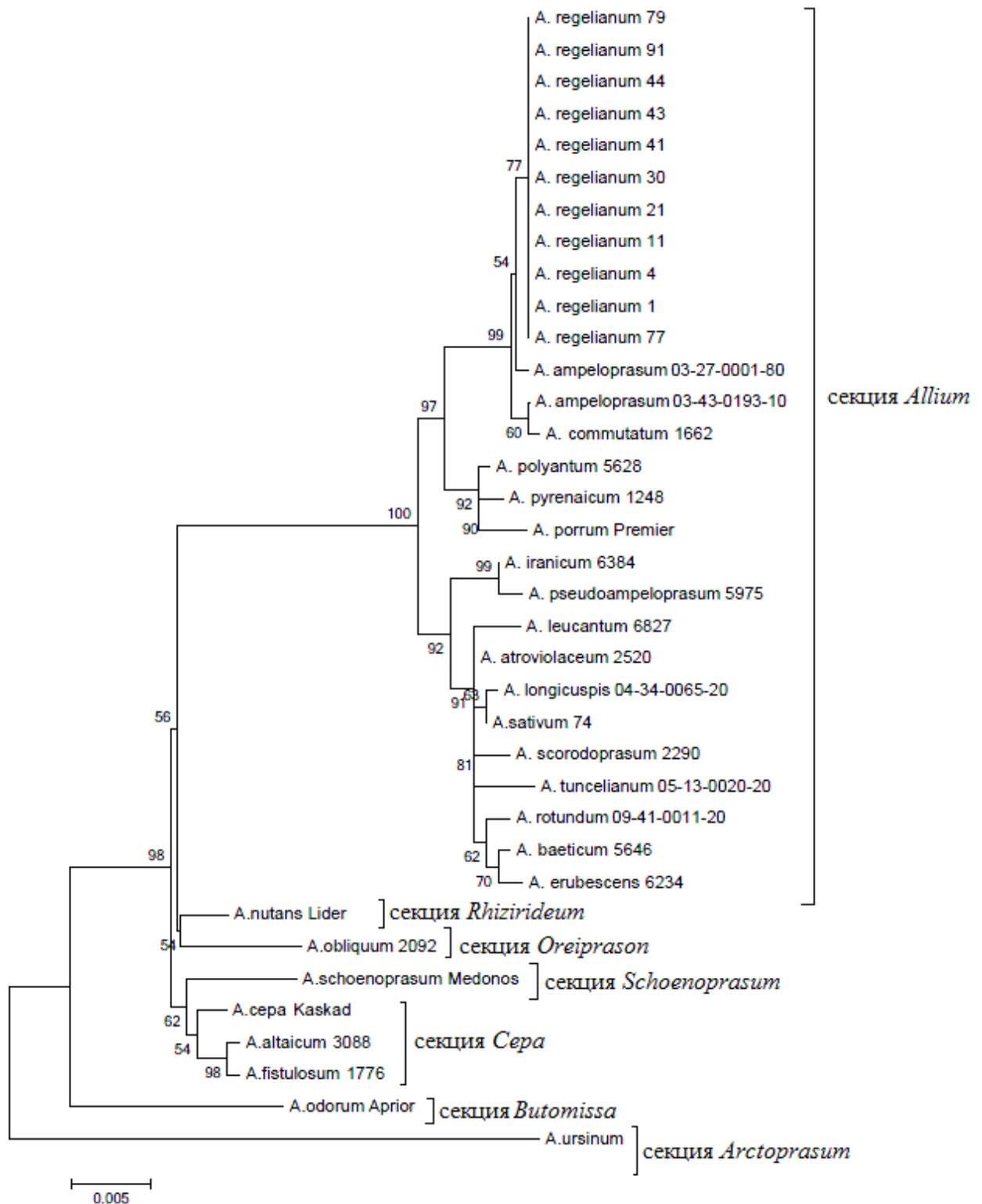


Рисунок 3.22. Дендрограмма, построенная по результатам анализа объединенной последовательности двух пластидных спейсеров у анализируемых видов рода *Allium*, методом Neighbor Joining. Масштабный отрезок показывает число нуклеотидных замен на один сайт.

Все изучаемые образцы на дендрограмме разделились на два кластера. Первый кластер включает один образец *A. ursinum*, а второй – все остальные образцы.

Во втором кластере четко (ИБ=100) выделяется подкластер, включающий образцы секции *Allium*, в том числе *A. regelianum*. Образцы секции *Allium* в свою очередь можно разделить на две группы. К первой группе (ИБ=92) можно отнести образцы *A. atrovioleaceum*, *A. baeticum*, *A. erubescens*, *A. iranicum*, *A. leucanthum*, *A. longicuspis*, *A. pseudoampeloprasum*, *A. rotundum*, *A. sativum*, *A. scorodoprasum* и *A. tuncelianum*. Во вторую группу выделяются образцы *A. ampeloprasum*, *A. porrum*, *A. polyanthum* и *A. pyrenaicum* и *A. commutatum* и *A. regelianum*, вместе эти виды представляют так называемый «*Allium ampeloprasum complex*», который был выделен von Bothmer в 1974 при изучении луков Эгейских островов и Крита [von Bothmer, 1974]. Виды данного комплекса могут скрещиваться друг с другом, а дикорастущие виды имеют сходные ареалы обитания.

Анализ филогенетических отношений *A. regelianum* внутри данного комплекса показал наибольшее сходство с видами *A. ampeloprasum* и *A. commutatum* (99% гомологии), что говорит о близком родстве этих видов. На дендрограмме данные виды попадают в отдельные подкластеры, но различаются они всего по нескольким заменам. Учитывая это, не представляется возможным установить точные видовые границы.

Кроме того, полученные для каждого образца нуклеотидные последовательности ITS1-5.8S-ITS2, *ndhJ-trnL*, *trnC-petN* были объединены в единую последовательность и также проанализированы в программе MEGA 6.0 (Рисунок 3.23). На полученной дендрограмме образцы *A. regelianum* также входят в состав кластера, образованного видами секции *Allium*. Внутри данного кластера наиболее близкими видами к *A. regelianum* стали *A. ampeloprasum* и *A. commutatum*, вместе они образуют общий подкластер. Однако образцы *A. regelianum* достаточно обособлены и образуют единую группу (ИБ=100).

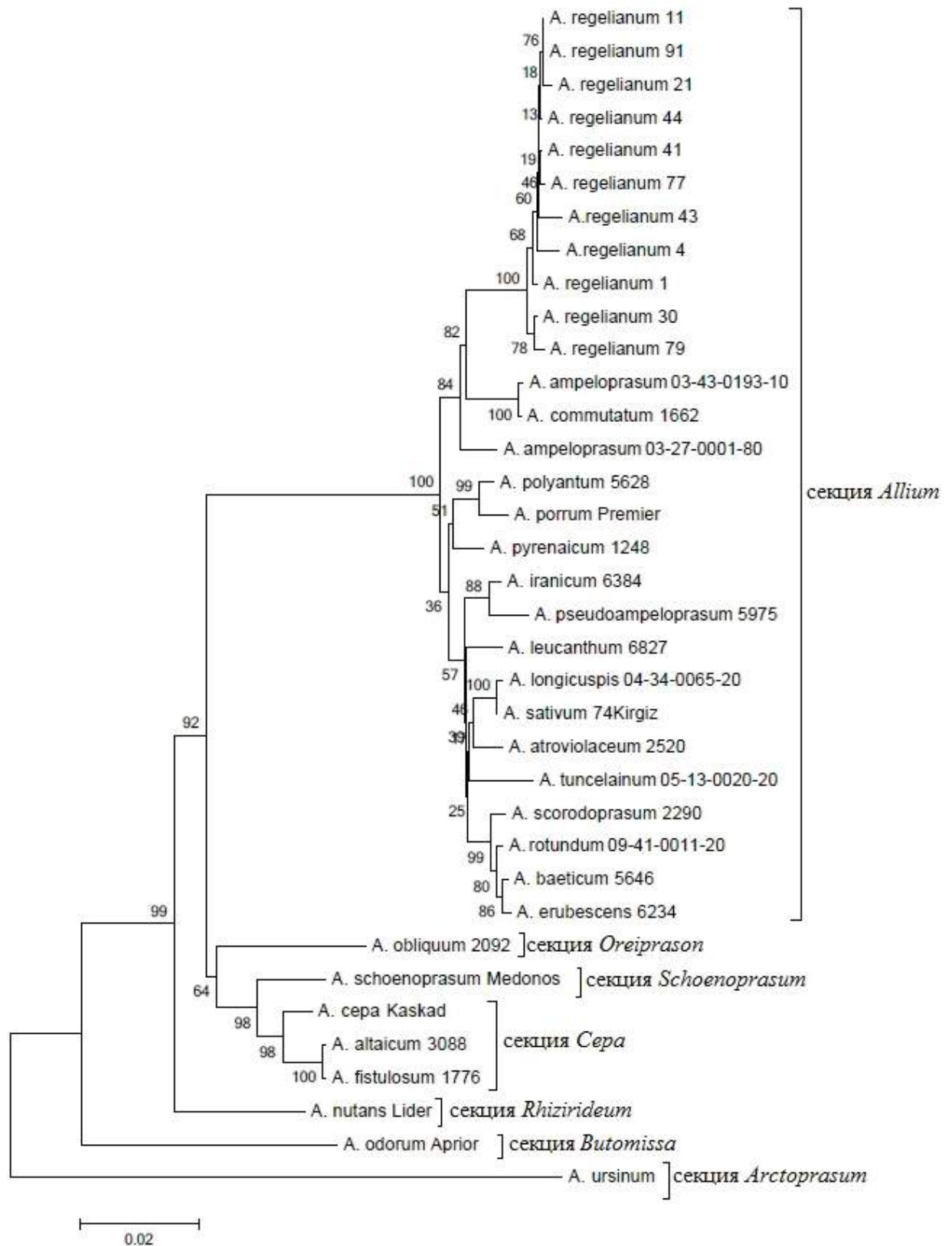


Рисунок 3.23. Дендрограмма, построенная по результатам анализа объединенной последовательности двух пластидных спейсеров (*ndhJ-trnL*, *trnC-petN*) и последовательности ITS1-5.8S-ITS2 у анализируемых видов рода *Allium*, методом Neighbor Joining. Масштабный отрезок показывает число нуклеотидных замен на один сайт.

3.2.2 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *A. regelianum* методами мультилокусного анализа

Как и для *B. sarmatica*, уровень полиморфизма генома *A. regelianum* в целом был оценен с помощью методов мультилокусного анализа, таких как RAPD, ISSR, AFLP, а также NBS-профайлинг.

3.2.2.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *A. regelianum* с помощью RAPD-анализа

RAPD-анализ 82 образцов *A. regelianum* из популяций Волгоградской области (в анализ не были включены образцы №8, 10, 16, 17, 22, 30, 41, 54, 55, 57, 93, так как для данных образцов получались не четкие и плохо воспроизводимые спектры) позволил идентифицировать 120 фрагментов, из которых 91 (75,8%) оказался полиморфным. На Рисунке 3.24 представлен спектр фрагментов, полученных в ходе RAPD-анализа *A. regelianum*.

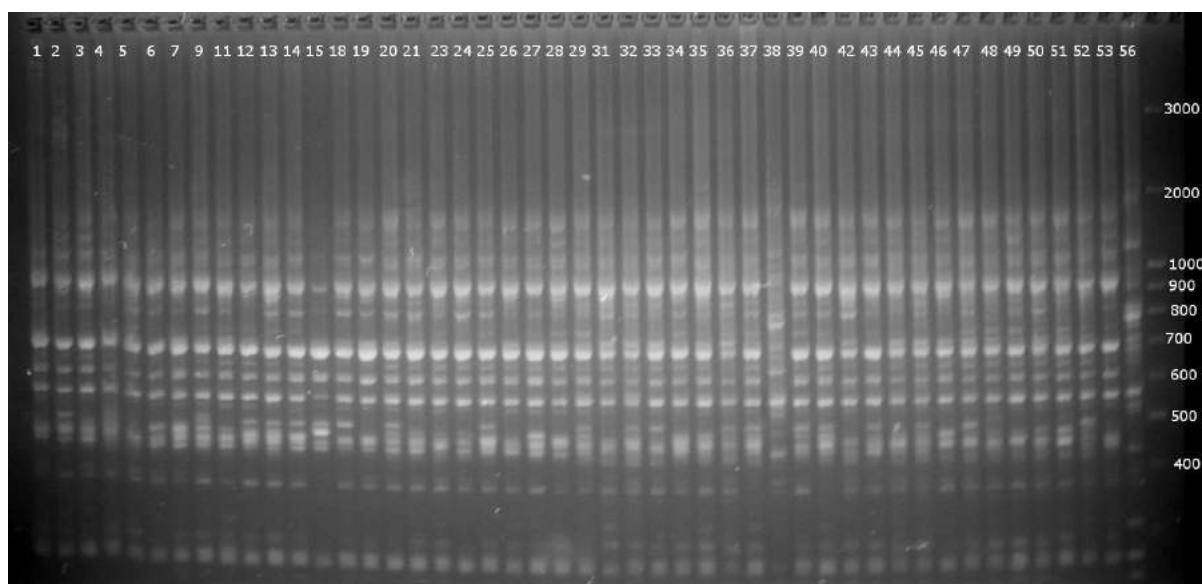


Рисунок 3.24. RAPD-спектр образцов *A. regelianum*, полученный с использованием праймера ОРЕ06 (фрагмент геля). 1-5 – популяция Быковского р-на; 6-20 – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 21-24 – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 25-34 – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 35 – популяция Иловлинского р-на; 36-37 – популяция Фроловского р-на; 38-40 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 41-56 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский. Крайняя правая дорожка – маркер молекулярных масс.

Число ДНК фрагментов, амплифицируемых с одним праймером, составило от 10 (ОРК09) до 22 (ОРЕ06). Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймера ОРК10 (16), минимальное – ОРЕ05 (8). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером, колебался в пределах от 66,7% (для праймеров ОРЕ05 и ОРН15) до 100% (для праймеров ОРК10) (данные по всем праймерам даны в Приложении 3).

Фрагменты, специфичные только для какой-либо одной популяции, отмечены не были.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Для анализа внутрипопуляционного разнообразия были взяты популяции, где число собранных образцов превышало пять. Для каждой популяций были рассчитаны основные показатели внутрипопуляционного генетического разнообразия (Таблица 3.12).

Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяции из хутора Красноярский, Серафимовичского района (68,13%). Наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности выявлены для популяции лимана Хреноватый, Николаевского района. Наименьшие значения всех показателей внутрипопуляционного разнообразия отмечены для популяции из Быковского района. Среди исследованных популяций минимальное значение среднего числа аллелей отмечено у популяции Быковского района, а доля редких аллелей в этой популяции самая большая. Наибольшее среднее число аллелей отмечено для популяции хутора Красноярский, Серафимовичского района, а доля редких аллелей в этой популяции минимальна. Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция Николаевского района, лиман Хреноватый, наименее – популяция из Быковского района (Таблица 3.12).

Индекс генетического сходства Дайса между всеми образцами изучаемой выборки достигал максимального значения (0,97) между образцами №24 и №25 (популяция Николаевского района, лиман Хреноватый), а минимального (0,58) – между образцами №21 (популяция Николаевского района, лиман Хреноватый) и №52 (популяция Серафимовичского района, хутор Красноярский) (Таблица 3.12).

Таблица 3.12. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. regelianum*, полученные в результате RAPD-анализа.

Показатель	Популяция					
	Быковский р-н	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский район, хут. Красноярский	Серафимовичский район, хут. Буерак-Поповский	5 анализируемых популяций
% полиморфизма	32,97	64,84	52,75	68,13	56,04	73,02
Число эффективных аллелей, $pe \pm Se^*$	$1,212 \pm 0,036$	$1,484 \pm 0,043$	$1,320 \pm 0,039$	$1,404 \pm 0,041$	$1,424 \pm 0,045$	$1,369 \pm 0,019$
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	$0,184 \pm 0,029$	$0,387 \pm 0,032$	$0,281 \pm 0,030$	$0,349 \pm 0,030$	$0,335 \pm 0,033$	$0,307 \pm 0,014$
Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	$0,124 \pm 0,020$	$0,267 \pm 0,023$	$0,188 \pm 0,021$	$0,234 \pm 0,021$	$0,232 \pm 0,023$	$0,209 \pm 0,010$
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_{\mu}^{**}$	$1,345 \pm 0,338$	$1,563 \pm 0,162$	$1,405 \pm 0,285$	$1,578 \pm 0,127$	$1,538 \pm 0,265$	$1,639 \pm 0,072$
Доля редких аллелей, $h_{\mu} \pm S_h^{**}$	$0,328 \pm 0,169$	$0,219 \pm 0,081$	$0,297 \pm 0,142$	$0,211 \pm 0,063$	$0,231 \pm 0,132$	$0,181 \pm 0,036$
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,84-0,93	0,68-0,97	0,75-0,93	0,65-0,92	0,73-0,94	0,58-0,97

*Se – стандартная ошибка; ** S_{μ} и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Определение уровней межпопуляционных различий. Для оценки межпопуляционных различий был оценен индекс генетических расстояний Нея. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями был невысоким и варьировал от 0,056 (между популяциями из Серафимовичского района, хуторов Красноярский и Буерак-Поповский) до 0,195 (между популяцией из Быковского района и популяцией из Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский) (Таблица 3.13).

Также был проведен анализ генетической структуры пяти изученных популяций *A. regelianum*. Общее генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) составила 0,293, внутривидовое генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,209. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,286. Показатель генного потока составил $Nm=1,247$.

Проведенный анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что в составе общей генетической гетерогенности вида 23% генетического разнообразия *A. regelianum* приходится на межпопуляционные различия и 77% составляет доля внутривнутрипопуляционного полиморфизма.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием демонстрирует корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. regelianum* ($R^2=0,3866$, $p=0,02$).

Таблица 3.13. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *A. regelianum*, рассчитанный по результатам RAPD-анализа.

Быковский р-н, лиман Тажи	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичс кий р-н, хут. Красноярский	Серафимовичс кий р-н, хут. Буерак- Поповский	
0,149	0				Николаевский р-н, лиман Хреноватый
0,165	0,078	0			Николаевский р-н, лиман Богатырев
0,179	0,123	0,148	0		Серафимовичский р-н, хут. Красноярский
0,195	0,165	0,148	0,056	0	Серафимовичский р-н, хут. Буерак- Поповский

Далее с помощью программы PAST 3.09 на основе коэффициента генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.25).

На графике главных координат (Рисунок 3.25) видно, что образцы *A. regelianum* образуют одну общую группу, подразделить ее на подгруппы сложно. Можно лишь отметить, что образцы из популяций Николаевского района сосредоточены в основном в правой части графика, а образцы из популяций Серафимовичского района – в левой, образцы из популяции Быковского района занимают промежуточное положение.

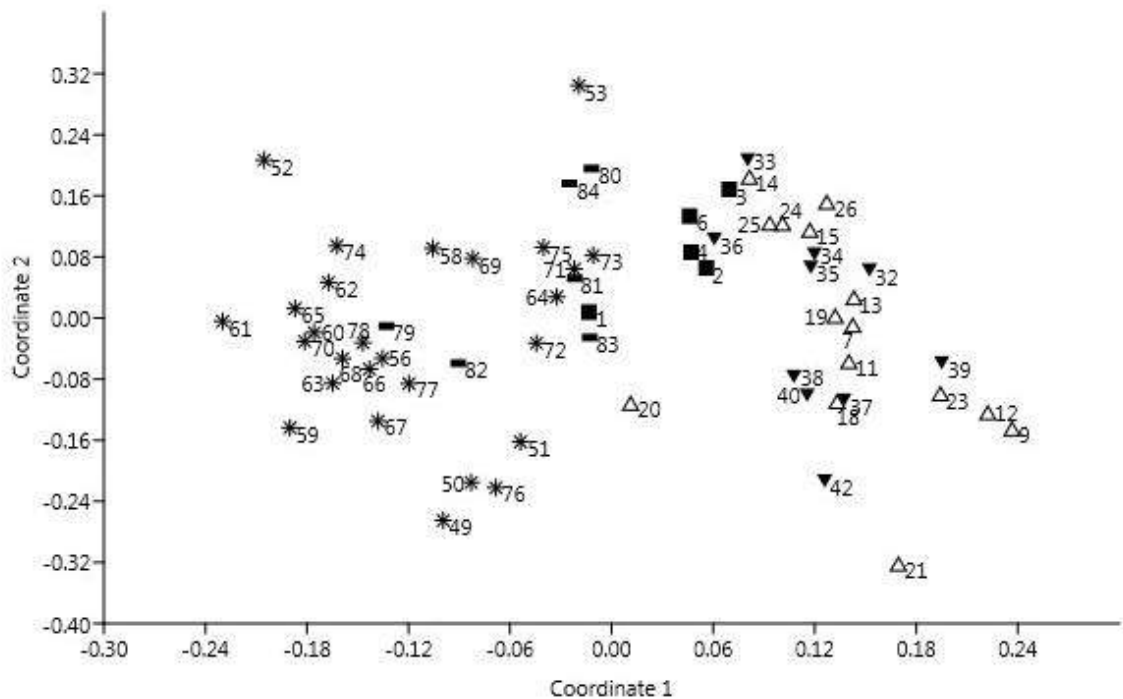


Рисунок 3.25. Расположение образцов *A. regelianum* из пяти популяций (с числом растений пять и более) в главных координатах по результатам RAPD-анализа. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (△) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский.

Похожий результат был получен при проведении данного анализа на общей выборке (Рисунок 3.26). На данном графике образцы из популяций Николаевского района сосредоточены в основном в одной части графика, а образцы из популяций Серафимовичского и Алексеевского районов – в другой, образцы из популяции Быковского района занимают промежуточное положение (но большая часть образцов из этой популяции все-таки ближе к более географически близким популяциям Николаевского района).

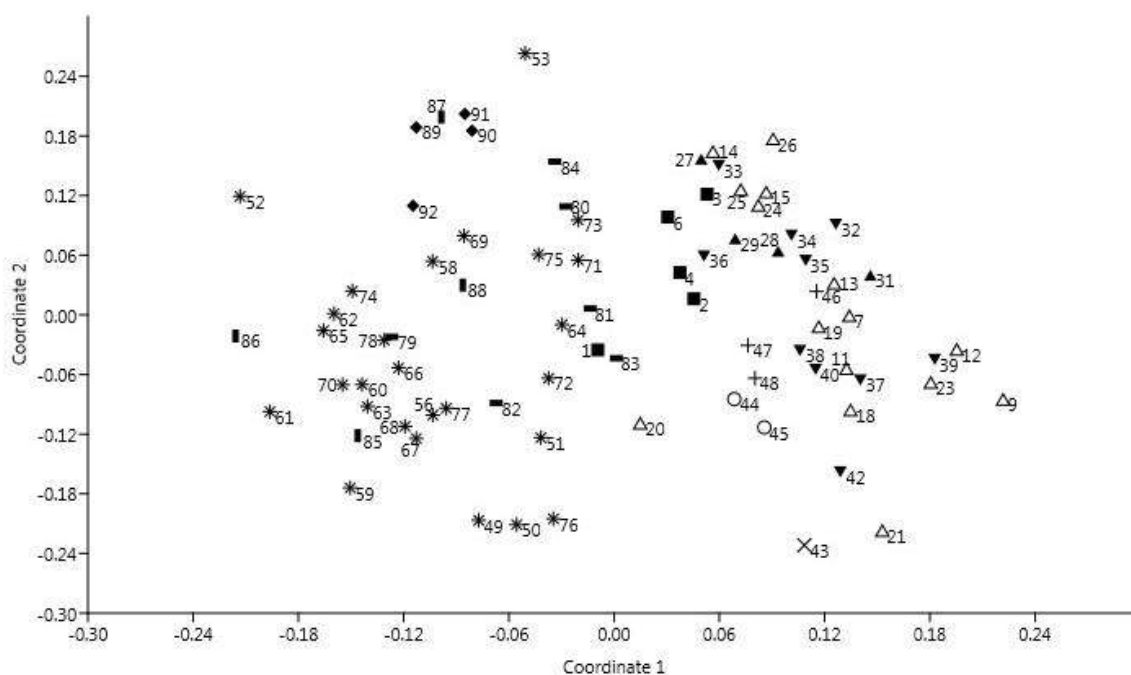


Рисунок 3.26. Дифференциация всех изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по данным RAPD-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; 85-88 (▨) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; 89-92 (◆) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

Кроме того, был проведен анализ популяционной структуры *A. regelianum* в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью методов *deltaK*, наилучшие результаты были получены для $K=2$ (Рисунок 3.27). На Рисунке 3.28 представлена кластеризация популяций *A. regelianum* при $K=2$. Кластеризация образцов в большей степени совпадает с группировкой, полученной при использовании метода главных координат: также можно выделить две основные группы образцов: первая – это популяции 2,3,4 (Николаевский район), сюда также можно отнести популяцию 1 (Быковский район) и образцы из Фроловского и Иловлинского районов (5, 6); вторая – популяции 8, 9, 10, 11 (Серафимовичский и Алексеевский районы).

Такое расположение популяций на графике главных координат, а также дифференциация популяций в программе Structure, в целом отражают их географическое расположение. Формируются две группы образцов: образцы из популяций левого берега Волгоградского водохранилища (популяции Николаевского района) и образцы из популяций, расположенных

на правом берегу р. Волги, приурочены к руслу р. Дон (популяции Серафимовичского и Алексеевского районов). Популяция Быковского района, географически близка к популяциям первой группы, однако, на графике часть образцов группируется со второй группой образцов. Также нельзя точно определить положение образцов из популяций Фроловского и Иловлинского районов из-за небольшого числа растений, собранных в этих популяциях.

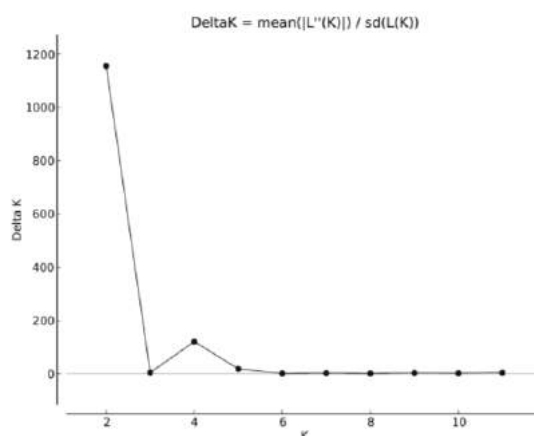


Рисунок 3.27. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

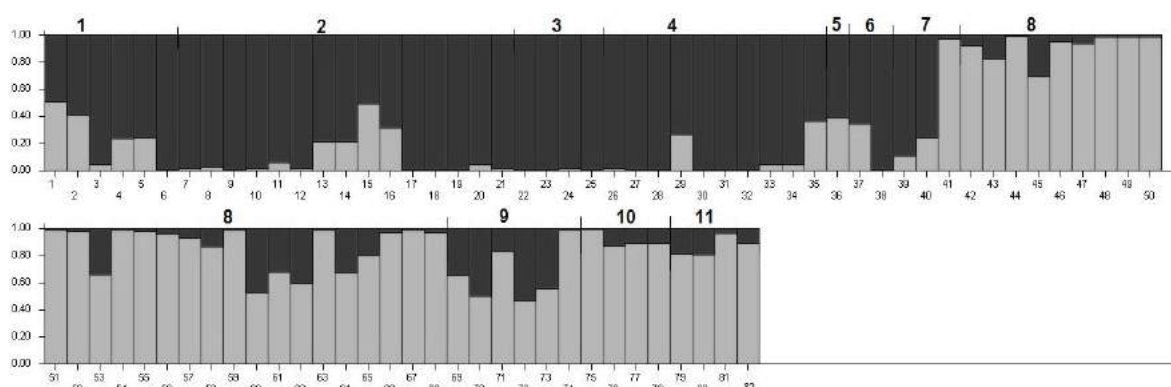


Рисунок 3.28. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. regelianum* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=2$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; **2** – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; **3** – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; **4** – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; **5** – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; **6** – популяция Фроловского р-на, хут. Выездinский; **7** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; **8** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; **9** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; **10** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; **11** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

3.2.2.2 ISSR-анализ меж- и внутрипопуляционной изменчивости *Allium regelianum*

93 образца *A. regelianum* были проанализированы с помощью шести ISSR-праймеров. Всего было идентифицировано 109 фрагментов, из которых 87 (79,8%) оказались полиморфными. Число ДНК фрагментов, амплифицируемых с одним праймером, составило от 15 (UBC873) до 22 (UBC841). Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймера UBC841 (18), минимальное – UBC826 (12). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером колебался в пределах от 66,7% (для праймера UBC816) до 88,2% (для праймера UBC811) (данные об информативности праймеров приведены в Приложении 3). На Рисунке 3.29 представлен спектр фрагментов, полученный в ходе ISSR-анализа *A. regelianum*.

Фрагменты, специфичные только для какой-либо одной популяции, отмечены не были.

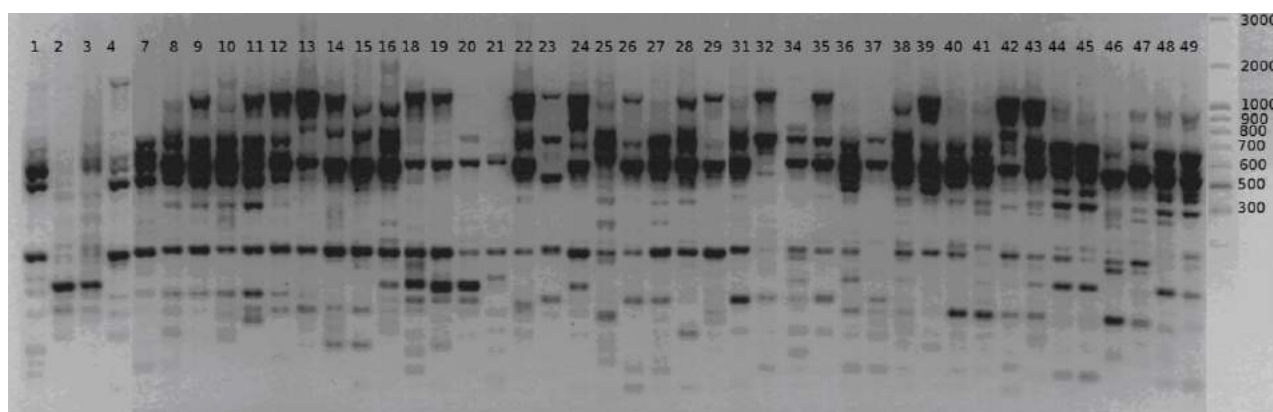


Рисунок 3.29. ISSR-спектр образцов *A. regelianum*, полученный с использованием праймера UBC841 (фрагмент геля). 1-6 – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский. Крайняя правая дорожка – маркер молекулярных масс.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Для популяций, в которых число растений в которых было пять и более, были рассчитаны основные показатели внутрипопуляционного генетического разнообразия (Таблица 3.14).

Таблица 3.14. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. regelianum*, полученные в результате ISSR-анализа.

Показатель	Популяция					
	Быковский р-н,	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	5 анализируемых популяций
% полиморфизма	41,3	65,1	54,1	68,8	33,9	78,9
Эффективное число аллелей, $ne \pm Se^*$	1,284 $\pm$ 0,037	1,433 $\pm$ 0,039	1,355 $\pm$ 0,037	1,399 $\pm$ 0,037	1,210 $\pm$ 0,033	1,336 $\pm$ 0,017
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	0,236 $\pm$ 0,028	0,357 $\pm$ 0,028	0,301 $\pm$ 0,028	0,347 $\pm$ 0,028	0,182 $\pm$ 0,026	0,284 $\pm$ 0,013
Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	0,161 $\pm$ 0,020	0,243 $\pm$ 0,020	0,204 $\pm$ 0,020	0,231 $\pm$ 0,019	0,122 $\pm$ 0,018	0,192 $\pm$ 0,009
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu^{**}$	1,416 $\pm$ 0,287	1,552 $\pm$ 0,147	1,500 $\pm$ 0,206	1,545 $\pm$ 0,125	1,379 $\pm$ 0,300	1,590 $\pm$ 0,075
Доля редких аллелей, $h_\mu \pm Sh^{**}$	0,292 $\pm$ 0,143	0,223 $\pm$ 0,073	0,250 $\pm$ 0,103	0,227 $\pm$ 0,062	0,311 $\pm$ 0,150	0,205 $\pm$ 0,037
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,81-0,99	0,73-0,89	0,78-0,93	0,73-0,94	0,83-0,99	0,68-0,99

*Se – стандартная ошибка; ** S_μ и Sh – статистические ошибки соответствующих показателей

При оценке рассчитанных показателей было выявлено, что наибольшим уровнем полиморфизма отличаются популяции из хутора Красноярский, Серафимовичского района (68,8%) и лимана Хреноватый, Николаевского района (65,1%). Для последней популяции также были отмечены наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Наиболее генетически однородной была популяция из хутора Буерак-Поповский, Серафимовичского района, показатели внутрипопуляционного разнообразия для нее были самими низкими. Наименьшую долю редких аллелей и наибольшее значение среднего числа аллелей имеет популяция лимана Хреноватый Николаевского района, а соответственно большее всего редких аллелей и наименьшее значение среднего числа аллелей отмечено для популяции хутора Буерак-Поповский, Серафимовичского района. Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция Николаевского

района, лиман Хреноватый, наименее – популяция из хутора Буерак-Поповский (Серафимовичский район) (Таблица 3.14).

Кроме того, были рассмотрены индексы генетического сходства Дайса между всеми образцами из пяти популяций. Максимальное значение данного индекса (0,99) выявлено между образцами №81 и №85 (популяция Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский), минимальное (0,68) – между №24 (популяция Николаевского района, лиман Хреноватый) и №51 (популяция Серафимовичского района, хутор Красноярский).

Определение уровней межпопуляционных различий. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями варьировал от 0,042 (между популяциями из Николаевского района, лиман Хреноватый и Серафимовичского района, хутор Красноярский) до 0,131 (между популяцией из Быковского района и популяцией из Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский) (Таблица 3.15).

Таблица 3.15. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *A. regelianum*, рассчитанный по результатам ISSR-анализа.

Быковский р-н, лиман Тажи	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимович ский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичск ий р-н, хут. Буерак- Поповский	
0,099	0				Николаевский р-н, лиман Хреноватый
0,084	0,065	0			Николаевский р-н, лиман Богатырев
0,102	0,042	0,056	0		Серафимовичский р- н, хут. Красноярский
0,131	0,104	0,113	0,073	0	Серафимовичский р- н, хут. Буерак- Поповский

Для изученной выборки образцов *A. regelianum* ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,192, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) не превышала 0,247. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,220. Показатель генного потока составил $Nm=1,76$.

В составе общей генетической гетерогенности вида лишь 17% генетического разнообразия *A. regelianum* приходится на межпопуляционные различия и 83% составляет доля внутривидового полиморфизма (по результатам анализа молекулярной дисперсии).

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием не выявил корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. regelianum*.

На основе коэффициентов генетического сходства Дайса между образцами из пяти популяций проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.30).

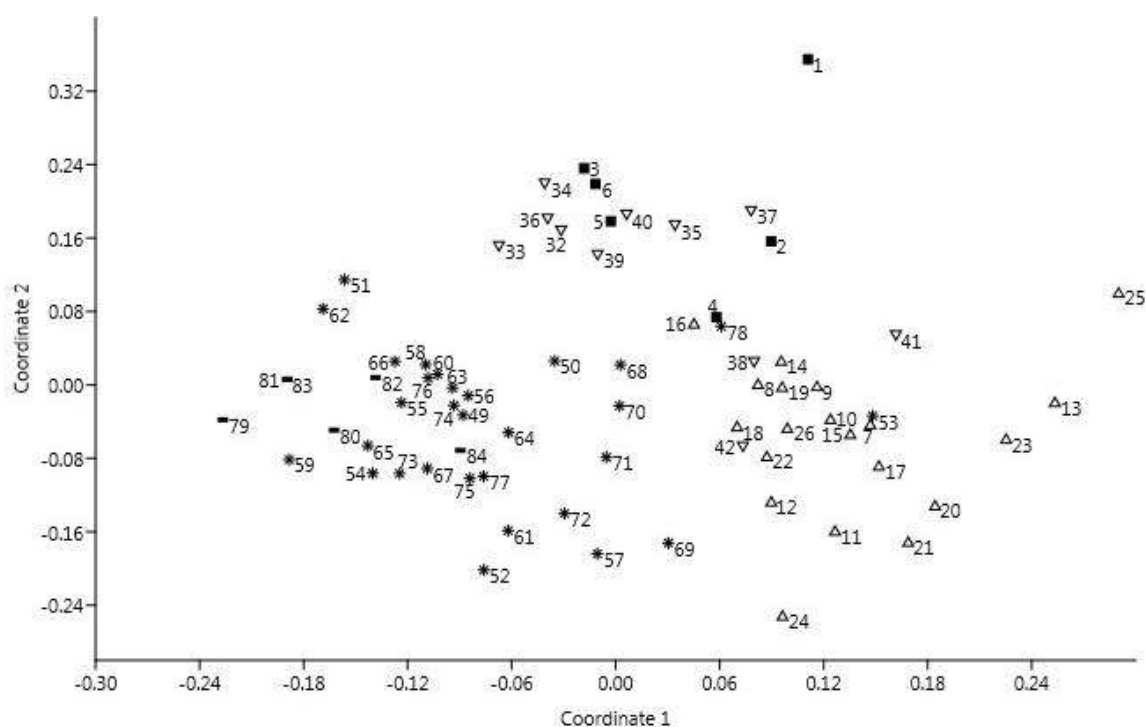


Рисунок 3.30. Расположение образцов *A. regelianum* из пяти популяций (с числом растений пять и более) в главных координатах по результатам ISSR-анализа. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский.

На PCoA (Principal Coordinate Analysis) графике (Рисунок 3.30) все исследуемые образцы *A. regelianum* образуют единую группу, где нет четкой дифференциации популяций по местам сбора. Можно лишь говорить о том, что образцы из популяций Серафимовичского района группируются вместе, группировка также отмечается для образцов из популяций Николаевского и Быковского районов.

Нет четкой дифференциации популяций по местам сбора на PCoA графике при включении в рассмотрение всех изучаемых образцов (Рисунок 3.31). Хотя большая часть образцов из трех популяций Николаевского района и из популяции Быковского района

группируются вместе и несколько обособлены от образцов из четырех популяций Серафимовичского района и популяции из Алексеевского района. Стоит отметить, что согласно молекулярным данным образцы из популяций Иловлинского и Фроловского районов ближе к группе популяций Николаевского и Быковского районов, хотя географически более отдалены от них, чем от популяций Серафимовичского района. Для подтверждения этих данных необходима бóльшая выборка, что достаточно проблематично из-за малой численности этих популяций.

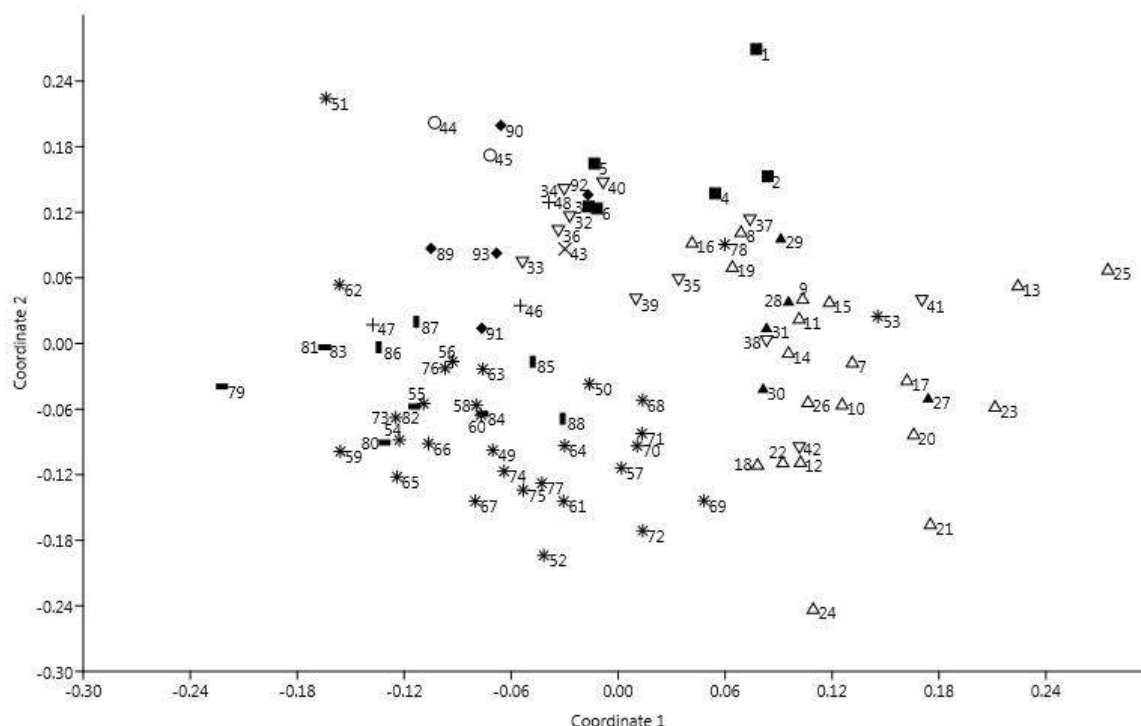


Рисунок 3.31. Дифференциация всех изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по данным ISSR-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; 85-88 (▮) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; 89-93 (◆) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

Проведенный анализ популяционной структуры *A. regelianum* в программе Structure 2.3.4. показал деление изучаемых образцов на две группы, $K=2$ (Рисунок 3.32). На Рисунке 3.33 представлена кластеризация популяций *A. regelianum*.

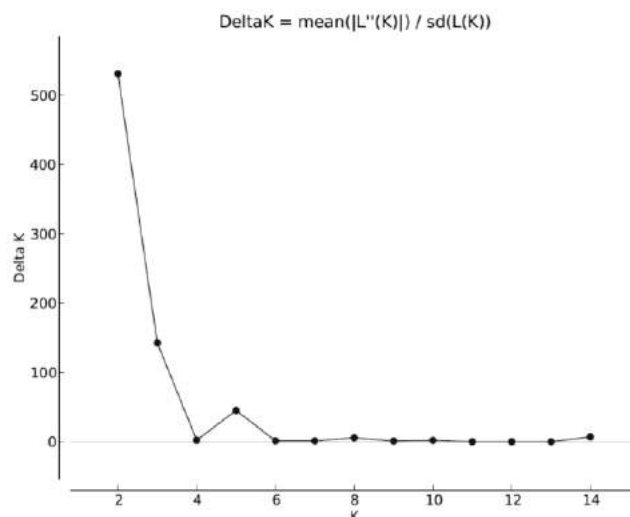


Рисунок 3.32. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

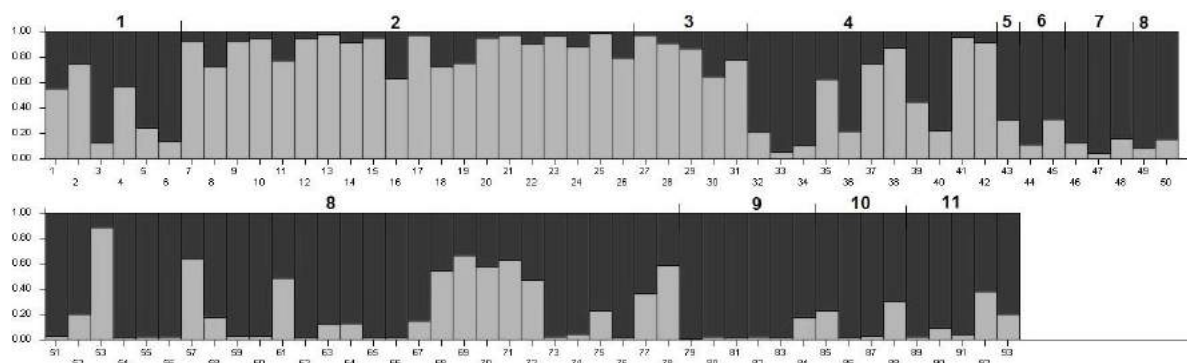


Рисунок 3.33. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. regelianum* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=2$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; **2** – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; **3** – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; **4** – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; **5** – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; **6** – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; **7** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; **8** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; **9** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; **10** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; **11** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

Как и при РСрА анализе, не выявлено четкого соответствия между кластерами генотипов и изученными популяциями или группами популяций из одного района (Рисунок 3.33). Однако можно говорить о преобладании одного компонента в популяциях Николаевского и Быковского районов, а другого компонента – в популяциях Серафимовичского района.

3.2.2.3 AFLP-анализ меж- и внутрипопуляционной изменчивости *Allium regelianum*

При проведении AFLP-анализа 93 образцов *A. regelianum* было получено 333 фрагмента. Полиморфных фрагментов выявлено 268 (80,50%). Число ДНК фрагментов, амплифицируемых одной комбинацией праймеров составило от 49 (E_{38}/M_{55g}) до 85 (E_{38}/M_{52}). На Рисунке 3.34 представлен спектр фрагментов, полученный в ходе AFLP-анализа.

Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью комбинации праймеров E_{37}/M_{52} (70), минимальное – E_{38}/M_{55g} (40). Уровень полиморфизма, выявляемого одной комбинацией праймеров колебался в пределах от 65,6% (E_{38}/M_{60}) до 88,9% (E_{38}/M_{55t}) (данные об информативности применяемых комбинаций праймеров приведены в Приложении 3).

Фрагменты, специфичные для какой-то одной популяции отмечены не были.

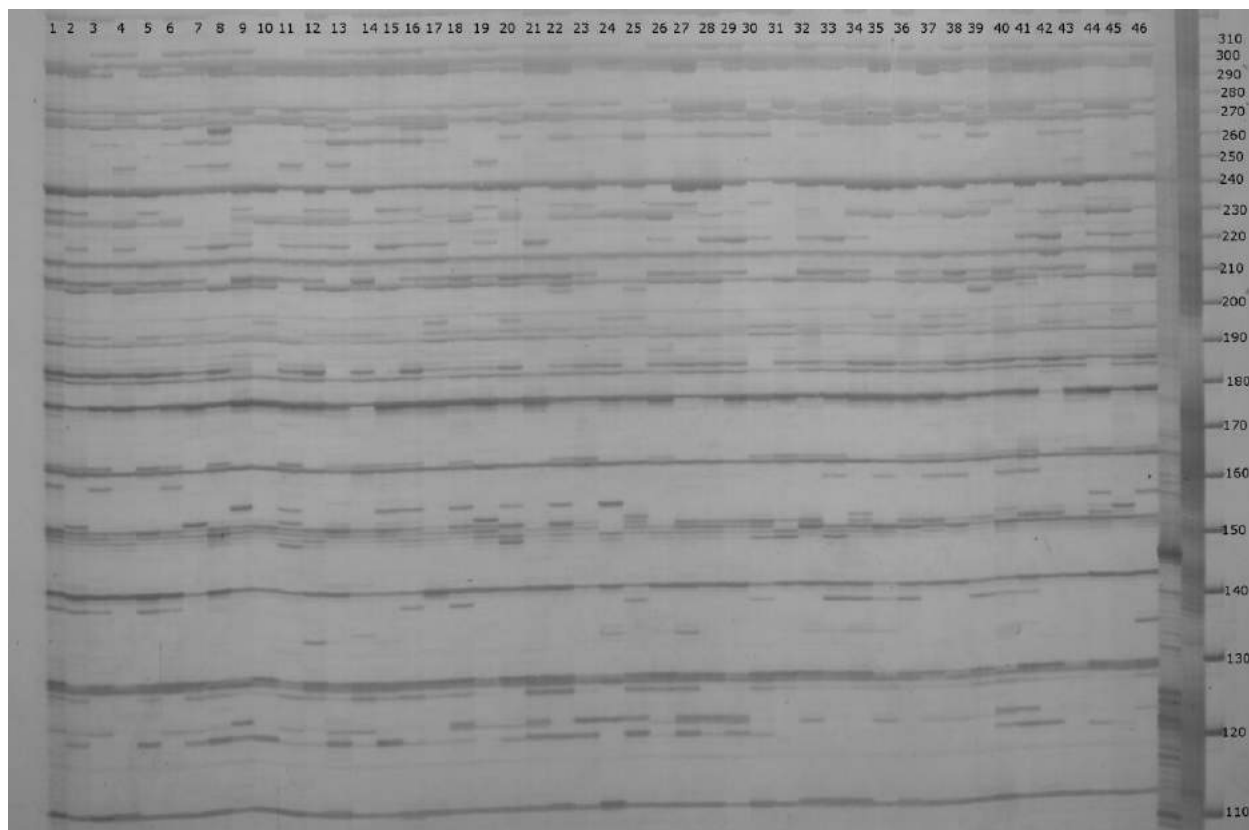


Рисунок 3.34. AFLP-спектр образцов *A. regelianum*, полученный с использованием комбинации праймеров E_{38}/M_{55t} (фрагмент геля). 1-6 – популяция Быковского р-на; 7-26 – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 – популяция Иловлинского р-на; 44-45 – популяция Фроловского р-на; 46 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский. Крайняя правая дорожка – маркер молекулярных масс.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Для анализа внутрипопуляционного разнообразия было взято пять популяций, для них число собранных

образцов превышало пять. Для каждой из них были рассчитаны основные показатели внутривидового генетического разнообразия (Таблица 3.16).

Таблица 3.16. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. regelianum*, рассчитанные по результатам AFLP-анализа.

Показатель	Популяция					
	Быковский р-н	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	5 анализируемых популяций
% полиморфизма	42,34	68,17	56,46	69,07	36,94	79,50
Эффективное число аллелей, $ne \pm Se^*$	1,292 $\pm$ 0,021	1,416 $\pm$ 0,021	1,364 $\pm$ 0,022	1,406 $\pm$ 0,021	1,225 $\pm$ 0,019	1,341 $\pm$ 0,010
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	0,241 $\pm$ 0,016	0,357 $\pm$ 0,016	0,306 $\pm$ 0,016	0,351 $\pm$ 0,015	0,195 $\pm$ 0,015	0,290 $\pm$ 0,007
Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	0,164 $\pm$ 0,011	0,240 $\pm$ 0,011	0,207 $\pm$ 0,011	0,235 $\pm$ 0,011	0,130 $\pm$ 0,010	0,195 $\pm$ 0,005
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S\mu^{**}$	1,448 $\pm$ 0,285	1,576 $\pm$ 0,144	1,510 $\pm$ 0,207	1,560 $\pm$ 0,121	1,405 $\pm$ 0,301	1,624 $\pm$ 0,071
Доля редких аллелей, $h\mu \pm Sh^{**}$	0,276 $\pm$ 0,142	0,212 $\pm$ 0,072	0,245 $\pm$ 0,103	0,220 $\pm$ 0,060	0,297 $\pm$ 0,150	0,188 $\pm$ 0,035
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами	0,78 - 0,96	0,74 - 0,87	0,79 - 0,93	0,76 - 0,91	0,84 - 0,97	0,71 - 0,97

* Se – стандартная ошибка; ** $S\mu$ и Sh – статистические ошибки соответствующих показателей

Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяций из хутора Красноярский, Серафимовичского района (69,07%) и лимана Хреноватый, Николаевского района (68,17%). Наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности отмечены для популяции лимана Хреноватый, Николаевского района. Наименее разнообразной по этим показателям была популяция из хутора Буерак-Поповский, Серафимовичского района. Среднее число аллелей в популяции варьировало от 1,405 (популяция хутора Буерак-Поповский) до 1,576 (популяция лимана Хреноватый). Максимальная доля редких аллелей отмечена для популяции хутора Буерак-Поповский, а минимальная – для популяции лимана Хреноватый. Диапазон индексов генетического сходства (Дайса) между растениями из одной популяции был достаточно узок.

Наиболее широкий диапазон имела популяция лимана Хреноватый Николаевского района, а наименее – популяция хутора Буерак-Поповский (Серафимовичский р-н) (Таблица 3.16).

Диапазон индексов генетического сходства Дайса между всеми образцами из пяти популяций составил от 0,71 (между №23 (популяция Николаевского района, лиман Хреноватый) и №83 (популяция Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский)) до 0,97 (между образцами №80 и №82 (популяция Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский)).

Определение уровней межпопуляционных различий. Анализ уровня межпопуляционных различий начали с определения значений генетических расстояний Нея между популяциями. Данный показатель оказался невысоким, варьировал от 0,055 (между популяциями Николаевского района (лиман Хреноватый) и Серафимовичского района (хутор Красноярский)) до 0,163 (между популяциями из Быковского района (лиман Тажи) и Серафимовичского района (хутор Буерак-Поповский)) (Таблица 3.17).

Таблица 3.17. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *A. regelianum*, рассчитанный по результатам AFLP-анализа.

Быковский р-н, лиман Тажи	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	
0,105	0				Николаевский р-н, лиман Хреноватый
0,108	0,068	0			Николаевский р-н, лиман Богатырев
0,110	0,055	0,069	0		Серафимовичский р-н, хут. Красноярский
0,163	0,141	0,153	0,080	0	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский

Также была определена генетическая структура пяти изученных популяций *A. regelianum*. Общее генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) составила 0,260, внутрипопуляционное генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,195. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,250. Показатель генного потока составил $Nm=1,501$.

Анализ молекулярной дисперсии показал, что большая часть изменчивости *A. regelianum* связана с внутрипопуляционными различиями (81%), а на межпопуляционный полиморфизм приходится 19% от общей гетерогенности.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием не показал корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. regelianum*.

Далее был проведен анализ методом главных координат в программе PAST 3.09, куда были включены образцы из пяти популяций (Рисунок 3.35).

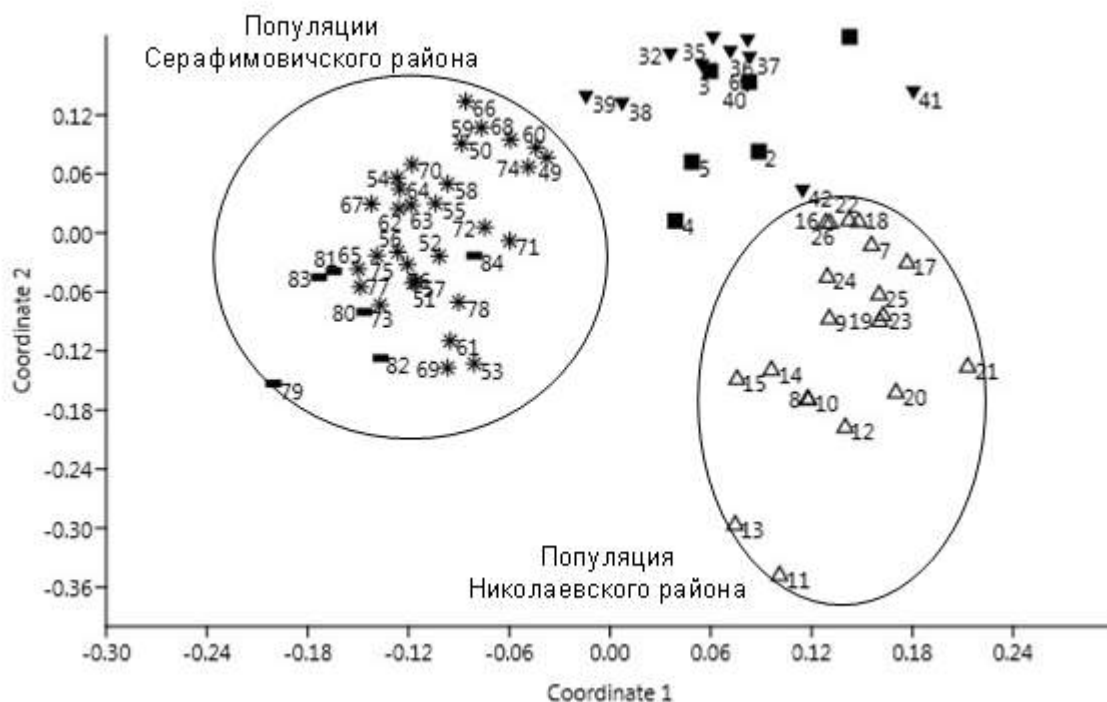


Рисунок 3.35. Расположение образцов *A. regelianum* из пяти популяций (с числом растений пять и более) в главных координатах, по результатам AFLP-анализа. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский.

На графике можно выделить две группы образцов (Рисунок 3.35). Первая группа объединяет две популяции из Серафимовичского района, а ко второй группе можно отнести образцы из популяции Николаевского района (лиман Хреноватый). Образцы из популяций Быковского и Николаевского (лиман Богатырев) районов занимают промежуточное положение между группами, однако географически более близки ко второй группе.

Похожий результат был получен при проведении данного анализа на общей выборке (Рисунок 3.36). Здесь в первую группу попадают образцы из всех популяций Серафимовичского района, образцы из популяции Алексеевского, Фроловского района, во вторую группу – образцы из двух популяций Николаевского района (лиман Хреноватый и лиман Медвежий). Третью группу образуют популяции Быковского, Иловлинского района и популяция Николаевского района, лиман Богатырев.

Формирование таких групп можно связать с географическим положением. Так первая группа приурочена к руслу реки Дон, вторая – к Волгоградскому водохранилищу. Однако дифференциация согласно географическому принципу справедлива не для всех популяций. Например, популяции из третьей группы (Быковского и Николаевского района, лиман Богатырев) географически близки к популяциям второй группы, однако генетически их нельзя отнести к этой группе.

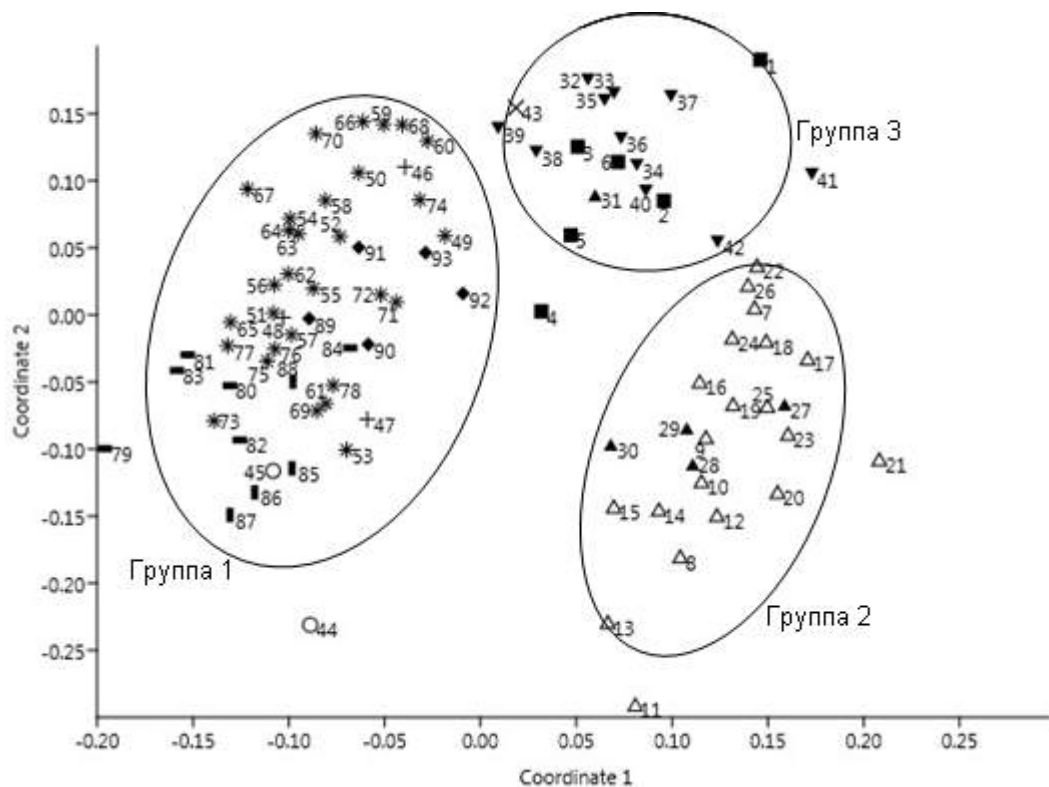


Рисунок 3.36. Дифференциация всех изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по данным AFLP-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; 85-88 (▬) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; 89-93 (◆) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

Анализ популяционной структуры *A. regelianum* был проведен в программе Structure 2.3.4. С помощью метода *deltaK*, установлено, что оптимальное число кластеров, на которые можно разбить образцы *A. regelianum* составляет два ($K=2$) (Рисунок 3.37). Начиная с $K=8$, добавочные кластеры поглощают крайне незначительную долю генетической изменчивости.

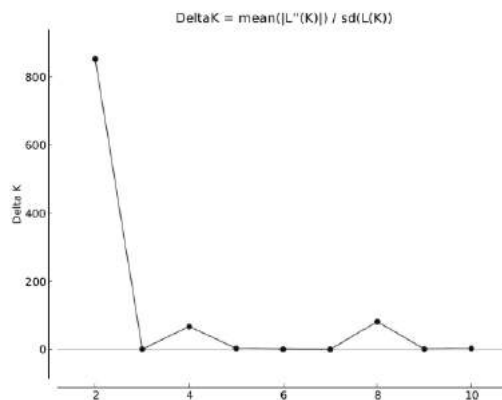


Рисунок 3.37. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

Рассмотрим структуру популяций *A. regelianum* при числе кластеров $K=2$ до $K=8$ (Рисунок 3.38). При простейшей модели ($K=2$) популяции подразделяются на две основных группы – популяции Быковского и Николаевского районов и популяции Серафимовичского, и Алексеевского районов. Популяции Фроловского и Иловлинского районов представлены крайне малым числом образцов, поэтому относить их к тому или иному кластеру мы не можем. С увеличением числа вероятных популяций до 3, в отдельную группу можно отнести образцы из популяций Быковского района и лимана Богатырев (Николаевский район). При $K=4$, выделяется группа, состоящая из образцов популяций Алексеевского района, Серафимовичского района (хут. Буерак-Поповский и Новоалександровский), а также часть образцов из многочисленной популяции хутора Красноярский. Для $K=5$ и $K=6$ стоит отметить выделение популяции Быковского района в отдельную группу. Начиная с $K=7$ выделяется и популяция Алексеевского района, а также в отдельные группы отходят популяции Николаевского района, лиман Богатырев и лиман Медвежий.

В целом можно говорить о двух-трех группах популяций, которые на своем уровне тоже делятся на более мелкие подгруппы. Чаще всего такие подгруппы представляют отдельные популяции (выборку растений из одной точки сбора). Кроме того, как мы видим на примере популяции хутора Красноярский, внутри популяции также могут существовать и отдельные субпопуляции. Дифференциация на уровне групп популяций более четкая, чем на уровне отдельных популяций или внутри нее, где генетические различия еще не столь очевидны.

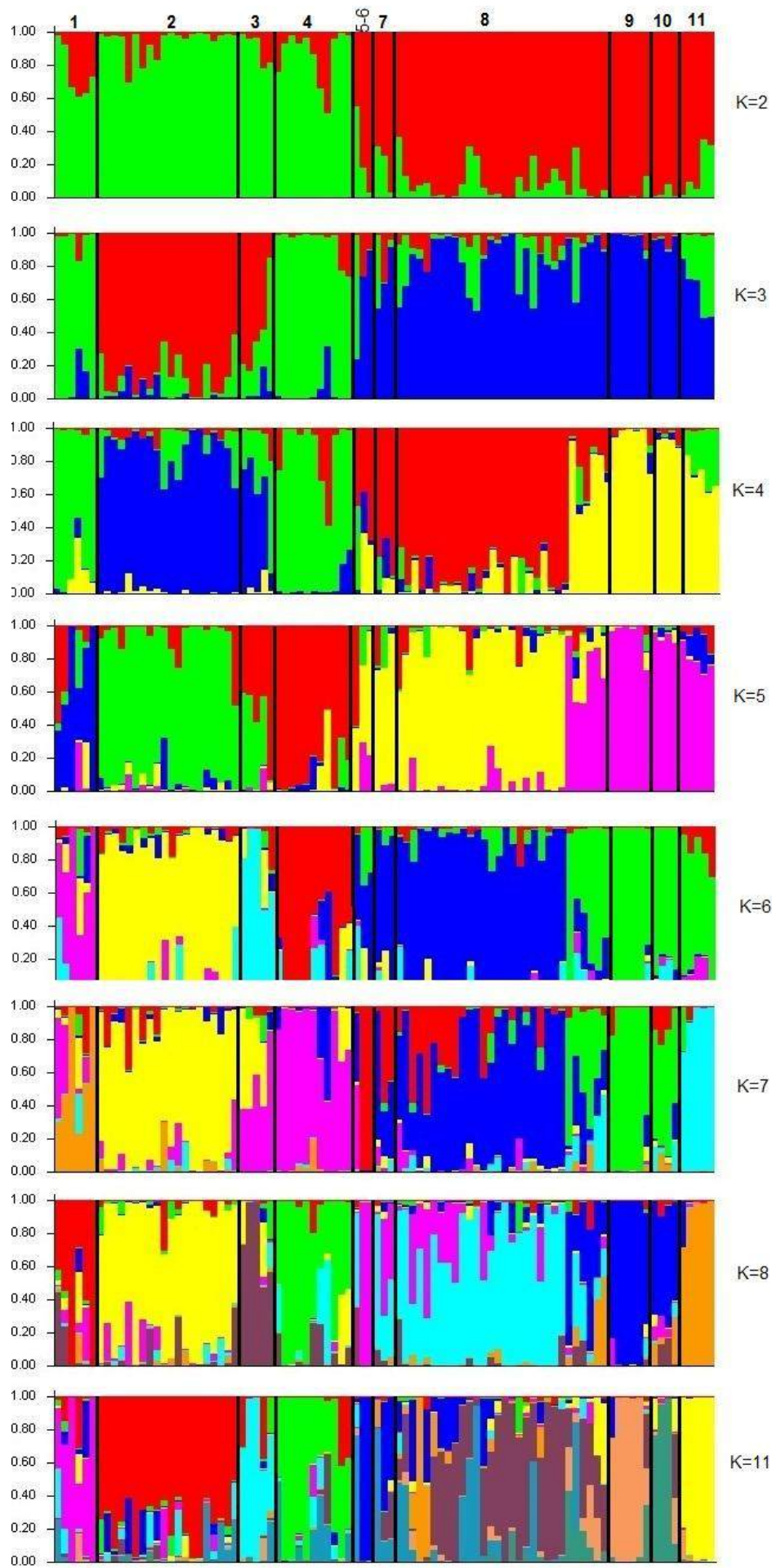


Рисунок 3.38. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. regelianum* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; **2** – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; **3** – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; **4** – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; **5** – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; **6** – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; **7** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; **8** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; **9** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; **10** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; **11** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

3.2.2.4 Анализ меж- и внутривидовой изменчивости *Allium regelianum* с помощью NBS-профайлинга

Для анализа полиморфизма последовательностей NBS-LRR генов устойчивости в популяциях *A. regelianum* были использованы четыре комбинации праймер/фермент – NBS2/Tru1I, NBS3/Tru1I, NBS5/Tru1I и NBS9/Tru1I.

В работе были проанализированы 84 образца *A. regelianum*, включая 76 образцов, собранных на территории Волгоградской области сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада (исключая №1, 5, 11, 14, 21, 26, 30, 41, 42, 57, 59, 65, 66, 69, 70, 73, 75, 85, 87, 90, 92, выборка была сокращена, исходя из технических возможностей прибора), и восемь образцов из других регионов России, полученных из гербарных коллекций Главного Ботанического Сада им. Цицина РАН и МГУ имени М.В. Ломоносова (Таблица 2.2, Материалы и методы). В качестве внешней группы для *A. regelianum* были взяты другие представители рода *Allium*, *A. ampeloprasum*, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. tuncelianum*, *A. rotundum*, *A. nutans*, *A. altaicum* (см. Материалы и методы). Общее количество исследуемых образцов составило 96.

В результате NBS-профайлинга было получено 250 фрагментов из которых 105 (42%) были полиморфными. Число ДНК фрагментов, амплифицируемых с одним праймером составило от 56 (NBS5) до 67 (NBS2). Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймеров NBS2 и NBS3 (33), минимальное – NBS5 (16). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером колебался в пределах от 29% (для праймера NBS5) до 50% (для праймеров NBS3) (данные об информативности применяемых праймерных комбинаций приведены в Приложении 3).

На рисунке 3.39 показан спектр фрагментов, полученный в результате проведения NBS-профайлинга образцов *A. regelianum*. Видоспецифичные фрагменты были отмечены для образцов *A. nutans* (секция *Rhizirideum*) и *A. altaicum* (секция *Cepa*). Кроме того, для

представителей секции *Allium* (*A. ampeloprasum*, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. tuncelianum*, *A. rotundum*) и *A. regelianum* было отмечено 7 общих фрагментов. 10 фрагментов отличали образцы *A. regelianum* от других взятых в анализ видов. Всего же для *A. regelianum* было детектировано 232 фрагмента, из которых 32% оказались полиморфными.

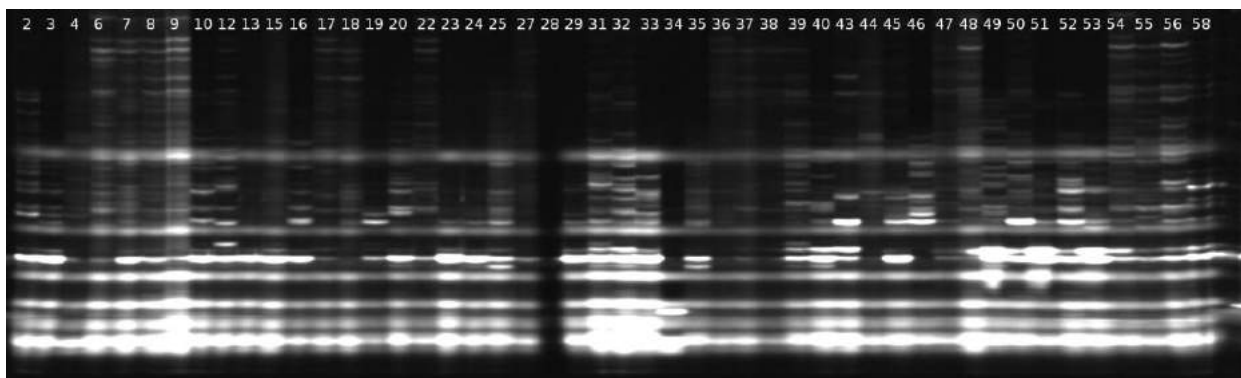


Рисунок 3.39. NBS-спектр образцов *A. regelianum*, полученный с использованием комбинации NBS3/Tru1I (фрагмент геля). 1-6 – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-58 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский.

Анализ межвидовых различий. Величина коэффициента генетического сходства Дайса между всеми образцами варьировала от 0,340 (между образцами №2 *A. regelianum* из популяции Быковского района, Волгоградской области и *A. altaicum*) до 0,994 (между образцами *A. regelianum* №64 и №78 (Волгоградская область, Серафимовичский район, хутор Красноярский). На основе данного коэффициента был проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.40).

На PCoA графике образцы *A. regelianum* образовали компактную группу. Наиболее близко к этой группе располагаются образцы, относящиеся к секции *Allium*, а наиболее обособлены от *A. regelianum* представители секций *Rhizirideum* и *Cepa* (Рисунок 3.40).

Проведенный анализ полиморфизма генов устойчивости позволяет говорить о принадлежности *A. regelianum* к секции *Allium*. Такой результат подтверждает данные, полученные с помощью анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей ядерного и хлоропластного генома, а также не противоречит классификации рода *Allium*, основанной на морфологических признаках. Учитывая обособленное положение группы образцов *A. regelianum* от других видов секции *Allium*, наличие специфичных фрагментов может говорить о некоторой степени уникальности семейства генов устойчивости *A. regelianum*.

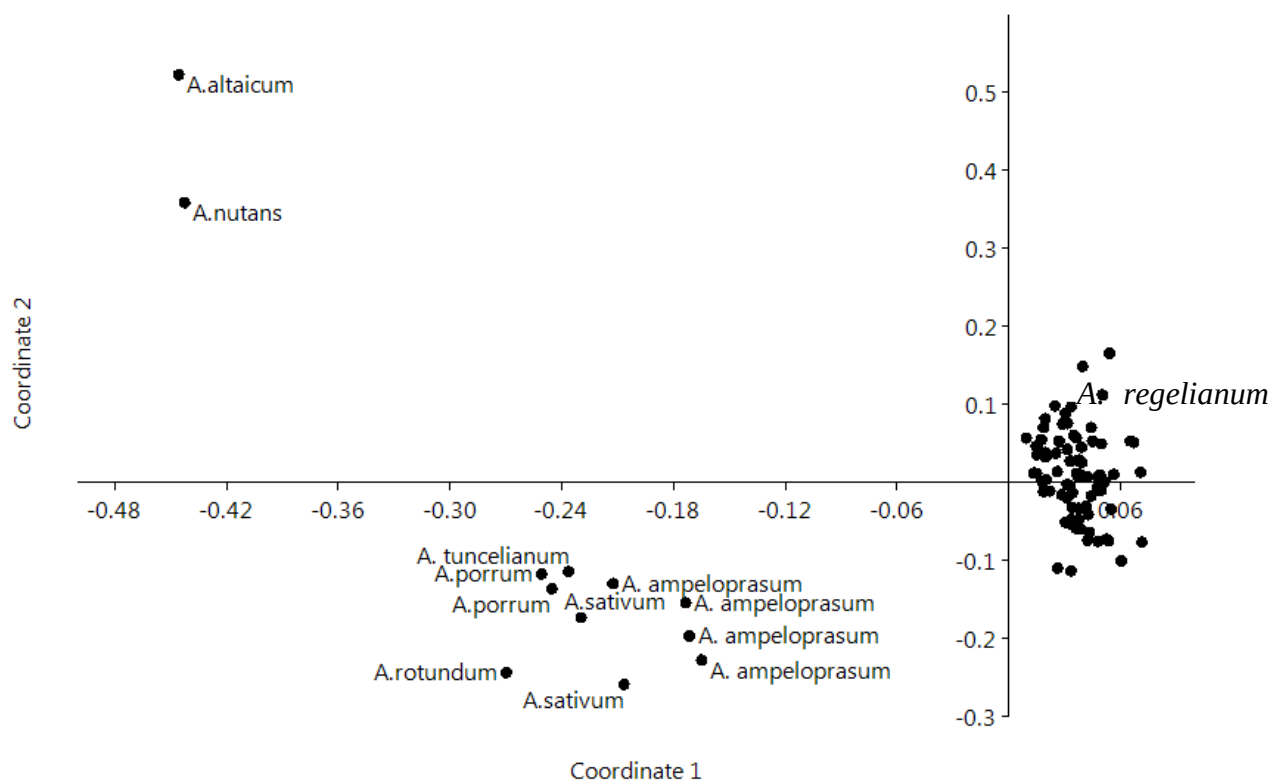


Рисунок 3.40. Дифференциация изучаемых образцов рода *Allium*, выявленная по данным NBS-профайлинга с использованием метода главных координат.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Как и для других методов, для анализа внутрипопуляционного полиморфизма были взяты популяции, где число растений было больше пяти. Для каждой популяции были рассчитаны основные показатели внутрипопуляционного генетического разнообразия (Таблица 3.18). Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяции из хутора Красноярский, Серафимовичского района (29,39%). Наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности выявлены для популяции лимана Хреноватый, Николаевского района. Наименьшие значения всех показателей внутрипопуляционного разнообразия отмечены для популяции хутора Буерак-Поповский, Серафимовичского района (Таблица 3.18). Были также рассчитаны показатели среднего числа аллелей в популяции и доля редких аллелей в ней. В популяции из хутора Буерак-Поповский отмечено наименьшее среднее число аллелей и наибольшая доля редких аллелей, а в популяции лимана Хреноватый, наоборот, выявлена наименьшая доля редких аллелей и наибольшее среднее число аллелей.

Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее широкий диапазон данного индекса отмечен для

популяции Николаевского района, лиман Хреноватый, наименее – для популяции из Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский (Таблица 3.18).

Таблица 3.18. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. regelianum*, рассчитанные по результатам NBS-профайлинга.

Показатель	Популяция				
	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	4 анализируемые популяции
% полиморфизма	27,36	26,13	29,39	25,53	30,47
Число эффективных аллелей, $ne \pm Se^*$	1,248 $\pm$ 0,030	1,234 $\pm$ 0,031	1,214 $\pm$ 0,027	1,172 $\pm$ 0,028	1,217 $\pm$ 0,014
Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	0,219 $\pm$ 0,023	0,197 $\pm$ 0,024	0,202 $\pm$ 0,022	0,144 $\pm$ 0,022	0,190 $\pm$ 0,011
Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	0,146 $\pm$ 0,016	0,133 $\pm$ 0,016	0,131 $\pm$ 0,015	0,144 $\pm$ 0,022	0,127 $\pm$ 0,008
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu^{**}$	1,354 $\pm$ 0,202	1,348 $\pm$ 0,262	1,347 $\pm$ 0,174	1,293 $\pm$ 0,357	1,400 $\pm$ 0,109
Доля редких аллелей, $h_\mu \pm Sh^{**}$	0,323 $\pm$ 0,101	0,326 $\pm$ 0,131	0,326 $\pm$ 0,087	0,354 $\pm$ 0,178	0,300 $\pm$ 0,054
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,85-0,95	0,86-0,96	0,83-0,97	0,87-0,92	0,83-0,99

* Se – стандартная ошибка; ** S_μ и Sh – статистические ошибки соответствующих показателей

Индекс генетического сходства Дайса между образцами из четырех популяций варьировал от 0,830 (между образцом №15 (популяция Николаевского района, лиман Хреноватый) и образцом №50 (популяция Серафимовичского района, хутор Красноярский)) до 0,994 (между образцами №64 и №78 (популяция Серафимовичского района, хутор Красноярский) (Таблица 3.18).

Определение уровней межпопуляционных различий. Для определения уровня различий между популяциями был определен индекс генетических расстояний Нея. Он был очень низким и составил от 0,020 (между популяциями из Серафимовичского района, хуторов Красноярский и Буерак-Поповский) до 0,043 (между популяцией лимана Богатырев, Николаевского района и популяцией из Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский) (Таблица 3.19).

Таблица 3.19. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями *A. regelianum*, рассчитанный по результатам NBS-профайлинга.

Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	
0,034	0			Николаевский р-н, лиман Богатырев
0,031	0,034	0		Серафимовичский р-н, хут. Красноярский
0,040	0,043	0,020	0	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский

Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,127, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) не превышала 0,149. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,146. Показатель генного потока составил $Nm=2,920$.

Как показал анализ молекулярной дисперсии (AMOVA), в составе общей генетической гетерогенности вида лишь 10% генетического разнообразия *A. regelianum* приходится на межпопуляционные различия, а оставшуюся часть (90%) составляет доля внутривидового полиморфизма.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием не выявил корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. regelianum*.

Далее была проведена дифференциация образцов из четырех популяций методом главных координат в программе PAST (Рисунок 3.41).

На PCoA графике все исследуемые образцы *A. regelianum* образуют единую группу, выделить четкие подгруппы довольно сложно, можно говорить лишь о частичном обособлении популяций Серафимовичского района, хутора Красноярский и хутора Буерак-Поповский от популяции Николаевского района, лиман Хреноватый. Вторая популяция из Николаевского района, лиман Богатырев занимает промежуточное положение на графике.

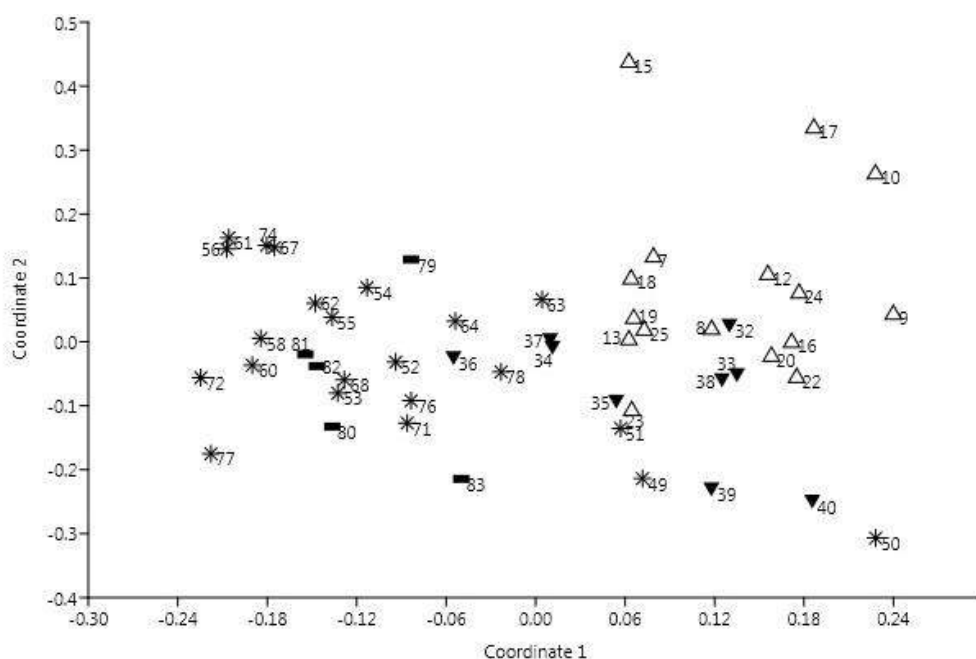


Рисунок 3.41. Расположение образцов *A. regelianum* из пяти популяций (с числом растений пять и более) в главных координатах по результатам NBS-профайлинга. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 32-42 (▼) – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (■) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский.

На Рисунке 3.42 представлена дифференциация всех образцов *A. regelianum*, взятых в анализ. Как и в случае с четырьмя популяциями, следует отметить их слабую дифференциацию; кроме того, здесь менее выражено обособление популяций Серафимовичского района от популяции Николаевского района. Образцы *A. regelianum*, собранные в других регионах России, не дифференцированы от образцов из Волгоградской области.

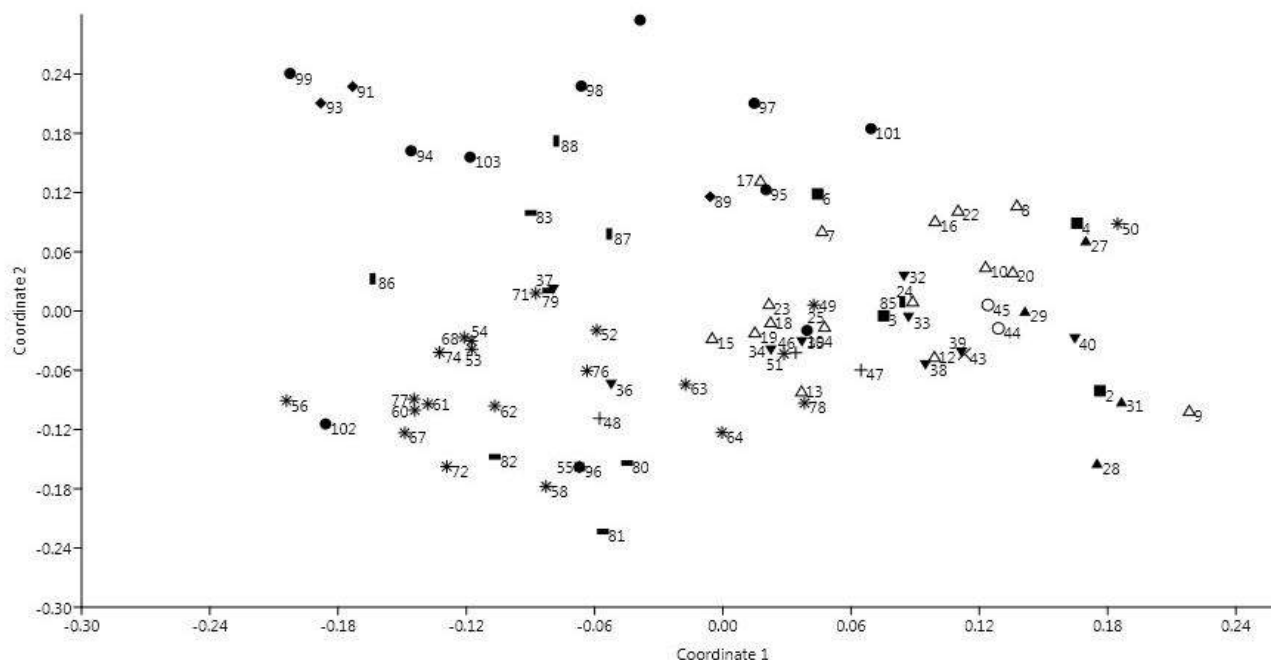


Рисунок 3.42. Дифференциация всех изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по данным NBS-профайлинга с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; 85-88 (▮) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; 89-92 (◆) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская, 94 – Иловлинский р-он, пос. Качалино; 95 – Фроловский р-он, между хут Выездинским и ст-цей Кременской; 96 – Иловлинский р-он, напротив хут. Зимовский Сиротинской ст-цы; 97-98 – Астраханская обл.; 99 – Ростовская обл.; 100 – Воронежская обл.; 101 – Калмыкия, озеро Маныч-Гудило; 102 – Калмыкия, 20 км ЮЗ Элисты; 103 – Крым; 104 – Украина.

Также был проведен анализ популяционной структуры *A. regelianum* в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров составило три ($K=3$) (Рисунок 3.43), однако, на графике достаточно большое значение ΔK отмечается и при $K=2$ (как и при RAPD-, ISSR-, AFLP-анализе). Рассмотрим дифференциацию образцов *A. regelianum* при $K=2$ и $K=3$ (Рисунок 3.44 а, б).

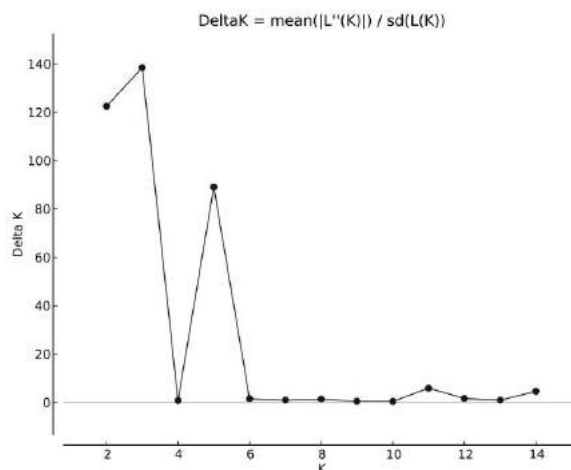


Рисунок 3.43. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

На Рисунке 3.44а можно выделить две группы популяций по преобладающему в них компоненту: это популяции Заволжья (популяции №1-4 Николаевского и Быковского районов), к этой же группе следует отнести образцы из Иловлинского (№5) и Фроловского (№6) района и одну популяцию из Серафимовичского района, хут. Дружилинский (№7) и популяции бассейнов Дона и Хопра (популяции №8-9). Большинство образцов из гербарных коллекций относятся ко второй группе образцов, за исключением №75, 81, 84.

С увеличением количества групп до трех (Рисунок 3.44б) в отдельную группу попадают образцы из Алексеевского района (№11), часть образцов из популяции №10 (Серафимовичский район, хут. Новоалександровский) и большинство образцов из других регионов России (за исключением №76, 82, 84).

Проанализировав полученные данные, можно говорить о достаточно слабой дифференциации образцов. В популяционной структуре *A. regelianum* можно выделить две основные группы. Первая – это образцы из популяций Заволжья, а вторая – образцы из популяций бассейна рр. Дон и Хопер.

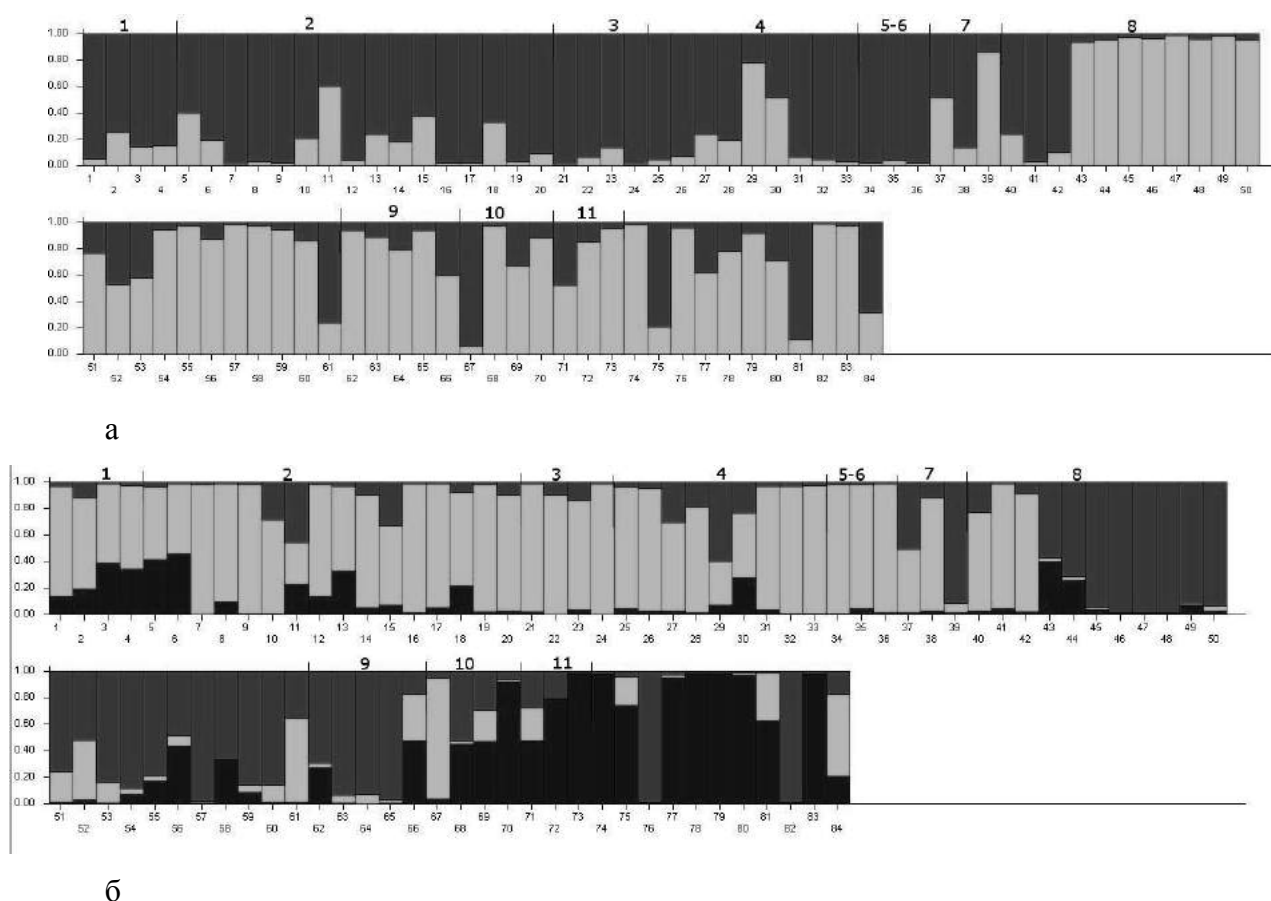


Рисунок 3.44. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. regelianum* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций: а – K=2, б – K=3. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; **2** – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; **3** – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; **4** – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; **5** – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; **6** – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; **7** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; **8** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; **9** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; **10** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; **11** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская. Далее образцы из гербарных коллекций: 74 – Иловлинский р-он, пос. Качалино; 75 – Фроловский р-он, между хут Выездинским и ст-цей Кременской; 76 – Иловлинский р-он, напротив хут. Зимовский Сиротинской ст-цы; 77-78 – Астраханская обл.; 79 – Ростовская обл.; 80 – Воронежская обл.; 81 – Калмыкия, озеро Маныч-Гудило; 82 – Калмыкия, 20 км ЮЗ Элисты; 83 – Крым; 84 – Украина.

3.2.3 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *A. regelianum* методами монолокусного анализа

Для оценки уровня полиморфизма генома *A. regelianum* был применен один из наиболее часто используемых методов монолокусного анализа – SSR-маркирование.

В анализ были отобраны 88 образцов *A. regelianum*, в том числе 77 из популяций Волгоградской области. Выборка образцов из Волгоградской области была сокращена в связи с

ограниченностью образцов, которые можно проанализировать с помощью камеры Sequi-Gen GT Sequencing Cell. Были исключены образцы №5, 14, 18, 22, 26, 39, 42, 57, 59, 65, 66, 69, 73, 75, 90, 92, а выборка была дополнена 11 образцами из гербарных коллекций (Таблица 2.2., Материалы и методы).

Анализ вариабельности четырех микросателлитных локусов выявил 23 аллельных варианта у 88 образцов. Количество аллелей на локус составило от 4 (*GB-AS-089*) до 7 (*ACM300* и *GB-AS-091*) (Таблица 3.20).

Таблица 3.20. Показатели информативности микросателлитных локусов, использованных в анализе.

Локус	Число аллельных вариантов	Частота встречаемости каждого аллельного варианта, %	PIС
<i>ACM300</i>	7	$a - 0,375; b - 0,159; c - 0,216; d - 0,085; e - 0,006; f - 0,023; \text{ноль-аллель} - 0,136$	0,72
<i>GB-AS-091</i>	7	$a - 0,381; b - 0,29; c - 0,102; d - 0,04; e - 0,011; f - 0,051; \text{ноль-аллель} - 0,125$	0,70
<i>ACM146</i>	5	$a - 0,284; b - 0,136; c - 0,011; d - 0,034; \text{ноль-аллель} - 0,535$	0,55
<i>GB-AS-089</i>	4	$a - 0,341; b - 0,477; c - 0,023; \text{ноль-аллель} - 0,159$	0,56

Для локуса *ACM300* было детектировано семь аллельных вариантов с частотой встречаемости от 0,006 до 0,375. При анализе вариабельности шести видов различных секций рода *Allium* данный маркер также был полиморфным, однако максимальное число выявленных аллельных вариантов не превышало пяти (у вида *A. ampeloprasum*) [Mallor et al., 2014]. Доля гетерозигот составила 56,8%. Коэффициент PIC (Polymorphic Information Content) для данного локуса был равен 0,72.

Семь аллельных вариантов выявлено для микросателлитного локуса *GB-AS-091*. Ранее при анализе вариабельности 20 образцов пяти видов рода *Allium* [Lee et al., 2011] был выявлен только один аллель локуса *GB-AS-091*. На Рисунке 3.45 представлено аллельное разнообразие данного локуса у образцов *A. regelianum*. Из 88 образцов 26 (29,5%) были гетерозиготны. Коэффициент PIC составил 0,70.

Для локуса *ACM146* выявлено пять аллельных вариантов. В работе Mallor с соавторами при исследовании шести видов рода *Allium*, для локуса *ACM146* было идентифицировано всего два аллельных варианта [Mallor et al., 2014]. Все образцы оказались гомозиготными. Коэффициент PIC составил 0,55.

Четыре аллельных варианта было обнаружено для локуса *GB-AS-089*. По данным Lee с соавторами et al., 2011 количество выявленных аллельных вариантов для локуса *GB-AS-089* варьировало от 1 у *A. sativum* до 7 у *A. fistulosum* [Lee et al., 2011]. 97,6% образцов *A. regelianum* можно описать тремя аллельными вариантами. Гетерозиготных вариантов не обнаружено. Коэффициент PIC составил 0,56.



Рисунок 3.45. Аллельное разнообразие локуса *GB-AS-091* у образцов *A. regelianum* (фрагмент геля) 1-6 – популяция Быковского р-на; 7-25 – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-41 – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 – популяция Иловлинского р-на; 44-45 – популяция Фроловского р-на; 46-48 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; 85-86 – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский.

Определение уровней внутривнутрипопуляционного полиморфизма. Анализ внутривнутрипопуляционного полиморфизма был проведен для четырех популяций, где количество собранных образцов превышало пять. Число аллелей на данную выборку (54 образца) составило: для локуса *ACM300* – шесть, *GB-AS-091* – шесть, *ACM146* – четыре, *GB-AS-089* – четыре аллельных варианта (Таблица 3.21). Таким образом, в рассматриваемой выборке присутствует большая часть аллельных вариантов, выявленных для общей выборки. Все локусы оказались полиморфными во всех рассматриваемых популяциях *A. regelianum*.

Далее для каждой популяции были рассчитаны основные показатели генетического разнообразия (Таблица 3.22). Наиболее разнообразными по числу аллелей на локус, эффективному числу аллелей и информационному индексу Шеннона оказались популяции лимана Хреноватый и хутора Буерак-Поповский, а наименее – популяция лимана Богатырев. Показатель наблюдаемой гетерозиготности составил от 0,14 (для популяции из Николаевского района, лиман Хреноватый) до 0,29 (для популяции из Серафимовичского района, хут. Красноярский). Наибольшее значение показателя ожидаемой гетерозиготности отмечено в популяции из хутора Буерак-Поповский. наименьшее – в популяции лимана Богатырев Среднее число аллелей в популяции варьировало от 2,535 (популяция лимана Богатырев) до 3,043 (популяция лимана Хреноватый), а доля редких аллелей – от 0,385 (популяция лимана Хреноватый) до 0,487 (популяция лимана Богатырев) (Таблица 3.22).

Таблица 3.21. Частоты встречаемости аллельных вариантов четырех микросателлитных локусов в популяциях *A. regelianum* Волгоградской области.

Популяция	Частота встречаемости аллельных вариантов локуса			
	АСМ300	GB-AS-091	АСМ146	GB-AS-089
Николаевского р-н, лиман Хреноватый	$a - 0,47$; $b - 0,03$; $c - 0,19$; ноль-аллель – 0,31	$a - 0,56$; $b - 0,18$; $c - 0,13$; ноль-аллель – 0,13	$a - 0,31$; $b - 0,13$; ноль-аллель – 0,56	$a - 0,19$; $b - 0,75$; ноль-аллель – 0,06
Николаевского р-н, лиман Богатырев	$a - 0,39$; $b - 0,33$; $c - 0,11$; $d - 0,17$	$a - 0,56$; $b - 0,44$	$a - 0,11$; ноль-аллель – 0,89	$a - 0,33$; $b - 0,56$; $c - 0,11$
Серафимовичского р-н, хут. Красноярский	$a - 0,5$; $b - 0,21$; $c - 0,17$; $d - 0,1$; $f - 0,02$	$a - 0,5$; $b - 0,4$; $d - 0,05$; $f - 0,05$	$a - 0,67$; ноль-аллель – 0,33	$a - 0,33$; $b - 0,62$; ноль-аллель – 0,05
Серафимовичского р-н, хут. Буерак-Поповский,	$a - 0,5$; $c - 0,17$; $d - 0,17$; $f - 0,16$;	$c - 0,5$; $f - 0,33$; ноль-аллель – 0,17;	$a - 0,5$; $d - 0,33$; ноль-аллель – 0,17	$a - 0,67$; ноль-аллель – 0,33

Таблица 3.22. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. regelianum*, рассчитанные по результатам SSR-анализа.

Показатель	Популяция				
	Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	4 анализируемые популяции
Общее генное разнообразие, %	64	56	61		
Число аллелей на локус	3,50	2,75	3,50	3,00	5,00
Эффективное число аллелей, n_e	2,36	2,21	2,30	2,49	2,7
Наблюдаемая гетерозиготность, H_o	0,14	0,25	0,29	0,17	0,22
Ожидаемая гетерозиготность, H_e	0,58	0,52	0,56	0,64	0,63
Информационный индекс Шеннона, I	0,99	0,81	0,93	0,98	1,18
Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_\mu$ *	3,043 $\pm$ 0,607	2,535 $\pm$ 0,795	2,917 $\pm$ 0,506	2,851 $\pm$ 0,990	3,951 $\pm$ 0,274
Доля редких аллелей, $h_\mu \pm S_h$ *	0,385 $\pm$ 0,121	0,487 $\pm$ 0,159	0,423 $\pm$ 0,101	0,425 $\pm$ 0,197	0,215 $\pm$ 0,055
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,00-0,91	0,00-0,89	0,00-0,91	0,00-0,89	0,00-0,91

* S_μ и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. В каждой популяции были образцы, между которыми индекс генетического сходства был равен нулю, т.е. аллельные варианты были полностью разными. Максимальный уровень генетического сходства во всех популяциях был достаточно высоким (Таблица 3.22).

Определение уровней межпопуляционных различий. Индекс генетического сходства Нея между популяциями *A. regelianum* варьировал от 0,856 (между популяциями из Николаевского района (лиман Хреноватый) и Серафимовичского района (хутор Красноярский)) до 0,361 (между популяциями из Николаевского района, лиман Богатырев и Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский) (Таблица 3.23).

Также были рассчитаны значения F-статистики Райта: $F_{IS}=0,61$; $F_{IT}=0,68$; $F_{ST}=0,18$. Генный поток составил $Nm=1,12$. Значения F_{ST} говорит о низкой дифференциации популяций: 82% генетической изменчивости, выявленной у *A. regelianum* реализуется внутри популяций, на долю межпопуляционной изменчивости приходится всего 18%. Индекс фиксации Райта F_{IS} , отражающий инбридинг особи относительно популяции, показал, что у изучаемых популяций *A. regelianum* наблюдается дефицит гетерозигот. Показатель F_{IT} также говорит о высокой доле инбридинга особи относительно выборки в целом. Показатель потока генов (Nm) составил 1,12, что может быть связано с переносом пыльцы ветром на достаточно далекие расстояния.

Таблица 3.23. Индекс генетического сходства Нея (сверху) и значения F_{ST} (снизу) между популяциями *A. regelianum*, рассчитанные по результатам SSR-анализа.

Николаевский р-н, лиман Хреноватый	Николаевский р-н, лиман Богатырев	Серафимовичск ий р-н, хут. Красноярский	Серафимовичский р-н, хут. Буерак- Поповский	
0	0,854	0,856	0,434	Николаевский р-н, лиман Хреноватый
0,063	0	0,808	0,361	Николаевский р-н, лиман Богатырев
0,054	0,096	0	0,523	Серафимовичский р-н, хут. Красноярский
0,178	0,220	0,153	0	Серафимовичский р-н хут. Буерак-Поповский

При вычислении коэффициента подразделенности F_{ST} при попарном сравнении популяций максимальные различия выявлены между популяциями из Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский и Николаевского района, лиман Богатырев (0,22),

минимальные различия – между популяциями из Серафимовичского района, хутор Красноярский и Николаевского района, лиман Хреноватый (0,05) (Таблица 3.23).

Проведенный анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что в составе общей генетической гетерогенности вида 85% составляет доля внутривнутрипопуляционного полиморфизма и только 15% генетического разнообразия *A. regelianum* приходится на межпопуляционные различия.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием не выявил корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. regelianum*.

С помощью программы PAST 3.09 проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.46).

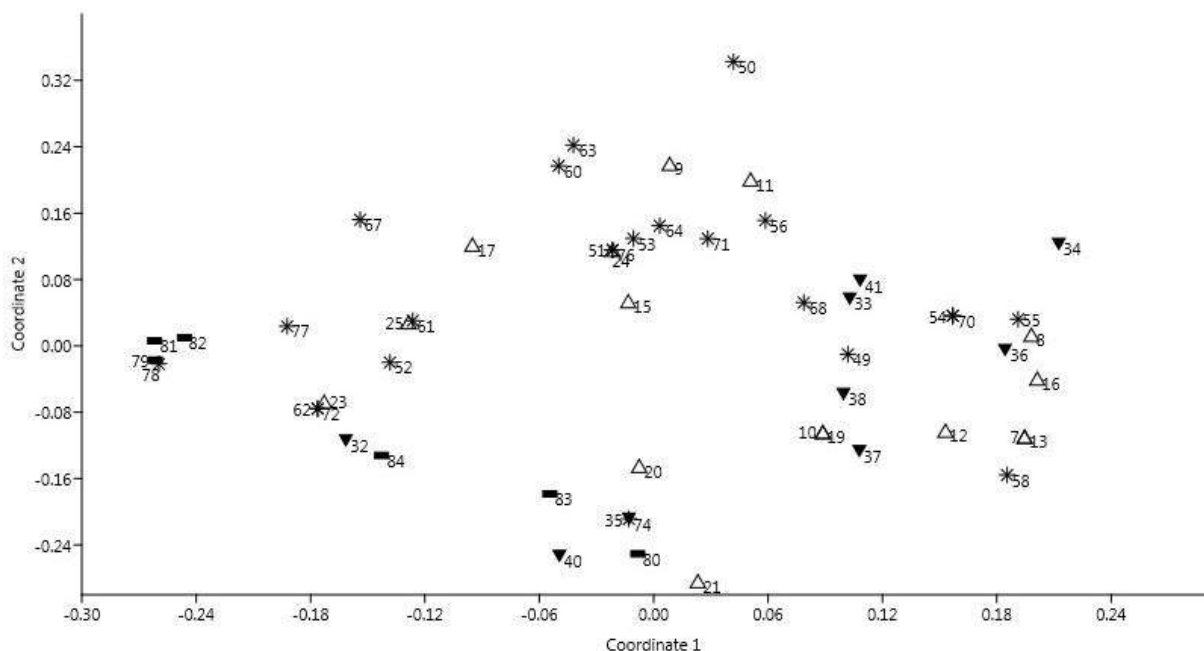


Рисунок 3.46. Расположение образцов *A. regelianum* из пяти популяций (с числом растений пять и более) в главных координатах по результатам SSR-анализа. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 32-42 (▼) – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (■) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский.

На РСоА графике исследуемые образцы можно дифференцировать на отдельные группы, однако, такое деление не связано с районом сбора образцов, а образцы из одной популяции попадают в разные группы.

Кроме того, был проведен анализ методом главных координат, куда были включены все 88 образцов *A. regelianum*. Изучаемые образцы образуют большую группу, в которой сложно выделить четкие подгруппы, и, в любом случае, ни одна из потенциальных подгрупп не может

быть ассоциирована с тем или иным районом сбора образцов, т.е. генетически исследуемые популяции между собой различаются слабо (Рисунок 3.47).

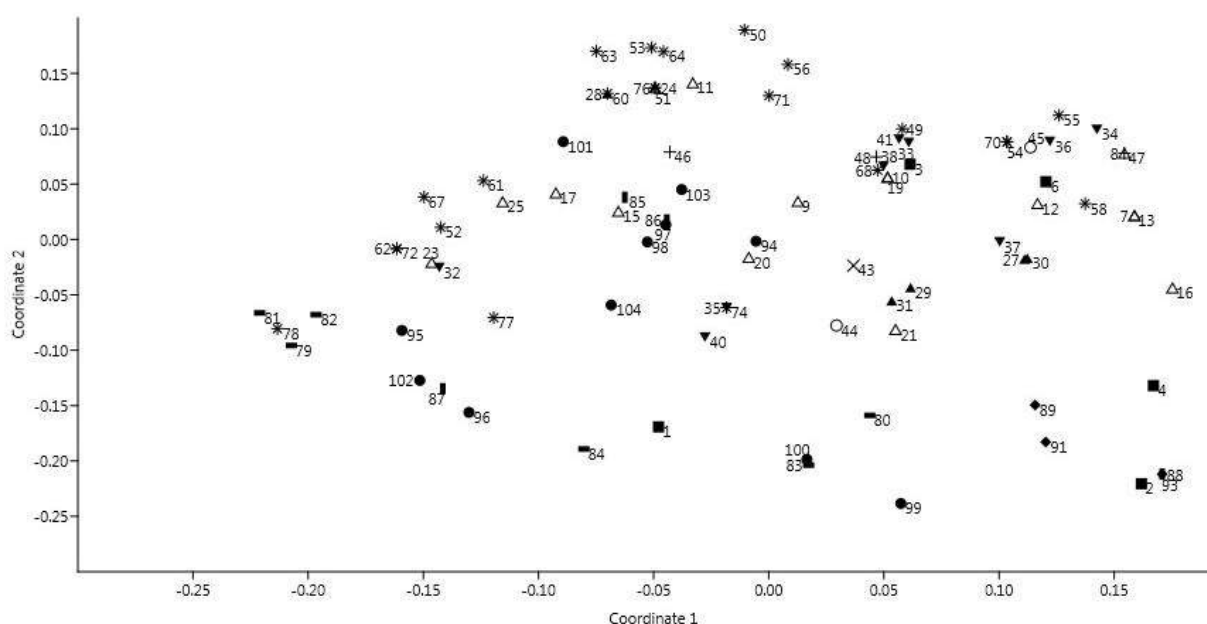


Рисунок 3.47. Дифференциация изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по данным SSR-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяция Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; 85-88 (|) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; 89-93 (◆) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

Кроме того, был проведен анализ популяционной структуры *A. regelianum* в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью методов *deltaK*, наилучшие результаты были получены для $K=2$ (Рисунок 3.48). На Рисунке 3.49 представлена кластеризация популяций *A. regelianum* при $K=2$, где также практически отсутствует дифференциация между популяциями.

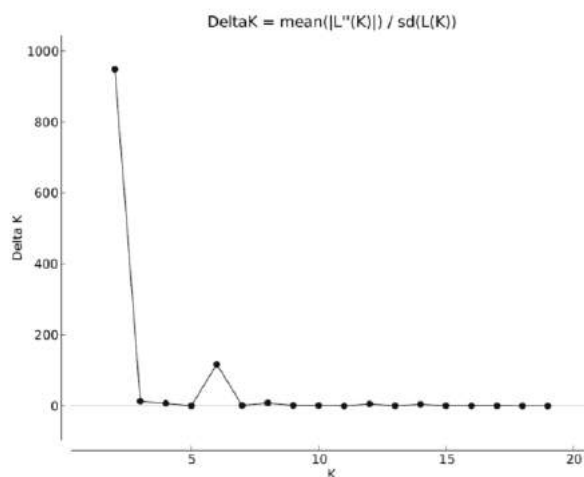


Рисунок 3.48. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

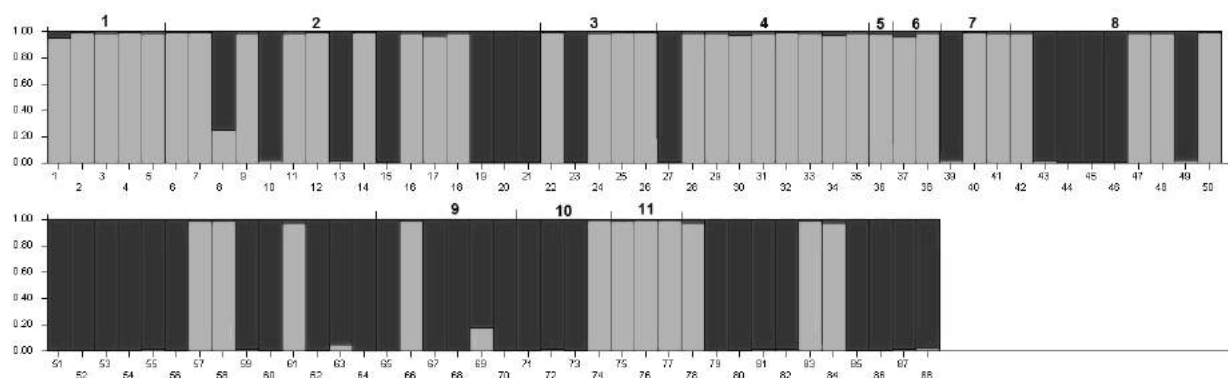


Рисунок 3.49. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. regelianum* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=2$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; **2** – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; **3** – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; **4** – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; **5** – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; **6** – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; **7** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; **8** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Красноярский; **9** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Буерак-Поповский; **10** – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; **11** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 78 – Иловлинский р-н, пос. Качалино; 79 – Фроловский р-н, между хут. Выездинским и ст-цей Кременской; 80 – Иловлинский р-он, напротив хут. Зимовский Сиротинской ст-цы; 81-82 – Астраханская обл.; 83 – Ростовская обл.; 84 – Воронежская обл.; 85 – Калмыкия, озеро Маныч-Гудило; 86 – Калмыкия, 20 км ЮЗ Элисты; 87 – Крым; 88 – Украина.

Одним из возможных объяснений такого низкого уровня дифференциации *A. regelianum*, произрастающего на территории Волгоградской области, может быть то, что исторически это была единая популяция, которая в результате антропогенной деятельности была географически раздроблена на отдельные субпопуляции, наблюдаемые в настоящий момент. При этом такие пространственно обособленные субпопуляции еще слабо отличаются друг от друга

генетически. Образцы из других регионов также не дифференцируются от образцов Волгоградской области, однако требуется большая выборка для проверки этих данных.

3.2.4 Сравнение результатов, полученных различными мульти- и монолокусными методами анализа

Для оценки генетического полиморфизма образцов *A. regelianum* нами были использованы мультилокусные маркеры (RAPD, ISSR, AFLP, NBS-профайлинг). Они позволяют оценить вариабельность большей части генома, а также удобны для изучения редких видов растений, которые практически не изучены генетически. Кроме мультилокусных методов анализа был также применен и монолокусный метод – SSR, который позволяет оценить вариабельность микросателлитных локусов.

Все использованные методы позволяли выявлять полиморфизм исследуемых образцов. Каждый из анализируемых образцов *A. regelianum* был охарактеризован специфичным спектром фрагментов.

Наибольший уровень полиморфизма выявлен с помощью SSR- и AFLP-маркеров, наименьший – с помощью NBS-профайлинга (Таблица 3.24).

Таблица 3.24. Общие данные по разнообразию *A. regelianum* с помощью каждого из методов анализа.

Показатель	Тип маркера				
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS	SSR
Число праймеров	8	6	5	4	4
Число фрагментов/аллельных вариантов	120	109	333	232	23
Уровень полиморфизма, %	75,8	79,8	80,5	32	100

Показатели разнообразия внутри популяций *A. regelianum*, а также для общей выборки полученные с помощью мультилокусных методов, в целом сопоставимы (Таблица 3.25), что говорит о достоверности полученных с помощью каждого метода данных и возможности их использования как в комплексе, так и по отдельности. Среди мультилокусных методов AFLP-анализ позволил получить наибольшие значения показателей внутривнутрипопуляционного разнообразия, а NBS-профайлинг – наименьшие. Показатели внутривнутрипопуляционного разнообразия были рассчитаны и по результатам SSR-анализа, важной особенностью которого является возможность выявлять гетерозиготные генотипы (Таблица 3.25).

Анализируя межпопуляционное разнообразие также можно отметить сходность результатов, полученных разными методами (Таблица 3.26). Наибольший уровень подразделенности отмечается при RAPD-анализе, наименьший – при NBS. Диапазон

генетических расстояний Нея между популяциями больше всего при RAPD-анализе, меньше всего – при NBS-профайлинге.

Таблица 3.25. Показатели внутрипопуляционного общей выборки разнообразия *A. regelianum*, полученные с помощью разных методов.

Показатель	Тип маркера				
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS	SSR
Число эффективных аллелей, n_e	1,369	1,336	1,341	1,217	2,7
Информационный индекс Шеннона, I	0,307	0,284	0,290	0,190	1,18
Ожидаемая гетерозиготность, H_e	0,209	0,192	0,195	0,127	0,63
Среднее число аллелей в популяции, μ	1,639	1,590	1,624	1,400	3,951
Доля редких аллелей, h_r	0,181	0,205	0,188	0,300	0,215
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,58-0,97	0,68-0,99	0,71-0,97	0,83-0,99	0,000-0,91

Таблица 3.26. Показатели межпопуляционной дифференциации *A. regelianum*, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.

Показатель	Тип маркера				
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS	SSR
Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S)	0,209	0,192	0,195	0,127	
Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T)	0,293	0,247	0,260	0,149	
Подразделенность популяций (G_{ST})	0,286	0,220	0,250	0,146	0,18
Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) доля межпопуляционной изменчивости/доля внутрипопуляционной изменчивости, %	23/77	17/83	19/81	10/90	15/85
Диапазон значений индекса генетических расстояний Нея между популяциями	0,056-0,195	0,042-0,131	0,055-0,163	0,020-0,040	

Дифференциация образцов на графике главных координат, а также результаты анализа в программе Structure были похожи для всех трех методов, однако степень этой дифференциации различна. Наиболее однородной изучаемая выборка выглядит на графике главных координат, построенном по данным SSR-анализа (Рисунок 3.47) и NBS-профайлинга (Рисунок 3.42). При ISSR-анализе мы наблюдали слабую дифференциацию образцов из популяций левого берега Волгоградского водохранилища (популяции Николаевского и Быковского районов) от образцов из популяций, расположенных на правом берегу Волги, приуроченных к руслу реки Дон (популяции Серафимовичского и Алексеевского районов) (Рисунок 3.31). Еще в большей степени эти группы популяций разделяются при RAPD-анализе (Рисунок 3.26). На графике

главных координат, построенном по данным AFLP-анализа (Рисунок 3.36), дифференциация этих групп популяций становится еще более явной. Внутри себя эти группы делятся на подгруппы (и чаще всего в эти подгруппы попадают образцы из одной точки сбора) Это показано при анализе в программе Structure для данных по AFLP-маркерам (как наиболее информативным) (Рисунок 3.38).

Анализ методом главных координат был также проведен на основе объединенных данных четырех мультилокусных методов (Рисунок 3.50). Дифференциация образцов *A. regelianum*, полученная при объединении данных, не противоречит результатам каждого из них. На Рисунке 3.50 дифференциация групп левого берега Волгоградского водохранилища (группа 1) и правого берега Волги (русла рек Дон и Хопер) (группа 2) наиболее четкая.

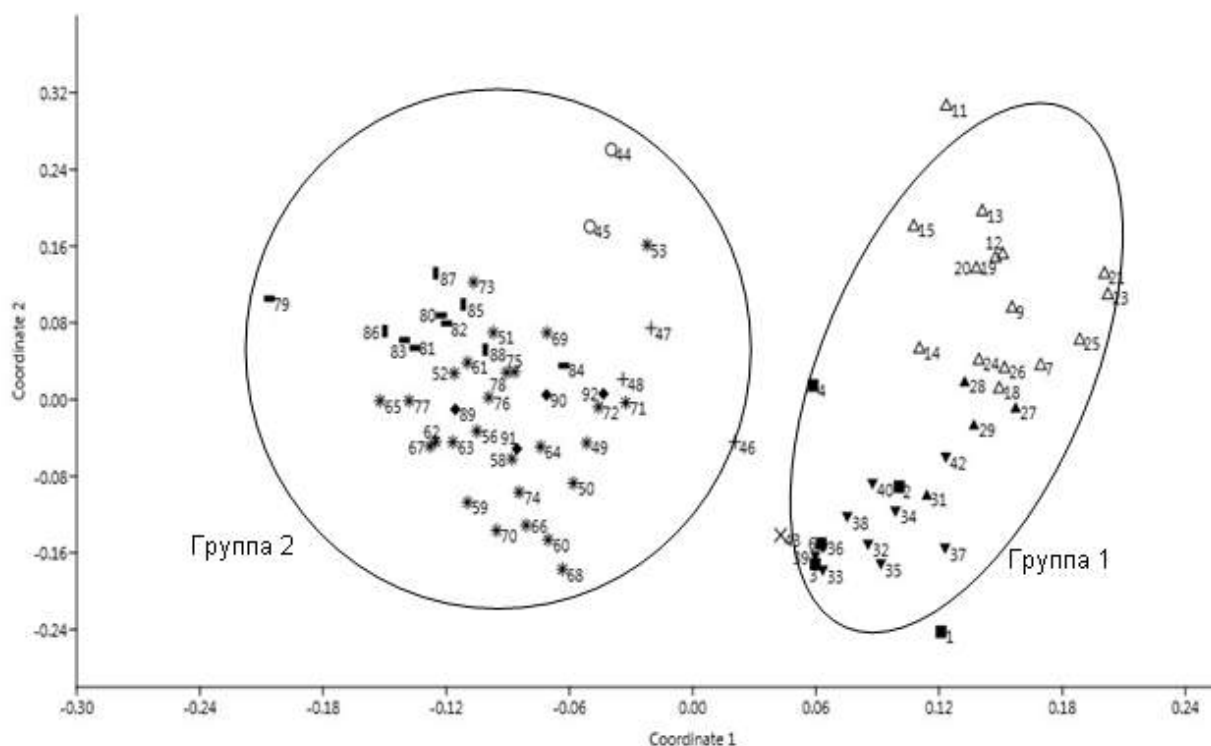


Рисунок 3.50. Дифференциация изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по объединенным данным с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-6 (■) – популяция Быковского р-на, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского р-на, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского р-на, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяции Николаевского р-на, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского р-на, хут. Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского р-на, хут. Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Дружилинский; 49-78 (*) – популяция Серафимовичского р-на хут. Красноярский; 79-84 (—) – популяция Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский; 85-88 (▣) – популяция Серафимовичского р-на, хут. Новоалександровский; 89-93 (◆) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская.

Между матрицами значений индекса генетического сходства Дайса и генетических расстояний Нея, рассчитанными по результатам разных методов выявлена статистически значимая, положительная корреляция (Приложение 12).

Таким образом, все применяемые методы анализа позволили получить достоверные, воспроизводимые сходные друг с другом результаты, что говорит о возможности применения каждого из них как по отдельности, так и в комплексе.

Наиболее информативным оказался метод AFLP-анализа, также достаточно эффективными при исследовании разнообразия *A. regelianum* оказались методы RAPD и SSR. Наименее информативным из применяемых оказался метод NBS-профайлинга.

3.2.5 Обсуждение результатов, полученных при изучении генетического разнообразия *A. regelianum*

Было проанализировано генетическое разнообразие редкого вида *A. regelianum*, произрастающего на территории Волгоградской области, с помощью моно- (SSR-анализ и анализ полиморфизма отдельных участков ядерного и хлоропластного геномов) и мультилокусных методов (RAPD, ISSR, AFLP, NBS).

С помощью анализа полиморфизма последовательностей ядерного и хлоропластного генома *A. regelianum* и других родственных видов рода *Allium* удалось определить положение *A. regelianum* внутри рода. По полученным данным, *A. regelianum* следует отнести к секции *Allium*. Наиболее близкими генетически являются виды *A. ampeloprasum* и *A. commutatum*. Также построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *A. regelianum*, которая оказалась сходной с предложенной и описанной ранее для представителей рода *Allium* [Филюшин, Кочиева, 2014].

Анализ последовательностей ITS1-5.8S-ITS2, *ndhJ-trnL*, *trnC-petN* позволил также выявить внутривидовой полиморфизм, который составил 0-5%. У другого редкого вида лука *A. tunzii*, уровень полиморфизма варьировал от 0 до 5,8% (по данным анализа последовательностей двух участков хпДНК) [Mashayekhi, Columbus, 2015].

Остальные примененные методы анализа также позволяли выявлять полиморфизм исследуемых образцов *A. regelianum*, он составил от 32% (по результатам NBS-профайлинга) до 100% (по результатам SSR-анализа). Уровень полиморфизма других редких видов рода *Allium* довольно сильно варьирует. Так, для вида *A. canariense* он составил 85% (по результатам ISSR-анализа) [Friesen et al., 2015], а для вида *A. hirtifolium* – 41,3% (по результатам RAPD-анализа) [Ebrahimi et al. 2008].

Уровень полиморфизма генов устойчивости установлен в основном только для культурных видов. Так, для культурных видов луков уровень полиморфизма был выше (для *A. porrum* – 59,5%, а для *A. sativum* – 63,1% [Филюшин, 2017]). Сопоставимый уровень полиморфизма генов устойчивости был получен при изучении образцов твердой пшеницы, он составил 27,5% [Mantovani et al., 2006]. При проведении NBS–профайлинга *A. regelianum* были также проанализированы межвидовые различия. Отметим, что образцы *A. regelianum* заняли обособленное положение от других видов рода *Allium*, что может говорить о некоторой степени уникальности семейства генов устойчивости изучаемого вида.

Показатели внутривидового разнообразия были достаточно высокими. Уровень внутривидового полиморфизма был оценен для популяций, где число растений было пять и более. Среди проанализированных популяций наибольшим уровнем разнообразия отличается популяция Николаевского района, лимана Хреноватый (по всем примененным мультилокусным методам). Наименьшие показатели внутривидового разнообразия отмечены для популяции Быковского района и Серафимовичского района, хутор Буерак-Поповский. Интересно отметить, что при SSR-анализе некоторые показатели разнообразия у популяции хутора Буерак-Поповский были выше, чем у остальных популяций. Такие данные требуют дополнительной проверки на большей выборке образцов, что в настоящем исследовании не предоставляется возможным из-за ограниченной численности растений в популяциях. Для популяций другого редкого вида *A. aaseae* показаны сходные результаты – процент полиморфизма варьировал от 40,3 до 62,7% (по данным RAPD-анализа) [Smith and Pham, 1996]. Показатели внутривидового разнообразия *A. mongolicum*, дикорастущего вида пустынь Китая, вычисленные в результате анализа полиморфизма микросателлитных локусов, оказались выше. Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность для двух популяций *A. mongolicum* составили 0,643 и 0,761 (для популяции Minqin) и 0,516 и 0,710 (для популяции Yinchuan) [Zhang et al., 2014].

Анализируя среднее число аллелей и долю редких аллелей в популяциях, можно сказать, что наиболее равномерно частоты распределены в популяции лимана Хреноватый Николаевского района, для данной популяции в большинстве случаев наблюдается наибольшее среднее число аллелей и наименьшая доля редких аллелей. Наибольшая доля редких аллелей и соответственно наименьшее среднее число аллелей отмечено для популяций хутора Буерак-Поповский, Серафимовичского района и лимана Тажи, Быковского района.

Учитывая индексы генетического сходства Дайса, также можно говорить о невысоком уровне генетического разнообразия *A. regelianum* Волгоградской области, что характерно для редких видов [Jian et al., 2006, Боронникова и др., 2009, Putz et al., 2015].

Далее были проанализированы данные по межпопуляционному разнообразию *A. regelianum*. Рассматривая данные о дифференциации популяций, можно говорить об их достаточно низком уровне подразделенности. Большая часть изменчивости приходится на внутрипопуляционную составляющую. Ранее отмечалось, что преимущественно семенное размножение и наличие перекрестного опыления могут приводить к тому, что большая часть генетических различий приходится на внутрипопуляционные различия [Hamrick and Godt, 1989; Hellier, 2000]. При изучении межпопуляционного генетического разнообразия трех диких видов *Allium*, (широкораспространенных *A. acuminatum*, *A. brandegei* и эндемика *A. passeyi*), произрастающих в горных районах штата Юта (США), с помощью AFLP-анализа показаны следующие результаты. Для всех видов межпопуляционная составляющая изменчивости меньше, чем внутрипопуляционная, особенно для эндемичного *A. passeyi* [Phillips et al., 2008]. Анализ генетической структуры другого редкого вида *A. aaseae*, собранного на территории штата Айдахо, показал, что $H_S=0,282$, $H_T=0,343$, $G_{ST}=0,136$ [Smith and Pham, 1996]. Уровень F_{ST} (аналог G_{ST}) для популяций эндемика Восточного Тибета *A. wallichii* составил 0,80 (по данным анализа участков хпДНК) и 0,74 (по данным анализа ITS-региона) [Huang et al., 2014], а для популяций *A. munzii*, произрастающих на территории Калифорнии, данный показатель достигает единицы (по данным анализа двух участков хпДНК) [Mashayekhi and Columbus, 2015].

Уровень генетической дистанции D_{Ne} между популяциями *A. regelianum*, рассчитанный по результатам мультилокусных методов анализа в целом очень низкий (не выше 0,195). Для другого редкого вида лука *A. hirtifolium* (эндемик Ирана) коэффициенты генетического сходства между 17 популяциями, рассчитанные по результатам RAPD-анализа, варьировали от 0,49 до 0,73 [Ebrahimi et al., 2009].

Анализируя дифференциацию образцов *A. regelianum* на графиках главных координат, а также результаты анализа в программе Structure, полученные по результатам применяемых методов, можно говорить об их достаточной однородности. Не наблюдается четкого деления образцов по популяциям. Чаще всего растения *A. regelianum* образуют единую группу, и в некоторых случаях она дифференцируется на подгруппы, однако степень этой дифференциации различна (наименее дифференцированы популяции по результатам SSR- и NBS-анализа (Рисунок 3.47, 3.42), наиболее – по результатам AFLP (Рисунок 3.36)).

Проанализировав полученные данные, в популяционной структуре *A. regelianum* можно выделить две основные группы образцов. Первая группа – это образцы из популяций Заволжья (популяции Николаевского и Быковского районов), а вторая группа – образцы из популяций бассейна рек Дон и Хопер (популяции Серафимовичского, Иловлинского, Фроловского и

Алексеевского районов). Данные группы, разделены крупной рекой (Волгой), которую можно считать важным фактором географической изоляции. Также эти группы популяций можно приурочить к некоторым природно-территориальным комплексам Волгоградской области [Брылев, Рябина 2001]. Так, первая группа популяций произрастает на территории Прикаспийского природного комплекса, на левом берегу реки Волга. Вторая группа популяций располагается на правом берегу реки Волга, на территории таких природных комплексов как Задонский и Волго-Медведицкий. Таким образом, выделенные группы популяций объединяются не только в генетическом плане, но и по условиям произрастания (природные комплексы выделяют по общности ландшафта, почвенно-климатических условий и соответственно специфических биогеоценозов). Совокупность климата и географии играет важную роль в становлении локальных популяций растений. Л.А. Животовский [Животовский, 2016] показал, что необходимо соотнесение групп популяций, выделенных на основе генетического анализа с известными природными комплексами, это может быть важно при планировании природоохранных мероприятий.

Внутри себя выделенные группы популяций также дифференцируются. Это показано при анализе в программе Structure для данных по AFLP-маркерам (как наиболее информативным) (Рисунок 3.38). Дифференциация внутри крупных групп происходит чаще всего по местам сбора, однако, выражена довольно слабо. Можно предположить, что в недавнем прошлом ареалы популяций *A. regelianum* были намного больше, и между популяциями происходил интенсивный обмен генетической информацией, или же изучаемые растения некогда представляли собой единую популяцию, а затем из-за изменений окружающей среды (в том числе под влиянием антропогенного фактора) произошло сокращение ареалов некогда больших популяций, или же разделение единой популяции на более мелкие группы. Однако эти события еще не успели привести к генетической дифференциации популяций.

Программа по сохранению *A. regelianum* должна основываться на данных как полевых исследований, так и на данных генетических исследований. Учитывая популяционно-генетическую структуру, необходимо выбрать для сохранения популяции из каждой выявленной группы (группа популяций Заволжья и группа популяций бассейна рек Дон и Хопер). Выбор популяций внутри группы следует делать, базируясь на данных о внутрипопуляционном разнообразии. Лучше выбирать наиболее разнообразные популяции (популяция Николаевского района, лиман Хреноватый, популяция Серафимовичского района, хутор Красноярский). Однако стоит обратить внимание и на популяции с низким уровнем разнообразия, как более уязвимые. Отбор растений в генетические коллекции и банки семян

можно проводить, учитывая индексы генетического сходства между образцами и тем самым сохранять наиболее генетически отдаленные образцы.

3.3 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *Artemisia hololeuca*

3.3.1 Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *A. hololeuca* методами мультилокусного анализа

3.3.1.1 RAPD-анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *A. hololeuca*

В результате RAPD-анализа 89 образцов *A. hololeuca* из популяций Волгоградской области было идентифицировано 118 фрагментов, из которых 93 (78,8%) оказались полиморфными. На Рисунке 3.51 представлен спектр фрагментов, полученный в ходе RAPD-анализа *A. hololeuca*.

Число ДНК фрагментов, амплифицируемых с одним праймером, составило от 13 (ОРК04 и ОРК10) до 20 (ОРН15). Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймера ОРН15 (19), минимальное – ОРЕ05 (8). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером, колебался в пределах от 66,7% (для праймеров ОРЕ05 и ОРН15) до 100% (для праймера ОРК10) (данные об информативности праймеров приведены в Приложении 4).

Фрагменты, специфичные только для какой-либо одной популяции, отмечены не были.

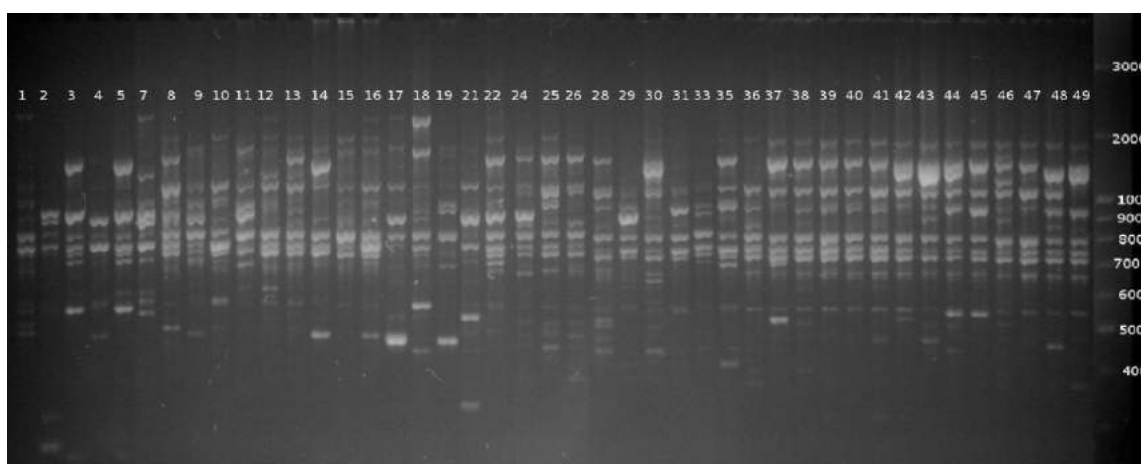


Рисунок 3.51. RAPD-спектр образцов *A. hololeuca*, полученный с использованием праймера ОРН15 (фрагмент геля). 1-7 – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 8-14 – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; 15-21 – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; 22-28 – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; 29-35 – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; 36-40 – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; 41-47 – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; 48-49 – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2. Крайняя правая дорожка – маркер молекулярных масс.

Определение уровней внутривидового полиморфизма. Для каждой изучаемой популяции были рассчитаны основные показатели внутривидового генетического разнообразия (Таблица 3.27).

Таблица 3.27. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. hololeuca*, полученные в результате RAPD-анализа.

Популяция	Показатель						
	% полиморфизма	Число эффективных аллелей, $pe \pm Se$	Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_{\mu}^{**}$	Доля редких аллелей, $h_r \pm S_h^{**}$	Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции
Популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская	34,62	1,151 $\pm$ 0,026	0,154 $\pm$ 0,023	0,097 $\pm$ 0,015	1,393 $\pm$ 0,286	0,303 $\pm$ 0,143	0,80-0,93
Популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский	48,08	1,320 $\pm$ 0,038	0,269 $\pm$ 0,029	0,182 $\pm$ 0,020	1,449 $\pm$ 0,265	0,276 $\pm$ 0,133	0,81-0,89
Популяция Алексеевского р-на, хут.Самолшинский	37,50	1,210 $\pm$ 0,031	0,193 $\pm$ 0,026	0,127 $\pm$ 0,018	1,414 $\pm$ 0,270	0,293 $\pm$ 0,135	0,79-0,91
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1	33,65	1,198 $\pm$ 0,032	0,177 $\pm$ 0,026	0,118 $\pm$ 0,018	1,379 $\pm$ 0,278	0,310 $\pm$ 0,139	0,80-0,94
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2	24,04	1,109 $\pm$ 0,023	0,108 $\pm$ 0,020	0,069 $\pm$ 0,014	1,304 $\pm$ 0,305	0,348 $\pm$ 0,152	0,86-0,95
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3	17,31	1,089 $\pm$ 0,023	0,083 $\pm$ 0,019	0,054 $\pm$ 0,013	1,225 $\pm$ 0,385	0,386 $\pm$ 0,193	0,88-0,97
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1	32,69	1,175 $\pm$ 0,030	0,162 $\pm$ 0,024	0,106 $\pm$ 0,017	1,325 $\pm$ 0,299	0,337 $\pm$ 0,149	0,86-0,96
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акиншевская №2	29,81	1,183 $\pm$ 0,032	0,159 $\pm$ 0,025	0,107 $\pm$ 0,017	1,300 $\pm$ 0,305	0,350 $\pm$ 0,152	0,86-0,95
Популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский	22,12	1,134 $\pm$ 0,028	0,118 $\pm$ 0,023	0,079 $\pm$ 0,016	1,249 $\pm$ 0,309	0,375 $\pm$ 0,155	0,89-0,95
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1	39,42	1,198 $\pm$ 0,031	0,187 $\pm$ 0,025	0,121 $\pm$ 0,017	1,365 $\pm$ 0,294	0,317 $\pm$ 0,147	0,79-0,93
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2	44,23	1,278 $\pm$ 0,036	0,239 $\pm$ 0,028	0,161 $\pm$ 0,020	1,452 $\pm$ 0,260	0,273 $\pm$ 0,130	0,77-0,91
Популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1	37,50	1,204 $\pm$ 0,032	0,186 $\pm$ 0,026	0,122 $\pm$ 0,018	1,382 $\pm$ 0,283	0,308 $\pm$ 0,140	0,80-0,92
Популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2	30,77	1,205 $\pm$ 0,035	0,170 $\pm$ 0,027	0,115 $\pm$ 0,019	1,336 $\pm$ 0,295	0,331 $\pm$ 0,148	0,85-0,93
Общая выборка	78,8	1,189 $\pm$ 0,009	0,170 $\pm$ 0,007	0,112 $\pm$ 0,005	1,570 $\pm$ 0,068	0,215 $\pm$ 0,034	0,65-0,97

*Se – стандартная ошибка; ** S_{μ} и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для двух популяций: из хутора Помалинский (48,08%) и станицы Луковской №2 (44,23%). Для этих популяций также выявлены наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Наименьшие значения всех показателей внутрипопуляционного разнообразия отмечены для популяции №3 хутора Нестеровский. Среди исследованных популяций наименьшее значение среднего числа аллелей отмечено у популяции №3 хутора Нестеровский, а доля редких аллелей в этой популяции самая большая. Наибольшее среднее число аллелей отмечено для популяции №2 станицы Луковской, Нехаевского района, а доля редких аллелей в этой популяции минимальна. Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция Нехаевского р-на, станица Луковская №2 (Таблица 3.27).

Также были рассмотрены индексы генетического сходства Дайса между всеми образцами. Максимальное значение данного индекса (0,97) выявлено между образцами №38 и №40 (популяция хутора Нестеровский №3), минимальное (0,65) – между №11 (популяция хутора Помалинский) и №74 (популяция станицы Луковская №2).

Определение уровней межпопуляционных различий A. hololeuca. Для оценки межпопуляционных различий был рассчитан и проанализирован индекс генетических расстояний Нея между популяциями. В целом он оказался невысоким и варьировал от 0,029 (между двумя популяциями из Урюпинского района) до 0,240 (между популяцией хут. Самолшинский и популяцией №1, станицы Луковской).

Также был проведен анализ генетической структуры изученных популяций *A. hololeuca*. Общее генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) составила 0,227, внутрипопуляционное генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,112. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,505. Показатель генного потока составил $Nm=0,490$.

Проведенный анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что в составе общей генетической гетерогенности вида 41% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия и 59% составляет доля внутрипопуляционного полиморфизма.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием демонстрирует корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. hololeuca* ($R^2=0,389$, $p=0,01$).

Далее с помощью программы PAST 3.09 на основе коэффициента генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.52).

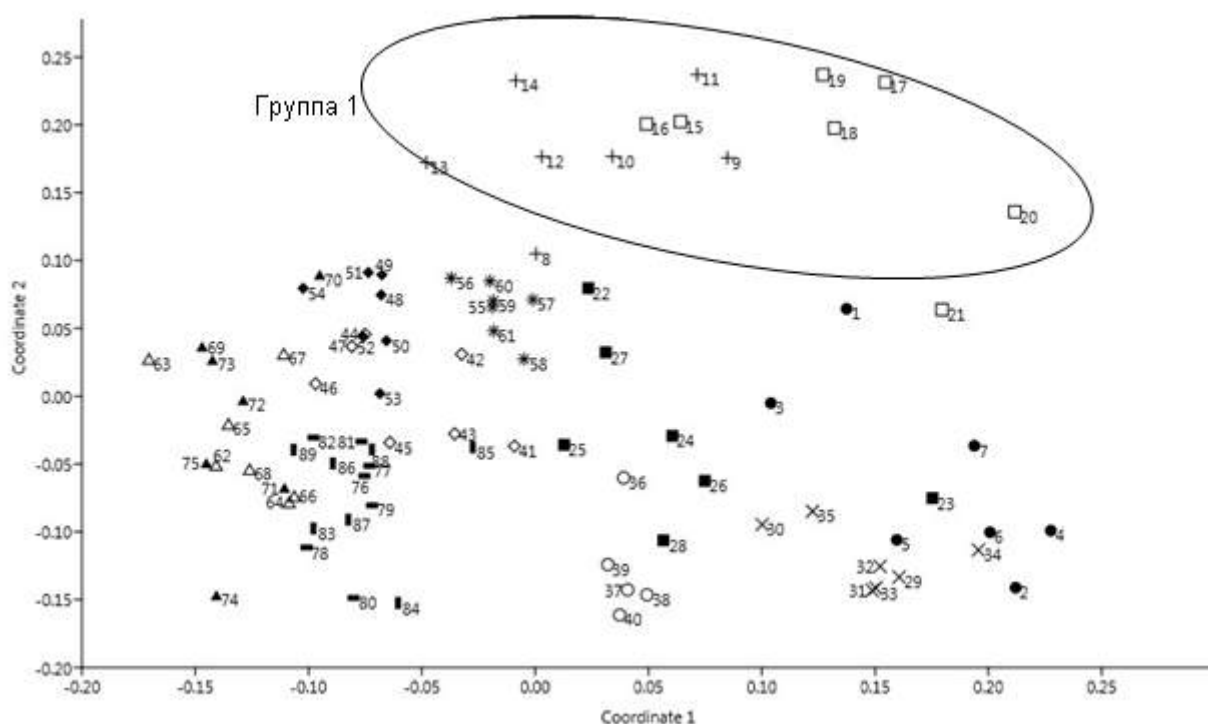


Рисунок 3.52. Дифференциация изучаемых образцов *A. hololeuca*, выявленная по данным RAPD-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции, цифрами – номера образцов: 1-7 (●) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 8-14 (+) – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; 15-21 (□) – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; 22-28 (■) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; 29-35 (×) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; 36-40 (○) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; 41-47 (◇) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; 48-54 (◆) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; 55-61 (*) – популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский; 62-68 (Δ) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; 69-75 (▲) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; 76-82 (▬) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; 83-89 (▩) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

На графике главных координат (Рисунок 3.52) видно, что образцы *A. hololeuca* образуют одну общую группу. Несколько обособлены от общей группы образцы из популяций хутора Помалинский и хутора Самолшинский, Алексеевского района (группа 1). Обособление двух популяций можно объяснить их географическим положением, данные популяции располагаются на левом берегу реки Хопер, а остальные – на правом.

Кроме того, был проведен анализ популяционной структуры *A. hololeuca* в программе Structure 2.3.4. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью метода *deltaK*, наилучшие результаты были получены для $K=2$ (Рисунок 3.53).

На Рисунке 3.54 представлена кластеризация популяций *A. hololeuca* при $K=2$. К первой группе можно отнести популяции 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ко второй группе – популяции 1, 3, 5. Популяции 2, 4, 6 объединяют в себе компоненты и первой и второй группы. Интересно

отметить, что три популяции, собранные около хутора Нестеровский (№4, 5, 6 на рисунке 3.27), относятся к разным группам.

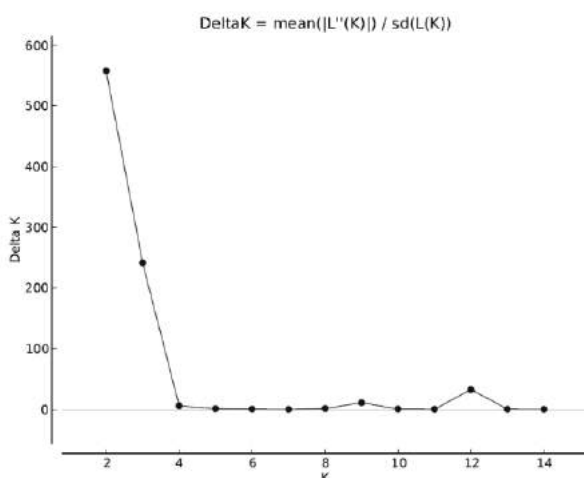


Рисунок 3.53. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

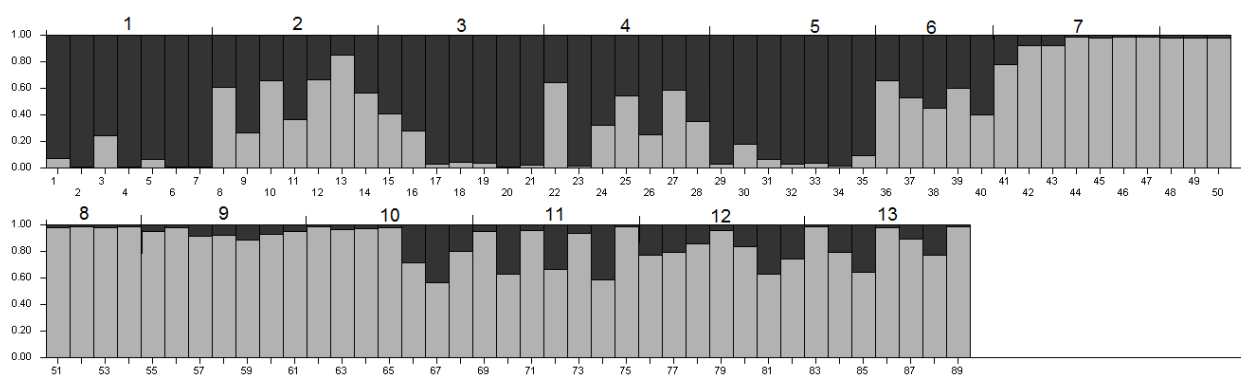


Рисунок 3.54. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. hololeuca* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=2$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; **2** – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; **3** – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; **4** – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; **5** – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; **6** – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; **7** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; **8** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; **9** – популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский; **10** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; **11** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; **12** – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; **13** – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

3.3.1.2 ISSR-анализ меж- и внутривидовой изменчивости *A. hololeuca*

В результате ISSR анализа 89 образцов *A. hololeuca* было идентифицировано 119 фрагментов, 102 (85,71%) из них оказались полиморфными. Число фрагментов ДНК, амплифицируемых с одним праймером, составило от 17 (UBC873) до 24 (UBC841). Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймера UBC841 (21),

минимальное – UBC826 и UBC807 (14). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером колебался в пределах от 73,68% (для праймера UBC826) до 94,44% (для праймера UBC811) (данные об информативности праймеров приведены в Приложении 4).

На Рисунке 3.55 представлен спектр фрагментов, полученный в ходе ISSR-анализа *A. hololeuca*. Фрагменты, специфичные только для какой-либо одной популяции отмечены не были.

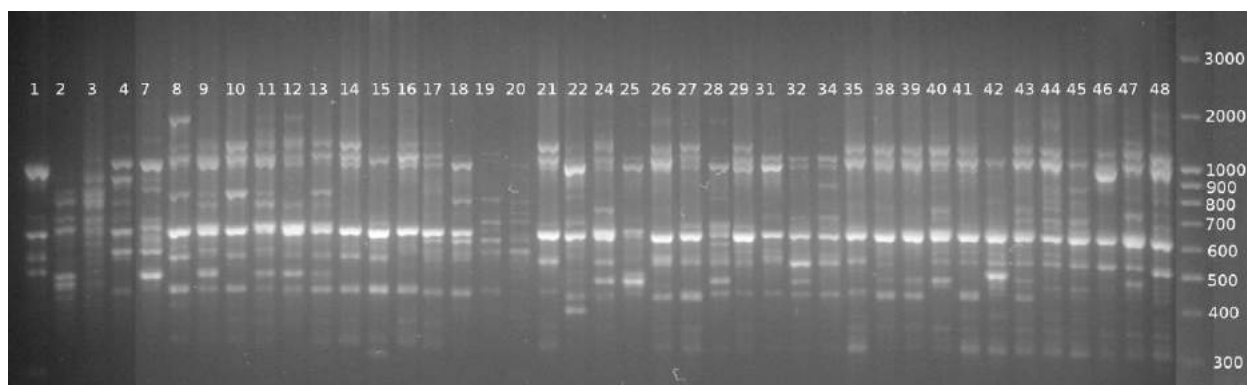


Рисунок 3.55. ISSR-спектр образцов *A. hololeuca*, полученный с праймером UBC841 (фрагмент геля). 1-7 – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 8-14 – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; 15-21 – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; 22-28 – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; 29-35 – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; 36-40 – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; 41-47 – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; 48 – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. При оценке рассчитанных показателей было выявлено, что наибольшим уровнем полиморфизма отличается популяция №2, станица Акишевская Нехаевского р-на (36,97%), для этой популяции также были отмечены наиболее высокие показатели информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности (Таблица 3.28). Наибольшее значение эффективного числа аллелей отмечено для популяции хутора Помалинский, Алексеевского района. Наиболее генетически однородной была популяция №3 хутора Нестеровский, Алексеевского района, показатели внутрипопуляционного разнообразия для нее были самыми низкими. Наименьшую долю редких аллелей и наибольшее значение среднего числа аллелей имеет популяция станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского района (0,267 и 1,467 соответственно), а соответственно большее всего редких аллелей и наименьшее значение среднего числа аллелей отмечено для популяции №3 хутора Нестеровский Алексеевского района (0,340 и 1,320 соответственно). Также были проанализированы индексы генетического сходства Дайса между парами образцов из одной популяции. Наиболее разнообразной оказалась популяция станицы Усть-Бузулукской,

Алексеевского района. Наиболее узкий диапазон значений индекса генетического сходства Дайса наблюдался у популяции №1 станицы Акишевской, Нехаевского района (Таблица 3.28).

Таблица 3.28. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. hololeuca*, полученные в результате ISSR-анализа.

Популяция	Показатель						
	% полиморфизма	Число эффективных аллелей, pe [*] Se	Информационный индекс Шеннона, I Se	Ожидаемая гетерозиготность, He Se	Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_{\mu}$ ^{**}	Доля редких аллелей, $h_r \pm S_h$ ^{**}	Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции
Популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская	31,09	1,162±0,026	0,154±0,022	0,100±0,015	1,467±0,256	0,267±0,128	0,72-0,88
Популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский	31,93	1,222±0,033	0,182±0,026	0,125±0,018	1,399±0,279	0,300±0,139	0,82-0,93
Популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский	30,25	1,145±0,025	0,141±0,021	0,091±0,014	1,416±0,274	0,292±0,137	0,80-0,90
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1	30,25	1,136±0,025	0,133±0,021	0,085±0,014	1,381±0,288	0,310±0,143	0,81-0,91
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2	29,41	1,110±0,020	0,120±0,019	0,074±0,012	1,390±0,290	0,305±0,145	0,82-0,91
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3	20,17	1,090±0,020	0,091±0,018	0,058±0,012	1,320±0,356	0,340±0,178	0,83-0,92
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1	31,09	1,180±0,030	0,157±0,023	0,105±0,016	1,378±0,289	0,311±0,144	0,84-0,95
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2	36,97	1,214±0,030	0,193±0,025	0,128±0,017	1,409±0,271	0,295±0,135	0,80-0,91
Популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский	32,77	1,188±0,029	0,169±0,024	0,112±0,016	1,408±0,277	0,296±0,138	0,77-0,92
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1	28,57	1,150±0,027	0,138±0,022	0,090±0,015	1,367±0,290	0,316±0,145	0,84-0,94
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2	31,93	1,168±0,027	0,157±0,023	0,102±0,015	1,397±0,282	0,301±0,141	0,81-0,95
Популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1	34,37	1,144±0,027	0,128±0,022	0,085±0,015	1,380±0,277	0,310±0,138	0,79-0,93
Популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2	26,05	1,150±0,027	0,134±0,022	0,089±0,015	1,397±0,274	0,301±0,137	0,80-0,94
Общая выборка	85,71	1,158±0,007	0,146±0,006	0,096±0,004	1,591±0,072	0,205±0,036	0,53-0,95

^{*}Se – стандартная ошибка; ^{**} S_{μ} и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Значение индексов генетического сходства Дайса между всеми образцами варьировало от 0,53 – между образцами №2 (популяция станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского района) и №53 (популяция хутора Красновский, Нехаевского района) до 0,95 – между образцами №41 и №42 (популяция №1, станицы Акишевской, Нехаевского района) и образцами №73 и №75 (популяция №2, станица Луковская, Нехаевского района).

Определение уровней межпопуляционных различий. Индекс генетических расстояний Нея между популяциями варьировал от 0,025 (между популяциями №1 и №2 хутора Нестеровский, Алексеевского района) до 0,291 (между популяцией из станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского района и популяцией №2 станицы Акишевской, Нехаевского района).

Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,096, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) не превышала 0,202. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,526. Показатель генного потока составил $Nm=0,451$.

В составе общей генетической гетерогенности вида 45% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия и 55% составляет доля внутривидового полиморфизма (показано при анализе молекулярной дисперсии (AMOVA)).

При проведении теста Мантеля на эффект изоляции расстоянием выявлена корреляция между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций *A. hololeuca* ($R^2=0,484$, $p=0,01$).

На основе коэффициентов генетического сходства Дайса между образцами проведен анализ методом главных координат (Рисунок 3.56).

На представленном Рисунке 3.56 образцы *A. hololeuca* можно разделить на несколько групп. Так в отдельную группу обособляются образцы из популяции станицы Усть-Бузулукская (группа 1), а также образцы из популяции Нехаевского района, станица Акишевская, популяция №2 (группа 2). Образцы из популяций станицы Луковская можно объединить в еще одну группу (группа 3). Достаточно дифференцированы от других образцов две популяции хутора Белогорский, Урюпинского района (группа 4). Обособление популяций хутора Белогорский и станицы Луковская можно связать с географической отдаленностью этих популяций от всех остальных.

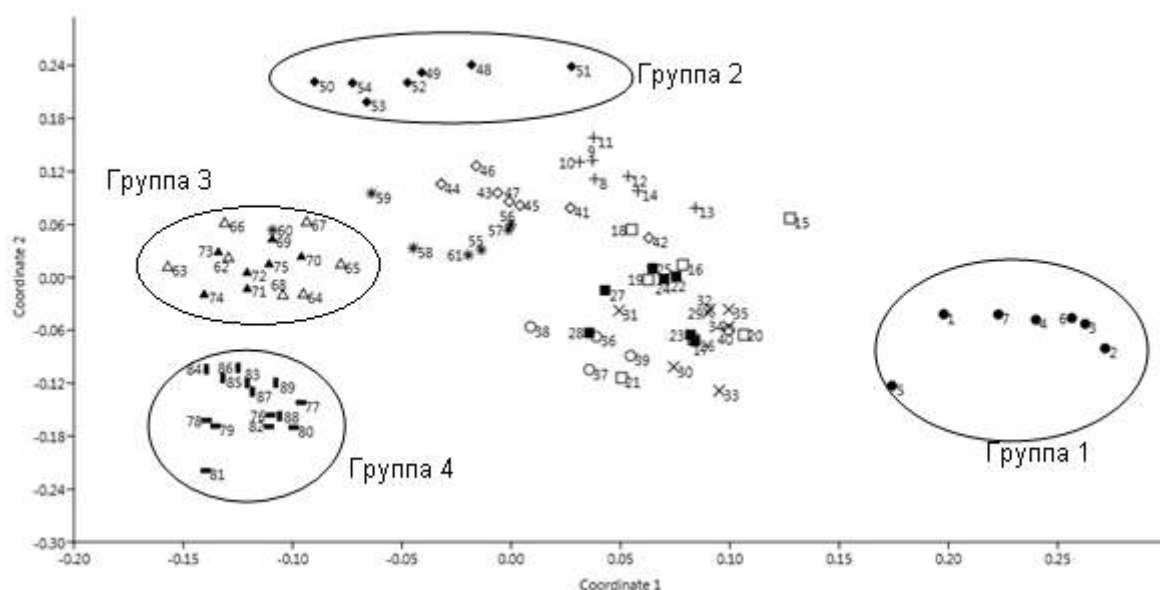


Рисунок 3.56. Дифференциация изучаемых образцов *A. hololeuca*, выявленная по данным ISSR-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-7 (●) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 8-14 (+) – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; 15-21 (□) – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; 22-28 (■) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; 29-35 (×) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; 36-40 (○) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; 41-47 (◇) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; 48-54 (◆) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; 55-61 (*) – популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский; 62-68 (Δ) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; 69-75 (▲) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; 76-82 (—) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; 83-89 (▣) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

Кроме того, проведен анализ популяционной структуры *A. hololeuca* в программе Structure 2.3.4. С помощью метода *deltaK*, установлено, что оптимальное число кластеров, на которые можно разбить образцы *A. hololeuca*, составляет два и три (Рисунок 3.57). На Рисунке 3.58 представлена кластеризация популяций *A. hololeuca*.

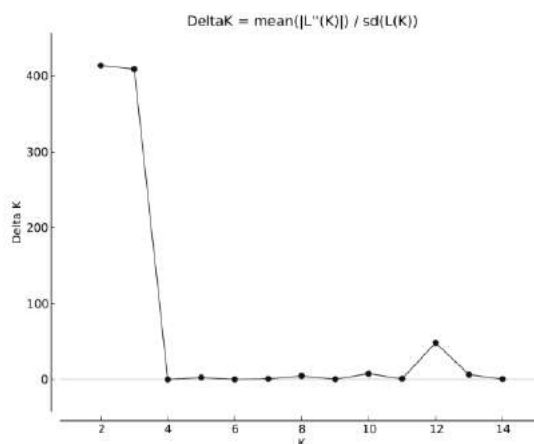
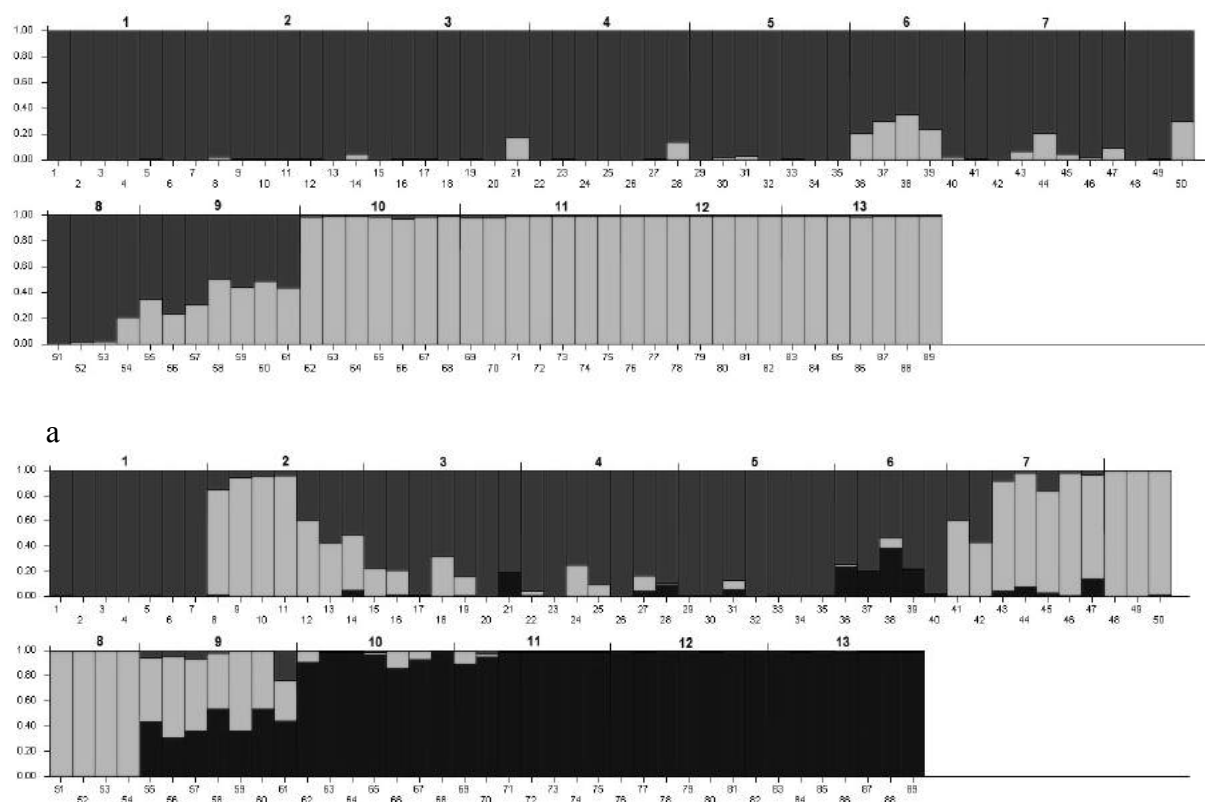


Рисунок 3.57. График параметра *deltaK* в зависимости от числа кластеров



б

Рисунок 3.58. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. hololeuca* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций: а – $K=2$, б – $K=3$. Вертикальная ось – доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось – анализируемые образцы: **1** – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; **2** – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; **3** – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; **4** – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; **5** – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; **6** – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; **7** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; **8** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; **9** – популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский; **10** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; **11** – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; **12** – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; **13** – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

При делении образцов *A. hololeuca* на две группы в первую группу попадают две популяции хутора Белогорский (12, 13), Урюпинского района и две популяции станицы Луковская (10, 11), Нехаевского района, а во вторую группу – все остальные популяции. Такая дифференциация частично отражена и на графике главных координат и может быть объяснена географическим положением образцов.

При делении образцов *A. hololeuca* на три группы в первую группу также можно отнести популяции хутора Белогорский (12, 13) и станицы Луковская (10, 11), во вторую группу попадают растения из двух популяций хутора Акиншевский (7, 8) и часть растений из популяции хутора Помаленский (2), третью группу образуют популяции станицы Усть-Бузулукская (1), хутора Самолшенский (3), и три популяции хутора Нестеровский (4, 5, 6).

Растения из популяции хутора Красновский (9) содержали в себе компоненты первой и второй группы. Некоторые растения из популяции хутора Помалинский также имели смешанный генотип (содержали компоненты второй и третьей групп).

Таким образом, дифференциация популяций, на графике главных координат в основном связана с географическим положением образцов. Деление популяций *A. hololeuca* на группы по результатам анализа в программе Structure не во всех случаях связано с географическим положением, кроме того, не все популяции можно однозначно отнести к одной из групп.

3.3.1.3 AFLP-анализ меж- и внутрипопуляционной изменчивости *A. hololeuca*

223 фрагмента были идентифицированы в результате AFLP-анализа 89 образцов *A. hololeuca*. Полиморфными из них были 198 (88,79%) фрагментов. Число ДНК фрагментов, амплифицируемых с одной комбинацией праймеров составило от 50 (E_{38}/M_{60}) до 65 (E_{35}/M_{52}).

Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью комбинации праймеров E_{35}/M_{52} (60), минимальное – E_{35}/M_{55} (41). Уровень полиморфизма, выявляемого одной комбинацией праймеров колебался в пределах от 74,55% (E_{35}/M_{55}) до 94,0% (E_{38}/M_{60}) (данные об информативности праймеров приведены в Приложении 4).

Фрагменты, специфичные для какой-либо одной популяции отмечены не были.

Определение уровней внутрипопуляционного полиморфизма. Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяции хутора Помалинский (39,46%) (Таблица 3.29). Эта популяция также имеет наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Наименее разнообразной по всем показателям была популяция №3 хутора Нестеровский, Алексеевского района.

Среднее число аллелей в популяции варьировало от 1,272 (популяция №3 хутора Нестеровский) до 1,428 (популяция станицы Усть-Бузулукская). Максимальная доля редких аллелей отмечена для популяции №3 хутора Нестеровский, а минимальная – для популяции станицы Усть-Бузулукская. Кроме того, был определен диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между растениями из одной популяции. Наиболее широкий диапазон имела популяция станицы Усть-Бузулукская Алексеевского района, а наименее – популяция №3 хутора Нестеровский, Алексеевского района (Таблица 3.29).

Диапазон индексов генетического сходства Дайса между всеми образцами составил от 0,63 (между №2 (популяция станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского района) и №54 (популяция №2 станицы Акишевской, Нехаевского района)) до 0,94 (между образцами №87 и №89 (популяция №2 хутора Белогорский, Урюпинского района)).

Таблица 3.29. Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. hololeuca*, рассчитанные по результатам AFLP-анализа.

Показатель	Популяция						
	% полиморфизма	Число эффективных аллелей, $pe \pm Se$	Информационный индекс Шеннона, $I \pm Se$	Ожидаемая гетерозиготность, $He \pm Se$	Среднее число аллелей в популяции, $\mu \pm S_{\mu}$	Доля редких аллелей, $h_r \pm S_h$	Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции
Популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская	32,74	1,157±0,018	0,154±0,016	0,099±0,011	1,428±0,272	0,286±0,136	0,77-0,90
Популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский	39,46	1,268±0,025	0,223±0,019	0,152±0,014	1,426±0,272	0,287±0,136	0,83-0,91
Популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский	33,63	1,175±0,020	0,165±0,017	0,108±0,011	1,418±0,271	0,291±0,135	0,80-0,90
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1	31,84	1,165±0,020	0,154±0,016	0,100±0,011	1,385±0,281	0,308±0,140	0,82-0,91
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2	26,91	1,110±0,015	0,114±0,014	0,071±0,009	1,348±0,297	0,326±0,148	0,84-0,92
Популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3	18,83	1,090±0,015	0,087±0,013	0,056±0,009	1,272±0,371	0,364±0,185	0,86-0,94
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1	31,84	1,178±0,021	0,160±0,017	0,105±0,012	1,350±0,294	0,325±0,147	0,85-0,94
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2	33,63	1,200±0,022	0,177±0,018	0,118±0,012	1,358±0,287	0,321±0,143	0,83-0,92
Популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский	27,80	1,163±0,020	0,145±0,017	0,097±0,011	1,329±0,295	0,335±0,147	0,85-0,94
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1	33,63	1,172±0,020	0,161±0,016	0,105±0,011	1,370±0,291	0,315±0,146	0,82-0,93
Популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2	37,67	1,219±0,023	0,195±0,018	0,130±0,012	1,431±0,269	0,284±0,134	0,80-0,93
Популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1	30,49	1,172±0,021	0,155±0,017	0,102±0,011	1,386±0,279	0,307±0,139	0,80-0,92
Популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2	28,25	1,176±0,022	0,151±0,017	0,101±0,012	1,367±0,285	0,316±0,142	0,84-0,94
Общая выборка	88,79	1,173±0,006	0,157±0,005	0,103±0,003	1,581±0,070	0,209±0,035	0,63-0,94

*Se – стандартная ошибка; ** S_{μ} и S_h – статистические ошибки соответствующих показателей

Определение уровней межпопуляционных различий. Анализ уровня межпопуляционных различий начат с определения значений генетических расстояний Нея между популяциями. Данный показатель оказался невысоким, варьировал от 0,023 (между двумя популяциями Урюпинского района, хутор Белогорский) до 0,251 (между популяциями станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского района и популяцией №2 станицы Акишевская, Нехаевского р-на).

Также была определена генетическая структура пяти изученных популяций *A. hololeuca*. Общее генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T) составила 0,213, внутрипопуляционное генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S) составила 0,103. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,516. Показатель генного потока составил $Nm=0,470$.

Большая часть изменчивости *A. hololeuca* связана с внутрипопуляционными различиями (57%), а на межпопуляционный полиморфизм приходится 43% от общей гетерогенности.

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием выявил достаточно высокую корреляцию между географическими и генетическими расстояниями ($R^2=0,520$, $p=0,01$).

Далее был проведен анализ методом главных координат в программе PAST 3.09 (Рисунок 3.60). По результатам проведенного анализа исследуемые образцы *A. hololeuca* можно разделить на три группы. Первую группу образуют популяции станицы Луковская (Нехаевский р-н) и хутора Белогорский (Урюпинский р-н), эти популяции и географически более удалены от всех остальных. Вторую группу образуют три популяции хутора Нестеровский (Алексеевский р-н), популяция хутора Самолшинский и станицы Усть-Бузулукская (Алексеевский р-н). Интересно, что популяция хутора Самолшинский произрастает на противоположном от других популяций этой группы берегу реки Хопер. Четыре оставшиеся популяции можно объединить в третью группу. Это две популяции станицы Акишевская, и популяции хутора Помалинский и Красновский. В этой группе также объединены популяции с противоположных берегов реки Хопер.

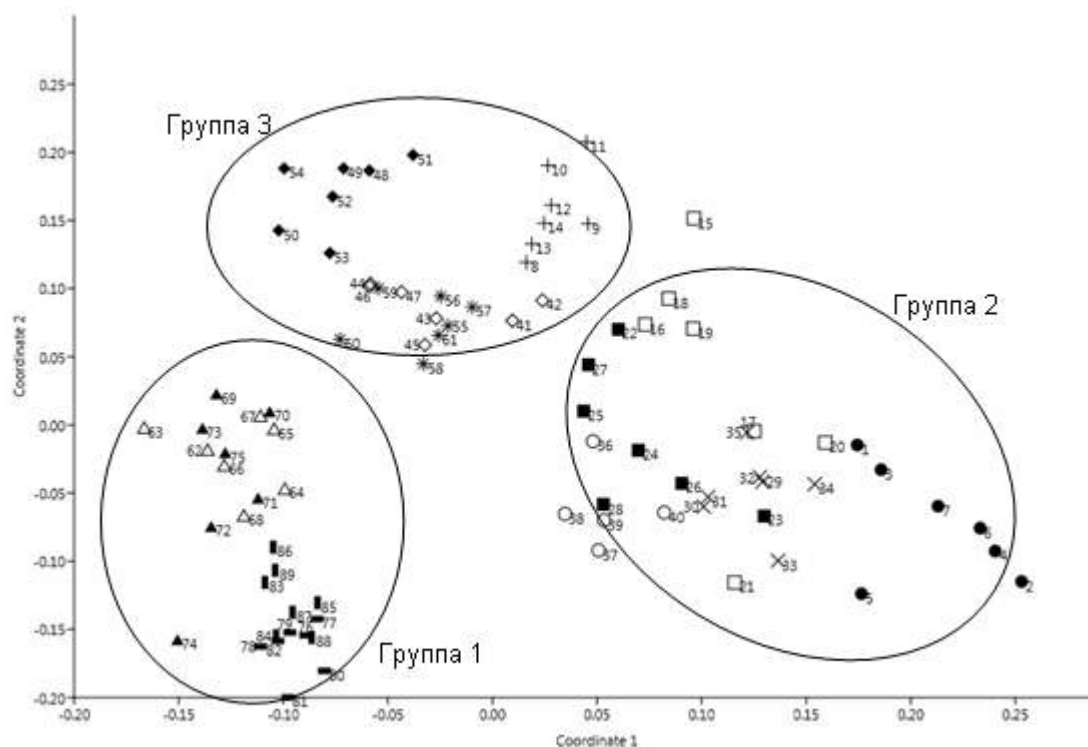


Рисунок 3.60. Дифференциация изучаемых образцов *A. hololeuca*, выявленная по данным AFLP-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-7 (●) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 8-14 (+) – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; 15-21 (□) – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; 22-28 (■) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; 29-35 (×) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; 36-40 (○) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; 41-47 (◇) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; 48-54 (◆) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; 55-61 (*) – популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский; 62-68 (Δ) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; 69-75 (▲) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; 76-82 (—) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; 83-89 (▣) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

Анализ популяционной структуры *A. hololeuca* был проведен в программе Structure 2.3.4. С помощью метода *deltaK* установлено, что оптимальное число кластеров, на которые можно разбить образцы *A. hololeuca* составляет два ($K=2$) (Рисунок 3.61). На Рисунке 3.62 представлена кластеризация популяций *A. hololeuca* при $K=2$. При делении образцов на две группы к первой группе можно отнести популяции хутора Белогорский (12, 13), станицы Луковская (10, 11), хутора Красновский (9) и популяции станицы Акишевская (7, 8). Ко второй группе соответственно можно отнести все оставшиеся популяции (1, 2, 3, 4, 5, 6). Отметим, что популяции 2, 6 и 7 включают образцы со смешанным генотипом. В целом такое деление можно связать с географическим положением образцов.

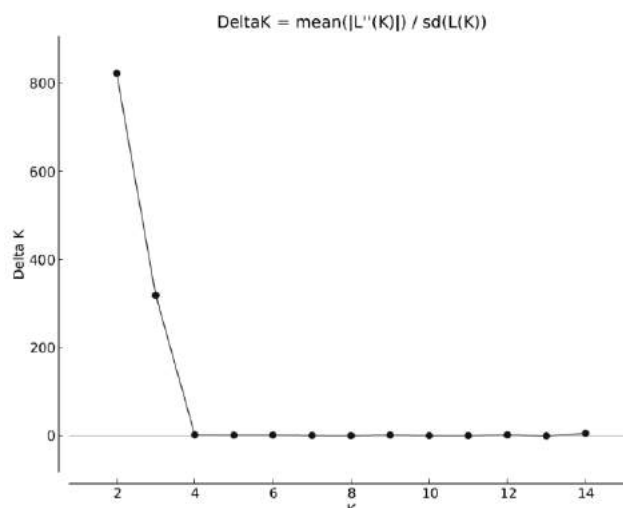


Рисунок 3.61. График параметра ΔK в зависимости от числа кластеров.

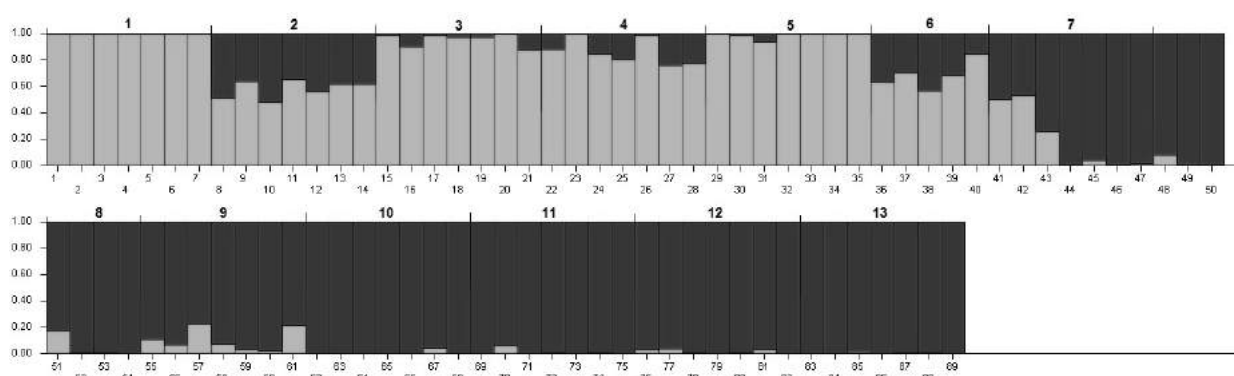
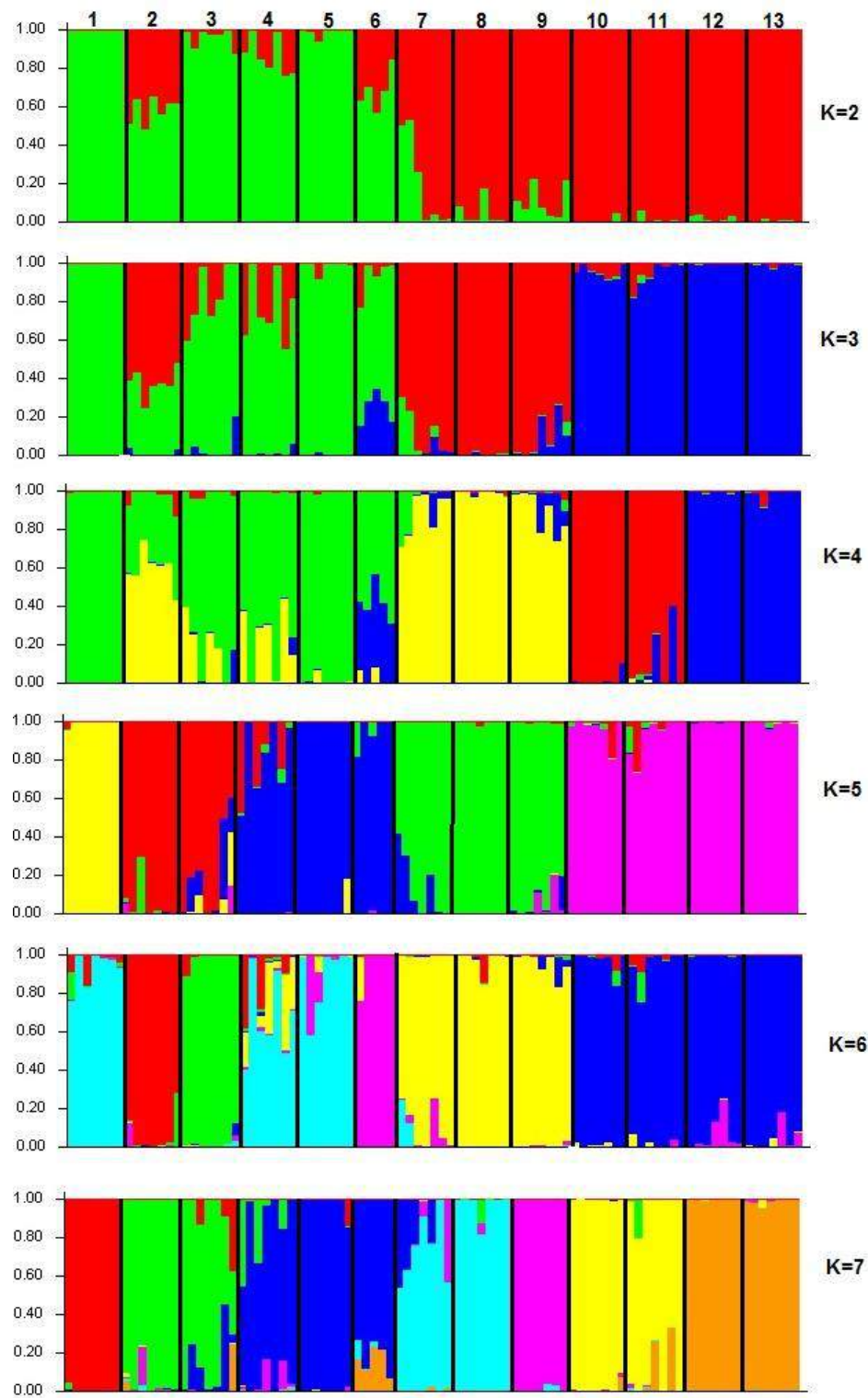
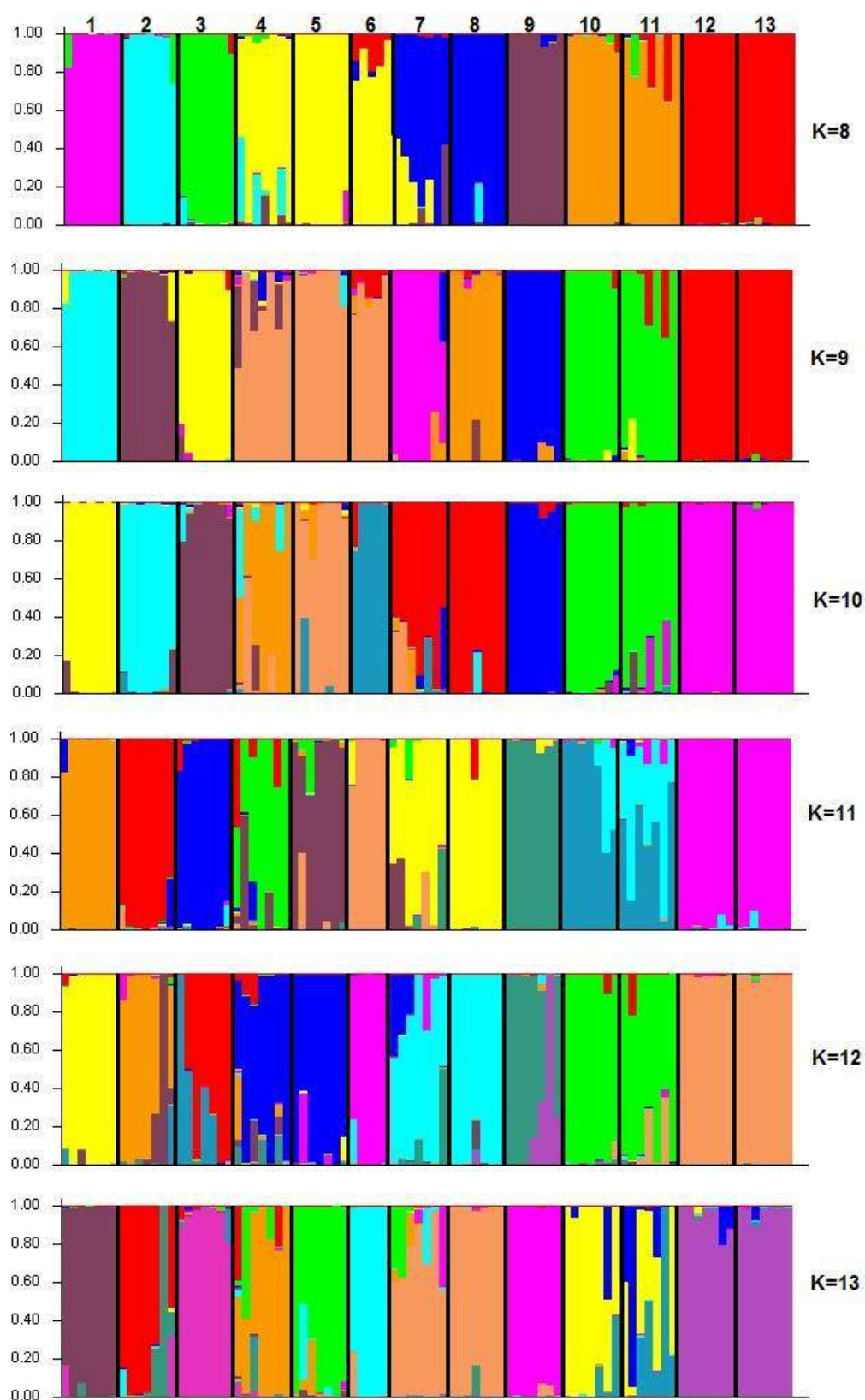


Рисунок 3.62. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. hololeuca* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $K=2$. Вертикальная ось — доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось — анализируемые образцы: **1** — популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; **2** — популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; **3** — популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; **4** — популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; **5** — популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; **6** — популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; **7** — популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; **8** — популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; **9** — популяция Нехаевского р-на, хутор Красновский; **10** — популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; **11** — популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; **12** — популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; **13** — популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

Также рассмотрим дифференциацию образцов при увеличении числа групп (Рисунок 3.63а, б). При $K=3$ дифференциация популяций совпадает с дифференциацией на графике главных координат: отдельные группы формируют популяции станицы Луковская (10,11) и хутора Белогорский (12, 13); три популяции хутора Нестеровский (4, 5, 6), популяция хутора Самолшинский (3) и станицы Усть-Бузулукская(1); две популяции станицы Акишевская (7,8), популяция хутора Красновский (9). Но, в отличие от графика главных координат, положение популяции хутора Помалинский (2) до конца не ясно, образцы из этой популяции имеют смешанный генотип (их можно отнести как ко второй, так и к третьей группе).



a



6

Рисунок 3.63. Вероятность отнесения образцов *A. hololeuca* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с различным числом субпопуляций (а – число групп от 2 до 8; б – число групп от 9 до 13). Номера популяций соответствуют номерам на Рисунке 3.62.

При увеличении числа возможных групп популяций до четырех в отдельные группы можно отнести популяции станицы Луковская (10, 11) и хутора Белогорский (12, 13). Однако дифференциация 10-й популяции от 11-й и 12-й популяции от 13 –й не происходит и при увеличении числа групп до 13.

Сходная ситуация наблюдается для популяций из станицы Акишевская (7, 8), точки сбора которых также расположены рядом. Их дифференциация наблюдается только при $K=9$, хотя на графике главных координат они достаточно обособлены. Рассматривая популяции 4, 5, 6 (точки сбора располагаются недалеко от хутора Нестеровский), можно отметить, что при $K=6$, 10, 11, 12, 13 в отдельную группу обособляется популяция №6, а при $K=3$, 4, 7 – образцы из популяции №6 имеют смешанный генотип. Популяции 4 и 5 дифференцируются только при $K=11$ и $K=13$. Популяция 1, из станицы Усть-Бузулукская, начиная с $K=7$, формирует обособленную группу. При меньшем числе K она группируется с популяциями 3, 4, 5. Популяция из хутора Красновский (9), также, начиная с $K=7$, формирует отдельную группу, до $K=7$ демонстрирует сходство с популяциями 7, 8. При $K=8$ в отдельную группу обособляются образцы из популяции хутора Самолшинский (3). До $K=4$ образцы из популяции хутора Помалинский (2) имели смешанный генотип, однако, начиная с $K=5$, также формировали отдельную группу.

Анализируя популяционную структуру *A. hololeuca* можно выделить две-три группы популяций, которые в основном соответствуют географическому положению образцов. Дифференциация популяций *A. hololeuca* внутри групп в основном происходит по местам сбора.

3.3.2 Сравнение результатов, полученных разными мульти- и монолокусными методами анализа

Для оценки генетического полиморфизма образцов *A. hololeuca* нами были использованы мультилокусные маркеры (RAPD, ISSR, AFLP). Они позволяют оценить вариабельность большей части генома, а также удобны для изучения редких видов растений, которые практически не изучены генетически.

Все использованные методы позволяли выявлять полиморфизм исследуемых образцов. Каждый из анализируемых образцов *A. hololeuca* был охарактеризован специфичным спектром фрагментов.

Наибольший уровень полиморфизма выявлен с помощью AFLP-анализа, наименьший – с помощью RAPD-анализа (Таблица 3.30).

Таблица 3.30. Общие данные по разнообразию *A. hololeuca* с помощью каждого из методов анализа.

Показатель	Тип маркера		
	RAPD	ISSR	AFLP
Число праймеров	8	6	4
Число фрагментов/аллельных вариантов	118	119	223
Уровень полиморфизма, %	78,8	85,71	88,79

Показатели разнообразия внутри популяций *A. hololeuca*, а также для общей выборки, полученные с помощью разных методов, в целом сопоставимы (Таблица 3.31), что говорит о достоверности полученных с помощью каждого метода данных и возможности их использования, как в комплексе, так и по отдельности. Наибольшие значения числа эффективных аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности получены при RAPD-анализе, а наименьшие значения этих показателей отмечены при ISSR-анализе. Однако при ISSR-анализе получено наибольшее значение среднего числа аллелей и наименьшее число редких аллелей. Анализируя диапазон значений индекса генетического сходства Дайса, можно говорить о том, что наибольший уровень разнообразия *A. hololeuca* отмечен при ISSR-анализе, а наименьший – при RAPD-анализе. (Таблица 3.31).

Таблица 3.31. Показатели внутрипопуляционного общей выборки разнообразия *A. hololeuca*, полученные с помощью каждого методов анализа.

Показатель	Тип маркера		
	RAPD	ISSR	AFLP
Число эффективных аллелей, n_e	1,385	1,320	1,350
Информационный индекс Шеннона, I	0,345	0,323	0,334
Ожидаемая гетерозиготность, H_e	0,228	0,203	0,214
Среднее число аллелей в популяции, μ	1,570	1,591	1,581
Доля редких аллелей, h_r	0,215	0,205	0,209
Диапазон значений индекса генетического сходства Дайса между образцами из популяции	0,650-0,970	0,525-0,946	0,630-0,940

Анализируя межпопуляционное разнообразие, также можно отметить сходность результатов, полученных разными методами (Таблица 3.32). Наибольший уровень подразделенности отмечается при ISSR-анализе, наименьший – при RAPD. Наибольшая доля межпопуляционной изменчивости отмечена при AFLP-анализе (Таблица 3.32).

Таблица 3.32. Показатели межпопуляционной дифференциации *A. hololeuca*, полученные с помощью различных мультилокусных маркеров.

Показатель	Тип маркера		
	RAPD	ISSR	AFLP
Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_S)	0,112	0,096	0,103
Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_T)	0,227	0,202	0,213
Подразделенность популяций (G_{ST})	0,505	0,526	0,516
Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) доля межпопуляционной изменчивости/доля внутривидовой изменчивости, %	41/59	45/55	57/43
Диапазон значений индекса генетических расстояний Нея между популяциями	0,029-0,240	0,025-0,291	0,023-0,251

Дифференциация образцов на графике главных координат, а также результаты анализа в программе Structure имели некоторые различия для разных методов. Наименее дифференцированы популяции *A. hololeuca* на графике главных координат, построенном по результатам RAPD-анализа (Рисунок 3.52), наиболее дифференцированы – на графике главных координат, построенном по результатам AFLP-анализа (Рисунок 3.60).

При RAPD-анализе несколько обособлены от общей группы образцы из популяций хутора Помалинский и хутора Самолшинский, Алексеевского района (Рисунок 3.52). Данные популяции располагаются на левом берегу реки Хопер, а остальные – на правом. При ISSR-анализе в отдельную группу обособляются образцы из популяции станицы Усть-Бузулукская, а также образцы из популяции станицы Акишевская №2, Нехаевского района (Рисунок 3.56). Также достаточно дифференцированы от других образцов две популяции хутора Белогорский, Урюпинского района, наиболее географически отдаленные от других популяций. По данным AFLP-анализа образцы *A. hololeuca* на графике главных координат формировали три группы: первая – популяции станицы Луковская (Нехаевский район) и хутора Белогорский (Урюпинский район); вторая – три популяции хутора Нестеровский (Алексеевский район), популяция хутора Самолшинский и станицы Усть-Бузулукская (Алексеевский район); третья – популяции хутора Помалинский (Алексеевский район), две популяции станицы Акишевская и популяция хутора Красновский (Нехаевский район) (Рисунок 3.60).

Анализ методом главных координат был также проведен на основе данных трех мультилокусных методов (Рисунок 3.63). Дифференциация образцов *A. hololeuca*, полученная при объединении данных, наиболее схожа с дифференциацией, полученной при AFLP-анализе.

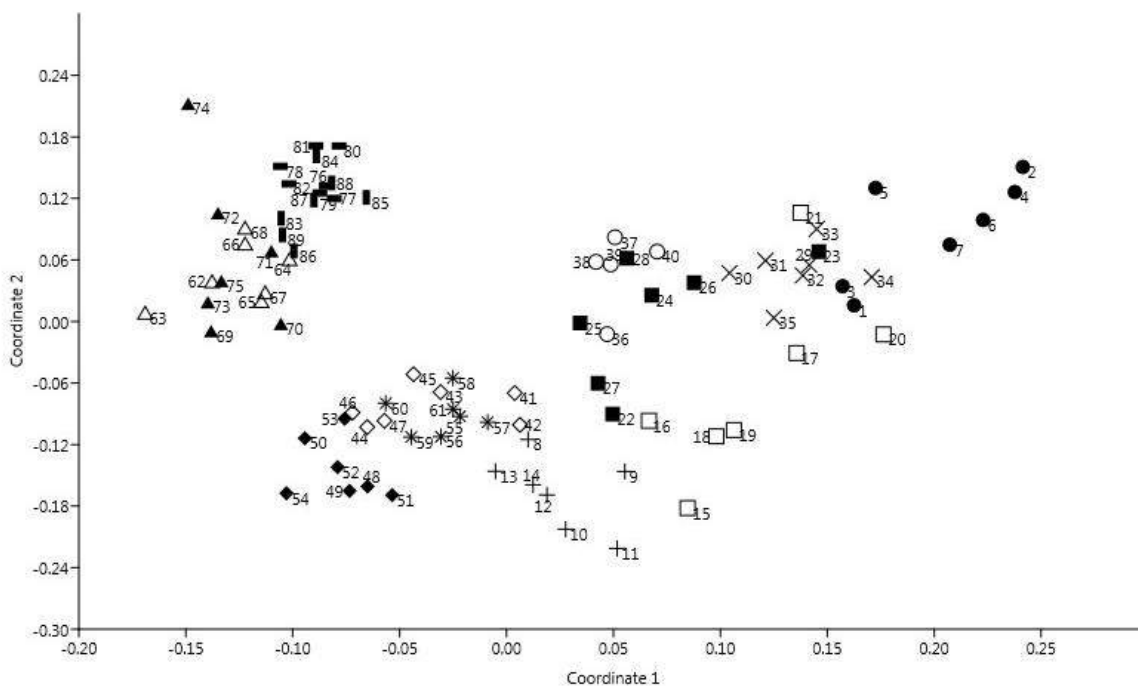


Рисунок 3.63. Дифференциация изучаемых образцов *A. hololeuca*, выявленная по объединенным данным с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-7 (●) – популяция Алексеевского р-на, ст-ца Усть-Бузулукская; 8-14 (+) – популяция Алексеевского р-на, хут. Помалинский; 15-21 (□) – популяция Алексеевского р-на, хут. Самолшинский; 22-28 (■) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №1; 29-35 (×) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №2; 36-40 (○) – популяция Алексеевского р-на, хут. Нестеровский №3; 41-47 (◇) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №1; 48-54 (◆) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская №2; 55-61 (*) – популяция Нехаевского р-на, хут. Красновский; 62-68 (△) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №1; 69-75 (▲) – популяция Нехаевского р-на, ст-ца Луковская №2; 76-82 (—) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №1; 83-89 (▮) – популяция Урюпинского р-на, хут. Белогорский №2.

При анализе популяционной структуры в программе Structure наиболее оптимальным числом групп, на которые можно разбить образцы *A. hololeuca*, является два или три. Наименее четкая дифференциация отмечается при RAPD-анализе, несколько популяций состоят из образцов, включающих компоненты разных групп популяций.

Более выражена дифференциация популяций по результатам ISSR-анализа. Так, при делении образцов *A. hololeuca* на две группы, в первую группу попадают популяции хутора Белогорский и станицы Луковская, а во вторую группу – все остальные популяции. При делении образцов *A. hololeuca* на три группы, в первую группу также можно отнести популяции хутора Белогорский и станицы Луковская, во вторую группу попадают растения из двух популяций хутора Акиншевский и часть растений из популяции хутора Помалинский, третью группу образуют популяции станицы Усть-Бузулукская (1), хутора Самолшинский (3), и три популяции хутора Нестеровский (4, 5, 6). Растения из популяции хутора Красновский и хутора Помалинский (9) содержали в себе компоненты разных групп.

Оптимальное число К по данным AFLP-анализа было определено как два. К первой группе были отнесены популяции хутора Белогорский и станицы Луковская, хутора Красновский и популяции станицы Акишевская (7, 8). Оставшиеся популяции были отнесены ко второй группе. Здесь также встречались популяции с присутствием компонентов разных групп (это популяции хутора Помалинский, популяция №3 хутора Нестеровский и популяция №1 станицы Акишевская). В целом такое деление можно связать с географическим положением образцов.

Между матрицами значений индекса генетического сходства Дайса и генетических расстояний Нея, рассчитанными по результатам разных методов выявлена статистически значимая, положительная корреляция (Приложение 11). Таким образом, все применяемые методы анализа позволили получить достоверные, воспроизводимые сходные друг с другом результаты, что говорит о возможности применения каждого из них как по отдельности, так и в комплексе.

Среди трех использованных методов, стоит отметить AFLP-анализ как наиболее эффективный при исследовании разнообразия *A. hololeuca*.

3.3.3 Обсуждение результатов, полученных при изучении генетического разнообразия *A. hololeuca*

Было проанализировано генетическое разнообразие редкого вида *A. hololeuca*, произрастающего на территории Волгоградской области, с помощью мультилокусных методов (RAPD, ISSR, AFLP).

Все использованные методы позволяли выявлять полиморфизм исследуемых образцов. Уровень полиморфизма составил от 78,8% (по результатам RAPD-анализа) до 88,79% (по результатам AFLP-анализа). Уровень полиморфизма других редких видов рода *Artemisia* в целом сопоставим с полученными нами данными. Так, для вида *A. frigida* уровень полиморфизма составил 82,8% (Wan et al., 2008), для *A. capillaris* – 68,89% [Shafie et al., 2009], а для вида *A. pancinii* – 83,8% [Kitner et al., 2012].

Показатели внутривидового разнообразия *A. hololeuca* были невысокими. Среди проанализированных популяций наибольшим уровнем разнообразия отличаются популяция хутора Помалинский (по результатам всех использованных методов), популяция №2 из станицы Луковская (по результатам RAPD-анализа), а также популяция №2 из станицы Акишевской (по результатам ISSR-анализа). Наименьшие показатели внутривидового разнообразия отмечены для популяции №3 хутора Нестеровский, Алексеевского района.

Для популяций другого редкого вида полыни *A. molinieri* с помощью биохимических маркеров показан более высокий уровень гетерозиготности, чем у изучаемого нами вида ($H_e=0,426$) [Torrell et al., 1999]. Сходные значения эффективного числа аллелей (1,16-1,39) и информационного индекса Шеннона (0,13-0,23) получены в ходе анализа популяций *A. halodendron* (достаточно распространенный, но страдающий от опустынивания вид полыни в Китае) с помощью ISSR-анализа [Huang et al., 2011]. Для популяций реликтового вида *A. pancicii* отмечены очень низкие значения ожидаемой гетерозиготности (0,008-0,152, получены в ходе AFLP-анализа) [Kitner et al., 2012]. Для популяции *A. umbelliformis*, произрастающей в природных условиях, значения эффективного числа аллелей и ожидаемой гетерозиготности, рассчитанные по результатам AFLP-анализа, составили 1,23 и 0,14 соответственно [Comino et al., 2015].

Учитывая индексы генетического сходства Дайса внутри популяций, также можно говорить о невысоком уровне генетического разнообразия *A. hololeuca* Волгоградской области, минимальные значения данного показателя были не ниже 0,77, а максимальные – 0,94.

Анализируя среднее число аллелей и долю редких аллелей в популяциях, можно сказать, что наиболее равномерно частоты распределены в популяции станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского района (по данным ISSR- и AFLP-анализа), а также в популяции №2 станицы Луковская, Нехаевского района. В этих популяциях наблюдается наибольшее среднее число аллелей и наименьшая доля редких аллелей. Наибольшая доля редких аллелей и соответственно наименьшее среднее число аллелей отмечено для популяции №3 хутора Нестеровский, Алексеевского района.

Также проанализированы данные по межпопуляционному разнообразию *A. hololeuca*. Рассматривая данные о дифференциации популяций, можно говорить об их достаточно высоком уровне подразделенности (G_{ST} составил от 0,505 до 0,526). Доли внутривидовой и межвидовой изменчивости, рассчитанные в ходе анализа молекулярной дисперсии, были примерно равными друг другу.

При изучении межпопуляционного генетического разнообразия *A. halodendron* с помощью ISSR-анализа показано, что большая часть изменчивости приходится на различия внутри популяции (91,04%) [Huang et al., 2011]. Для популяций *A. pancicii* показаны другие результаты. Так, анализ AMOVA показал, что 82% изменчивости приходится на межпопуляционные различия [Kitner et al., 2012]. При AFLP-анализе дикой популяции и культивируемых популяций *A. umbelliformis* коэффициент G_{ST} составил 0,43 [Comino et al., 2015].

Уровень генетических расстояний *Нея* между популяциями *A. hololeuca* был невысоким (максимальное значение – 0,291). Более близки генетически оказались две популяции редкого вида полыни *A. molinieri*, коэффициент генетического сходства между двумя популяциями этого вида составил 0,958 [Torrell et al., 1999].

Анализируя дифференциацию образцов *A. hololeuca* на графиках главных координат, а также результаты анализа в программе Structure, полученные по результатам применяемых методов, можно говорить о нескольких группах популяций, дифференциация между которыми в основном связана с их географическим положением.

Наиболее обособлены как генетически, так и географически популяции хутора Белогорский (Урюпинский р-он) и популяции станицы Луковская (Нехаевский р-он). Друг от друга популяции из разных районов также дифференцированы (что видно на графиках главных координат, построенных по результатам ISSR- и AFLP-анализа), а популяции внутри одного района генетически не отличаются.

Следующую группу формируют популяции из хутора Нестеровский, популяция хутора Самолшинский и станицы Усть-Бузулукская (все популяции из Алексеевского р-на). Отметим, что популяции хутора Нестеровский и станицы Усть-Бузулукская расположены географически достаточно близко друг от друга, а популяция хутора Самолшинский достаточно удалена от них, она располагается на противоположном берегу реки Хопер. Возможно, объединение этих популяций в одну группу происходит из-за существующего интенсивного генетического обмена. Также, возможно, что популяция хутора Самолшинский образовалась в результате заноса некоторых генотипов популяций станицы Усть-Бузулукская и хутора Нестеровский на другой берег реки Хопер. В этой группе достаточно обособленное положение занимают популяция станицы Усть-Бузулукская и популяция №3 хутора Нестеровский.

Популяцию станицы Акишевская, хутора Красновский (Нехаевский район) и популяцию хутора Помалинский (Алексеевский район) можно объединить в еще одну группу. Здесь также существует некоторое несоответствие между географическим положением и генетической дифференциацией. Так, популяция хутора Помалинский расположена достаточно далеко от остальных популяций этой группы (на противоположном берегу реки Хопер, недалеко от популяции хутора Самолшинский). Для этой популяции при анализе в программе Structure также часто отмечались образцы, где присутствуют компоненты разных групп, что говорит о высоком уровне разнообразия в этой популяции (подтверждается высокими показателями внутрипопуляционного разнообразия). Возможно, эта популяция образовалась из генотипов популяций соседних групп или же существует интенсивный обмен генетическим материалом между популяциями. Две популяции, собранные недалеко от станицы Акишевской достаточно

удалены друг от друга генетически, особенно это видно на графиках главных координат, построенных по результатам AFLP- и ISSR-анализа (но это практически не проявляется при анализе в программе Structure).

Учитывая достаточную ограниченность района сбора образцов, можно говорить о довольно высоком уровне дифференциации *A. hololeuca*. Это можно связать с особенностью мест обитания этого вида, растения *A. hololeuca* приурочены только к выходам коренных плотных слоев мела, которые имеют локальное распространение. Также для изучаемого вида полыни показан преимущественно вегетативный тип размножения. Кроме того, род *Artemisia* можно считать высоко апомиктичным [Полянская, Кашин, 2011, Кашин и др., 2011]. Наличие апомиксиса может способствовать уменьшению внутрипопуляционного разнообразия и увеличению подразделенности популяций [Loveless, Hamrick, 1984]. Однако исследований, показывающих наличие апомиксиса у *A. hololeuca* не проводилось.

При анализе генетического разнообразия *A. hololeuca* были отмечены относительно невысокие показатели внутрипопуляционного разнообразия, а также довольно высокий уровень дифференциации популяций. Было выделено три группы популяций: группа популяций станицы Акишевской, хуторов Красновский и Помалинский; группа популяций хутора Нестеровский, Самолшинский и станицы Усть-Бузулукская; группа популяций станицы Луковская и хутора Белогорский. Желательно сохранение нескольких популяций из этих групп, т.к. внутри групп была отмечена генетическая дифференциация. Например, можно рекомендовать сохранять популяции из разных населенных пунктов. Среди популяций, собранных недалеко от одного и того же населенного пункта для сохранения можно выбрать какую-то одну популяцию. При выборе популяций для сохранения следует опираться на показатели генетического разнообразия и отбирать популяции с более высокими значениями этих показателей. Для успешного сохранения *A. hololeuca* следует уделить особое внимание сохранению мест обитания этого вида (исключить в районах произрастания выпас скота и добычу мела).

Заключение

В ходе работы было проанализировано генетическое разнообразие трех редких видов растений, произрастающих на территории Волгоградской области и занесенных в Красные книги области и Российской Федерации: лука регелевского (*Allium regelianum*), бельвалии сарматской (*Bellevallia sarmatica*) и полыни белойлочной (*Artemisia hololeuca*). Применены различные молекулярно-генетические маркеры, используемые для анализа разнообразия редких видов растений.

Оценивая результаты, полученные с помощью мультилокусных молекулярно-генетических маркеров, можно сказать, что они были достаточно сходны (для каждого из изученных видов). Не было существенных различий и между результатами, полученными с помощью методов, анализирующих условно селективно-нейтральные участки генома (AFLP, ISSR, RAPD), и полученными методом NBS-профайлинга, который анализирует потенциально адаптивно-значимые участки генома (семейство генов устойчивости). Монолокусный метод маркирования (SSR-анализ) оказался достаточно информативным, позволил детектировать гетерозиготы (что дает более точную оценку генетического разнообразия), однако различий с результатами, полученными мультилокусными методами, не выявлено. Поэтому применение любого из использованных методов даст вполне достоверную оценку внутри и межпопуляционному разнообразию редких растений. При анализе нуклеотидных последовательностей отдельных участков ядерного и хлоропластного генома не всегда удавалось выявить внутривидовой полиморфизм, однако, этот анализ оказался очень полезным для уточнения таксономического статуса изучаемых видов.

Уровень внутривидового полиморфизма изучаемых растений, выявленный с помощью мультилокусных молекулярно-генетических маркеров, а также SSR-анализа, был достаточно высоким, что в целом позволяет говорить о неплохих перспективах дальнейшего существования этих видов. Однако отдельные популяции изучаемых редких видов растений находятся в крайне уязвимом состоянии (для них отмечены достаточно низкие значения показателей внутривидового разнообразия). Наибольшим уровнем разнообразия отличаются популяции *B. sarmatica*. Для популяций *A. hololeuca* отмечены наиболее низкие значения показателей внутривидового разнообразия. Различия в уровне внутривидового разнообразия могут быть связаны с типом размножения данных видов. Так, для растений, размножающихся преимущественно семенным путем (это характерно для *A. regelianum* и *B. sarmatica*), отмечают больший уровень разнообразия, чем для растений, размножающихся в основном вегетативно (этот способ размножения характерен для *A.*

hololeuca). Данные по внутрипопуляционному разнообразию полезны при выборе популяций для сохранения.

Также была проанализирована генетическая дифференциация популяций. Уровень ее отличался у разных видов. Наиболее подразделены генетически популяции полыни беловойлочной, наименее – популяции лука регелевского.

Была отмечена взаимосвязь между выявленной с помощью молекулярно-генетического анализа группировкой популяций и их географическим положением. Для лука регелевского отмечены несколько групп популяций. Эти группы популяций можно приурочить к некоторым природно-территориальным комплексам Волгоградской области: Прикаспийскому, на левом берегу реки Волга и Задонскому и Волго-Медведицкому, на правом берегу реки Волга. Наличие групп популяций можно отметить также для полыни беловойлочной и бэльвалии сарматской. Для этих видов географически близкие популяции объединяются и по результатам генетического анализа, а также имеет место дифференциация отдельных популяций. Наличие пространственной дифференциации популяций (групп популяций) изучаемых видов и ее степень зависит от типа размножения, характера распределения подходящих местообитаний, а также, вероятно, от времени обособления популяций. Высокий уровень дифференциации *A. hololeuca* связан, по всей видимости, с особенностями мест ее обитания (полынь беловойлочная приурочена только к меловым обнажениям, которые имеют локальное распространение), а также с преимущественно вегетативным размножением. Низкий уровень дифференциации популяций *A. regelianum*, скорее всего, связан с недавней фрагментацией ареала, что еще не привело к их генетической изоляции, а также с преимущественно семенным размножением.

Группы популяций, выделенные в ходе молекулярно-генетического анализа, могут быть использованы как единицы сохранения. При невозможности сохранения целой группы популяций желательно сохранять одну или несколько популяций из группы – например, популяции, наиболее удаленные в генетическом плане. Желательно выбирать популяции с высоким уровнем разнообразия, особенно для сохранения *in situ*. Однако стоит обратить внимание на популяции с низкими значениями внутрипопуляционного разнообразия, как наиболее уязвимые и рассмотреть их сохранение *ex situ*. Полученные с помощью молекулярно-генетического маркирования данные необходимо применять для разработки стратегии сохранения видов, но обязательно совместно с данными экологических и ботанических исследований.

Выводы

1. Исследовано генетическое разнообразие трех редких видов растений (*Bellevia sarmatica*, *Allium regelianum* и *Artemisia hololeuca*), произрастающих на территории Волгоградской области, с помощью методов RAPD-, ISSR-, AFLP-, SSR-анализа, NBS-профайлинга. Каждый из применяемых молекулярно-генетических методов позволил выявить и оценить внутри и межпопуляционный полиморфизм у трех изученных видов растений. Наиболее информативным методом для всех изучаемых видов стал AFLP.
2. Анализ нуклеотидных последовательностей ядерного (ITS1-5.8S-ITS2) и хлоропластного (межгенные спейсеры *ndhJ-trnL*, *trnC-petN*) генома у образцов *A. regelianum* и *B. sarmatica* позволил оценить уровень внутривидового полиморфизма, который оказался достаточно низким (0,0-5,0% для лука регелевского и 0,4-1,3% для бельвалии сарматской), а также уточнить таксономический статус видов. Вид *B. sarmatica* следует отнести к секции *Nutantes*, наиболее таксономически близкими видами являются *B. webbiana* и *B. dubia*. *A. regelianum* следует отнести к секции *Allium*, наиболее таксономически близким видом является *A. ampeloprasum*.
3. Определены уровни внутривидового разнообразия *A. regelianum*, *B. sarmatica* и *A. hololeuca*, которые оказались относительно высокими для всех изучаемых видов. Уровень полиморфизма популяций *B. sarmatica* варьировал от 52 до 77%, *A. regelianum* – от 26 до 69%, *A. hololeuca* – от 17 до 48%. Различия могут быть связаны с типом размножения данных видов (преимущественно семенное размножение у *A. regelianum*, *B. sarmatica*, и преимущественно вегетативное у *A. hololeuca*).
4. Определен уровень генетической дифференциации популяций изучаемых видов растений (G_{ST}), который составил 0,18-0,28 для *A. regelianum*, 0,27-0,29 для *B. sarmatica* и 0,50-0,52 для *A. hololeuca*. Была отмечена взаимосвязь между выявленной с помощью молекулярно-генетического анализа группировкой популяций и их географическим положением. Наличие пространственной дифференциации популяций (групп популяций) изучаемых видов и ее степень зависит от типа размножения, характера распределения подходящих местообитаний, а также, вероятно, от времени обособления популяций.
5. На основе результатов молекулярно-генетического анализа *B. sarmatica*, *A. regelianum* и *A. hololeuca* даны рекомендации по их сохранению. Для *B. sarmatica* необходимо сохранить популяции Кумылженского и Калачевского районов и любую из популяций Серафимовичского и Клетского районов. В программе по сохранению *A. regelianum* обязательно должны быть представлены популяции, произрастающие на левом (Заволжье) и правом (территории

бассейнов рек Дон и Хопер) берегу реки Волга. Для *A. hololeuca* можно рекомендовать сохранять популяции, произрастающие вблизи разных населенных пунктов. Среди популяций, собранных недалеко от одного и того же населенного пункта, для сохранения можно выбрать одну из популяций *A. hololeuca*.

Список сокращений

- ИБ – индекс бутстрепа
- МСОП – Международный союз охраны природы и природных ресурсов
- ПААГ – полиакриламидный гель
- п.н. – пар нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов)
- AMOVA – Analysis of Molecular Variance (анализ молекулярной дисперсии)
- CAPS – Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (полиморфизм рестрикционных фрагментов участка ДНК, амплифицированного с высокоспецифичными праймерами)
- CTAB – Cetyl trimethylammonium bromide (гексадецилтриметиламмоний бромид)
- DArT – Diversity Arrays Technology (ДНК-чип технология для изучения разнообразия)
- EST – External Transcribed Spacer (внешний транскрибируемый спейсер)
- EST – Expressed Sequence Tags (маркеры к экспрессирующимся последовательностям генома (генам).)
- IRAP – Inter-retrotransposon-amplified-polymorphism (полиморфизм участков, амплифицированных между близкорасположенными последовательностями ретротранспозонов)
- ISSR – Inter Simple Sequence Repeats (межмикросателлитный полиморфизм)
- ITS – Internal Transcribed Spacer (внутренний транскрибируемый спейсер)
- LRR – Leucine-Rich Repeat (обогащенный лейцином повтор)
- NBS – Nucleotide Binding Site (нуклеотид связывающий домен)
- PCoA – principal coordinates analysis (метод главных координат)
- R-гены – Resistance (гены устойчивости)
- RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (полиморфизм случайно амплифицированных фрагментов)
- SCAR – Sequence Characterized Amplified Region (амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью)
- REMAP – Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (полиморфизм участков, амплифицированных между ретротранспозоном и микросателлитом)
- RGA – Resistance Gene Analogs (аналоги генов устойчивости)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphisms (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)

SRAP – Sequence-Related Amplified Polymorphism (полиморфизм фрагментов ДНК, связанных с определенной нуклеотидной последовательностью)

SSAP – Sequence-specific amplification polymorphism (полиморфизм амплификации специфических последовательностей)

SNP – Single-Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

SSR – Simple Sequence Repeats (простые повторяющиеся последовательности)

STS – Sequence Tagged Sites (сайт/участок ДНК, маркированный известной нуклеотидной последовательностью)

TBE – Tris-Borate-EDTA-buffer (трис-боратный ЭДТА-буфер)

VNTR – Variable Number Tandem Repeat (анализ варьирующих по числу tandemных повторов)

Список литературы

1. Абрамова, Т.И. Влияние экологических условий на флористический состав меловой растительности / Т.И. Абрамова // Флористические и геоботанические исследования в Европейской России. — Саратов: Изд-во Саратов. пед. ин-та, 2000.—С. 66–68.
2. Агеева, С. Е. (а) Сохранение биоразнообразия редких и исчезающих видов растений в Волгоградском региональном Ботаническом саду / С. Е. Агеева, Л.Н. Круглова, А.В. Буганова, О.О. Жолобова, Г.Н. Сафронова // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. – 2012. – №. 7. С. 103-108.
3. Агеева, С.Е. Опыт изучения и сохранения вида *Allium regelianum* A. Becker Волгоградским региональным ботаническим садом на территории Волгоградской области / С.Е. Агеева, Г.Н. Сафронова, О.И. Коротков, К.А. Гребенников, Л.Н. Круглова, О.О. Жолобова //Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле». – 2012. – №. 3. С. 34-40
4. Алтухов, Ю.П. Внутривидовое генетическое разнообразие: мониторинг и принципы сохранения / Ю.П. Алтухов // Генетика. – 1995. – Т.31. – №. 10. – С. 1333–1357.
5. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях: Учеб. пособие. 3-е изд., перераб. и доп. /Ю.П. Алтухов; Отв. ред. Л.А. Животовский. – М.: ИКЦ «Академ-книга», 2003. – 431 с.
6. Алтухов, Ю.П. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ю.П. Алтухов, Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. и др. – М.: Наука, 2004 – 619 с.
7. Беленикин, М.С. Поиск адаптивных изменений, связанных с устойчивостью к обитанию в условиях высокогорий: высокопроизводительное секвенирование и сравнительный анализ последовательностей хлоропластных геномов из нескольких видов рода *Allium* / М.С.Беленикин, А.А. Криницына, М. Д. Логачева и др. // Вестник защиты растений. – 2016. – Т.89. – № 3. – С. 23–24.
8. Бельтюкова, Н. Н. Исследование генетического полиморфизма лекарственного вида *Digitalis grandiflora* Mill. с использованием анализа ретротранспозонов / Н.Н. Бельтюкова, С. В. Боронникова, Л. Г. Кариева //Аграрная Россия. – 2009. – №. 4. – С. 20-23.
9. Боронникова, С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редкого вида растений Пермского края *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC / С.В. Боронникова,

- Нечаева Ю.С. //Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2012. – №. 1. – С. 41-44.
10. Боронникова, С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR-и IRAP-маркеров / С.В. Боронникова //Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2009. – №. 1. – С. 82-87.
 11. Боронникова, С.В. Изучение генетического разнообразия растений, произрастающих в условиях нефтяного загрязнения почв с использованием ISSR-маркеров на примере *Poa pratensis* L. / Боронникова, С. В., Мандрица, С. А., Светлакова, Т. Н., Назаров, А. В., Суслонов, А. В. // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – №. 1. – С. 59-63.
 12. Боронникова, С.В. Молекулярно-генетический анализ генофондов редких и исчезающих растений Пермского края: автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.00.15 / Боронникова Светлана Валерьевна.– Уфа, 2009. – 44 с.
 13. Брылев, В.А. Физико-географическое (ландшафтное) районирование Волгоградской области / В.А. Брылев, Н.О. Рябинина // Стержень: науч. ежегодник. – Волгоград: ГУ «Издатель», 2001. – Вып. 2. – С.12-23.
 14. Введенский, А.И. Род Лук – *Allium* L. / А.И. Введенский, Флора СССР. Т. 4, Гл. ред. В.Л. Комаров. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935 – С. 112–280. (*A. regelianum* – С. 241-242.)
 15. Гаевская Е.И. Вместо предисловия / Е.И. Гаевская // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т.164. – С.4-10.
 16. Гончаров, Н.П. От сохранения генетических коллекций к созданию национальной системы хранения генофондов растений в вечной мерзлоте/ Н.П.Гончаров, В.К. Шумный // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т.12. – №. 4 – С.509.
 17. Горелова, Л.Н. Растительный покров меловых обнажений планируемого национального парка «Двуречанский» / Л.Н. Горелова, Е.И. Горелова // Сборник научных статей Научные исследования на территории природно-заповедного фонда Харьковской области. – Харьков, 2003. – С.23-28.
 18. Горюнова, С.В. RAPD-анализ внутривидовой изменчивости и филогенетических связей видов эгилопса (*Aegilops* L.), содержащих D-геном / С.В. Горюнова, Е.З. Кочиева, Н.Н. Чикида, В.А. Пухальский // Генетика. – 2004. – Т. 40. – №.5. – С. 642–651.
 19. Гостимский, С.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров / С. А. Гостимский, З. Г. Кокаева, Ф. А. Коновалов // Генетика. – 2005. – Т. 41. – №. 4. – С. 480-492.
 20. Григорьевская, А.Я. Современное состояние фитоценотического разнообразия ООПТ кальцефитных степей Центрально-Черноземного района России / А.Я. Григорьевская,

- Д.Ю. Сергеев, М.А. Подгорная // Материалы конференции Режимы степных особо охраняемых природных территорий. – Курск, 2012. – С.39-42.
21. Гусев, А.В. Флористические находки в восточных и юго-восточных районах Белгородской области / А.В. Гусев, Е.И. Ермакова // Материалы межрегиональной научной конференции Флора и растительность Центрального Черноземья. – Курск, 2013. – С.16-20.
 22. Дегтярь, О.В. О средообразующей роли эндемичных видов кальцефильных сообществ юга среднерусской возвышенности / О.В. Дегтярь, Чернявских В.И. // Экология. – 2006. – №.2. – С.156-158.
 23. Дзюбан, О.В. Анализ внутривидового полиморфизма *Allium ursinum* L. с помощью морфологических и ISSR-маркеров / О.В. Дзюбан, З.Е. Грушецкая, М.А.Джус, В.Н. Тихомиров, В.И. Парфенов // Сборник статей Международной научной конференции Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений. – 2014. – С. 87-90
 24. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке // Молекулярная генетика. – 1997. – Т. 33. – №. 4. – С. 443-450.
 25. Животовский Л.А. Популяционная биометрия / Л.А. Животовский. – М.: Наука, 1991. 271 с.
 26. Животовский, Л.А. Популяционная структура вида: эко-географические единицы и генетическая дифференциация популяций / Л.А. Животовский // Биология моря. – 2016. – Т.42. – №.5. – Р. 323-333.
 27. Журавлев Ю.Н. «Молекулярные маркеры для сохранения редких видов растений Дальнего Востока»/ Журавлев Ю.Н., Корень О.Г., Музарок Т.И., Реунова Г.Д., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Илюшко М.В. // Физиология растений. –1999. – Т. 46. – № 6. – С.953-964.
 28. Землянухина, О.А. Изучение метаболических особенностей видов полыней региональной флоры, культивируемых в ботаническом саду Воронежского Государственного Университета / О.А. Землянухина, В.Н. Вепринцев, К.А. Карпеченко, Н.А. Карпеченко, В.Н. Калаев, Л.А. Лепешкина, З.П. Муковнина, В.И. Серикова, Е.В. Моисеева, Т.В. Баранова, Б.И. Кузнецов // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11-1. – С. 13-19.
 29. Ильин, М.М. Семейство *Liliaceae* — Лилейные / М.М. Ильин // Флора Юго-Востока Европейской части СССР.—Вып. 3.—Л., 1929.—С. 330–406.

30. Календарь, Р. Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – №. 4. – С. 279-296.
31. Камелин, Р.В. Флорогенетический анализ естественной флоры горной Средней Азии / Р.В. Камелин – Л.: Наука, 1973. – 355 с.
32. Кашин, А.С. Особенности семенного размножения в популяциях некоторых видов *Artemisia* (Asteraceae) / А.С. Кашин, М.В. Полянская, И.С. Кочанова // Ботанический журнал. – 2011. – Т. 96. – №. 3. – С. 388-396.
33. Конарев, А.В. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства / А.В. Конарев, В.Г. Конарев, Н.К. Губарева, Т.И. Пенева // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34. – №. 2. – С. 91-104.
34. Конвенция о биологическом разнообразии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cbd.int/>
35. Конспект флоры Саратовской области / Под общ. ред. А.А. Чигуряевой. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1983. – 105 с.
36. Кочиева, Е.З. RAPD и ISSR-анализ видов и популяций рода *Stachys* / Е.З. Кочиева, Н.Н. Рыжова, М.П. Легкобит, Н.В. Хадеева // Генетика. – 2006. – Т. 42. – №. 7. – С. 887–892.
37. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – 532с.
38. Красная книга Волгоградской области: в 2 т. / Т.2: Растения и грибы / под ред. В. С. Новикова, Г. Ю. Клинковой. – Волгоград: Изд-во Волгоград, 2006. – 236с
39. Красная книга Краснодарского края: Растения и грибы / отв. ред. С.А. Литвинская. – Изд. 2-е. – Краснодар: Дизайн Бюро, 2007. – 639с.
40. Красная книга Республики Дагестан / отв. ред. Г.М. Абдурахманов. – Махачкала: Дагестанское книжное издательство, 1998. – 338с.
41. Красная книга Республики Северная Осетия – Алания: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных. – Владикавказ: Проект-Пресс, 1999. – 248с.
42. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М. В. Ломоносова; Гл. редколл.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. — 885 с.

43. Красная книга Ростовской области: в 2 т. / Администрация Ростовской области, Комитет по охране окружающей среды и природных ресурсов. – Т. 2: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения грибы, лишайники и растения /отв. ред. В.В. Федяева. – Ростов н/Д: Малыш, 2004. – 333с.
44. Красная книга РСФСР (растения) / АН СССР, Ботан. инт-т им. В.Л. Комарова; Всесоюз. ботан. общ-во; Гл. упр. охотн. хоз-ва и заповедников при Совете Министров РСФСР; Гл. ред-колл.: В.Д. Голованов и др.; Сост. А.Л. Тахтаджян. – М.:Росагропромиздат, 1988. – 590 с.
45. Красная книга Ставропольского края: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных: в 2 т. / отв. ред. Н.С. Панасенко. – Т.1: Растения / отв. ред. А.Л. Иванов. – Ставрополь: Полиграфсервис, 2002. – 384с.
46. Крицкая, Т. А. Повышение эффективности клонального микроразмножения *Allium regelianum* A. Becker / Т.А. Крицкая, А.С. Кашин, А.О. Попова // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. – 2015. – №. 13. – С.197-205.
47. Кузнецов, Б.И. Семенная продуктивность ранневесенних степных эфемероидов на примере *Bulbocodium versicolor* (Ker-Gavel.) Spreng. и *Bellevallia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow в природных условиях и культуре / Б.И. Кузнецов, Е.В. Моисеева, О.С. Глазнева //Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. – 2011. – №. 2. – С. 104-106.
48. Литвинская, С. А. О произрастании *Bellevallia Speciosa* Woronow ex Grossh. в Западном Предкавказье И северо-западном Закавказье / С. А. Литвинская, А. Е. Кулюзин, О.А. Давыдова // Географические исследования Краснодарского края: сб. науч. трудов; под общей редакцией А.В. Погорелова. – Краснодар: Кубанский государственный университет, 2016. – С. 182-187.
49. Литвинская, С.А. Бельвалия великолепная (*Bellevallia speciosa* Woronow ex Grossh.) / С.А. Литвинская, Е.В. Мордак // Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. Изд. 2-ое / Отв. ред. С.А. Литвинская. – Краснодар: ООО Дизайн Бюро №1, 2007. – С. 369-371.
50. Лозина-Лозинская, А.С. Род *Bellevallia* L. / А.С. Лозина-Лозинская, Флора СССР. Т. 4, Гл. ред. В.Л. Комаров. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935 – С.395-405. (*B. sarmatica* – С. 397-398).
51. Магулаев, А.Ю. К биологии размножения *Bellevallia sarmatica* (Georgi) Woronow в условиях интродукции / А.Ю. Магулаев // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. – 2011. – №. 1. – С. 165-166.

52. Малаева Е. В., Власов Е. А. Деятельность Волгоградского регионального ботанического сада по сохранению биоразнообразия //Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки. – 2016. – №. 3 (17) – С.63-70.
53. Малаева, Е.В. Генетический банк редких и ценных видов растений Волгоградского регионального ботанического сада / Е.В. Малаева, Н.А. Супрун, О.И. Коротков, О.О. Короткова // Вестник ВолГУ. Серия 3, Экология. – 2008. — №2 (13). – С.253-257.
54. Михайлова, Ю. В. Молекулярная изменчивость и филогеография смолевки бесстебельной *Silene acaulis* (L.) Jacq.(*Caryophyllaceae*) на севере Европы и архипелаге Шпицберген / Ю. В. Михайлова, Г. Л. Гусарова, Б. Кристиан //Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – №. 3. – С. 52-60.
55. Муллагулов, Р. Ю. Генетическое разнообразие популяций редких и исчезающих видов растений на Южном Урале / Р.Ю. Муллагулов //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – №. 9 (170). – С. 140-142.
56. Омельчук-Мякушко, Т.Я. Сем. *Alliaceae* J.G. Agardh / Т.Я. Омельчук-Мякушко, Флора Европейской части СССР. Т. 4 / Под ред. Ан.А. Федорова. – Л.: Наука, 1979. – С. 261–276.
57. Плаксина Т.И. Конспект флоры Волго - Уральского региона / Т.И. Плаксина. – Самара: Самарский ун-т, 2001. – 388 с.
58. Поляков, П.П. Род *Artemisia* L. / П.П. Поляков, Флора СССР. Т. 26, Гл. ред. Б.К. Шишкин, Е.Г. Бобров. – Л.: Изд-во АН СССР, 1961 – С.424-630. (*A. hololeuca* – С. 507-508).
59. Полянская, М.В. Частота апомиксиса у некоторых видов *Artemisia* (Asteraceae) Саратовской области / М.В. Полянская, А.С. Кашин //Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2011. – Т. 11. – №. 1. – С.
60. Савельева, Е. Н.Полиморфизм NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) по данным NBS-профайлинга Е. Н. Савельева, К. В. Борис, Е. З. Кочиева, А. М. Кудрявцев //Генетика. – 2016. – Т. 52. – №. 12. – С. 1463-1468.
61. Сагалаев, В.А. *Alliaceae* / В.А. Сагалаев, Флора Нижнего Поволжья, под. общ. ред. А.К. Сковрцова Том1. – М.: Т-во научных изданий КМК., 2006. – 435с.
62. Сагалаев, В.А. Бельвалия сарматская *Bellevaia sarmatica* (Georgi) Woronow / В.А. Сагалаев // Красная книга Волгоградской области : в 2 т. — Волгоград : Изд-во Волгоград, 2006. — Т. 2: Растения и грибы / под ред. В. С. Новикова, Г. Ю. Клинковой. — 236 с.

63. Сагалаев, В.А. Лук регелевский *Allium regelianum* A. Beck. / В.А. Сагалаев, Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М. В. Ломоносова; Гл. редколл.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. — С. 46
64. Сагалаев, В.А. Луки флоры Нижнего Поволжья / В.А. Сагалаев // Бюл. Гл. бот. сада.— М., 1997.—Вып. 174.—С. 41–46.
65. Сагалаев, В.А. О распространении и охране видов лука в Волгоградской области / В.А. Сагалаев // Бюл. Гл. бот. сада.—М., 1987.—Вып. 146.— С. 60–65.
66. Светлакова, Т. Н. Эколого-генетический анализ популяционной структуры *Populus tremula* L. в Пермском крае / Т.Н. Светлакова, И.В. Бобошина, С.В. Боронникова, Ю.С. Нечаева //Экологическая генетика. – 2012. – Т. 10. – №. 3. – С. 22-26.
67. Семёнова-Тян-Шанская, А.М. Биология растений и динамика растительности меловых обнажений по р. Деркул / А.М. Семёнова-Тян-Шанская // Тр. Бот. ин-та АН СССР. Сер. 3, Геобот.—1954.—Вып. 9.—С. 578–645.
68. Серегин, А.П. Род *Allium* L. (*Alliaceae*) во флоре Восточной Европы: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05/ Серегин Алексей Петрович. – М., 2007. – 242с.
69. Серегин, А.П. Три вида лука (*Allium* L., *Alliaceae*) с Таманского полуострова, новых для флоры Кавказа / А.П. Серегин // Бюллетень МОИП. Отд. биол. – 2004. – Т. 109. – Вып.3. – С. 89-90.
70. Сидорова, Л.А. Биоценопопуляционные исследования кальцефильных полукустарничков *Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess. (*Asteraceae*) и *Silene cretacea* Fisch. ex Spreng. (*Caryophyllaceae*) на территории Волгоградской области: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05/ Сидорова Людмила Алексеевна. – Волгоград, 2008. – 23с.
71. Сидорова, Л.А. Неоднородность структурной организации ценопопуляций *Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess. (*Asteraceae*) во времени и пространстве / Л.А. Сидорова // Вестник ВолГУ. Серия 11, Биология и биотехнология. – 2011. — №1 (1). – С.30-35.
72. Слугина, М.А. Анализ последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2 и рибосомального гена 5.8S видов рода *Amaranthus* / М.А. Слугина, К. Торрес Миньо, М.А. Филюшин // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2014. – №.6. – С.631.

73. Слугинова, И.С. Жизненные формы облигатных и факультативных меловиков долины реки Полной (Ростовская область) / И.С. Слугинова // Бюллетень ботанического сада Института ДВО РАН. – 2010. – №5. – С.135-136.
74. Слугинова, И.С. Эколого-биологический анализ флоры меловых обнажений бассейна р. Полной (Ростовская область) и вопросы ее охраны: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16/ Слугинова Ирина Сергеевна. – Ростов-на-Дону, 2009. – 22с.
75. Снегин, Э. А. Генетическая структура популяций особо охраняемого моллюска *Serapea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях северо-восточной части современного ареала / Э. А.Снегин, Е. А. Снегина // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14. – №. 3. С13-27
76. Снегин, Э. А. Генетическая структура популяций особоохраняемого вида проломника козо-полянского (*Androsace kozo-poljanskii* Ovcz.) в условиях юга Среднерусской возвышенности на основе ДНК-маркеров / Э. А. Снегин, Е.А. Снегина, Т.А. Новомлинская //Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14. – №. 1. С. 3-12.
77. Современные методы и международный опыт сохранения генофонда дикорастущих растений (на примере диких плодовых). Алматы. – 2011. – 188с.
78. Фазалова, В.Р. Влияние изменений окружающей среды и демографических особенностей популяций на их генетическое разнообразие: дис. ... канд.биол.наук: 03.02.07/ Фазалова Варвара Равильевна. – Иркутск, 2011. –130 с.
79. Филюшин, М. А. AFLP маркирование генотипов сортов лука-порея (*Allium porrum*) / М.А. Филюшин, О.А. Холда, Е.З. Кочиева, Н.Н. Рыжова // Генетика. – 2011. – Т. 47. – №. 4. – С. 560-565.
80. Филюшин, М.А. Анализ варибельности гена 5.8S рРНК у представителей третьей эволюционной группы рода *Allium* / М.А. Филюшин, Е.З.Кочиева // Генетика. – 2014. – Т.50. – №10. – С. 1263-1268.
81. Филюшин, М.А. Анализ полиморфизма генома чеснока *Allum sativum* и родственных видов секции *Allium*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / Филюшин Михаил Александрович. – М., 2017. – 141 с.
82. Фризен, Н.В. Луковые Сибири: систематика, кариология, хорология / Н.В. Фризен. – Новосибирск: Наука, 1988. – 184 с.
83. Шигапов, З. Х. Генетическое разнообразие популяций редкого вида *Dscamnui gymnostylis* Stev. в башкирском Предуралье /З.Х. Шигапов, А.Н. Мустафина, А.И. Шигапова, К.А. Уразбахтина//Генетика. – 2014. – Т. 50. – №. 9. – С. 1067-1075.

84. Шмараева, А. Н. Экологические аспекты развития ценопопуляций беллевалии сарматской (*Bellevaia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow) в условиях сухих степей Ростовской области / А. Н. Шмараева, Ж. Н. Шишлова, В. В. Федяева // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2009. – Т. 5. – №. 2. – С. 74-78.
85. Abdou, R. Genetic diversity of Niger onions (*Allium cepa* L.) assessed by simple sequence repeat markers (SSR) / R. Abdou, Y. Bakasso, M. Saadou, J.P. Baudoin, O.J. Hardy // Acta Horticulturae 1143, VII International Symposium on Edible Alliaceae. – 2015. – P. 77-90.
86. Aboukhalid, K. Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: Implication for conservation / K. Aboukhalid, N. Machon, J. Lambourdière, J. Abdelkrim, M. Bakha, A. Douaïk, G. Kordecka-Glinka, F. Gaboun, F. Tomi, A. Lamiri, C. Al Faiz, // Biological conservation. – 2017. – V. 212. – P. 172-182.
87. Adams, M. D. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project / M. D. Adams, J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C.R. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno // Science. – 1991. – V. 252. – №. 5013. – P. 1651-1656.
88. Agren, J. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria* / J. Agren // Ecology. – 1996. – V. 77. – P. 1779-1790.
89. Ahrens, C. W. Genomic diversity guides conservation strategies among rare terrestrial orchid species when taxonomy remains uncertain / C. W. Ahrens, M. A. Supple, N. C. Aitken, D. J. Cantrill, J. O., Borevitz, E. A. James // Annals of botany. – 2017. – V. 119. – №. 8. – P. 1267-1277.
90. Allendorf, F. W., Luikart G. Conservation and the genetics of populations / F. W. Allendorf, G. Luikart – Blackwell Publishing, 2009 – 642 p.
91. Alonso, D. Population structure and pattern of geographic variation in *Muscari comosum* along its range of distribution / D. Alonso, L. P. Reguera // Genetica. – 1986. – V. 78. – №. 1. – P. 39-49.
92. Alper, I. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum* / I. Alper, M. Frenette, S. Labrie // Fungal biology. – 2011. – V. 115. – №. 12. – P. 1259-1269.
93. Andrić A. et al. Diversity and genetic structure of *Ornithogalum* L. (Hyacinthaceae) populations as revealed by RAPD-PCR markers / A. Andrić, N. Kočič-Tubić, M. Rat, D. Obreht-Vidaković // Genetika. – 2015. – V. 47. – №. 1. – P. 275-288.

94. Armstrong, T. T. Conservation genetics of *Hebe speciosa* (Plantaginaceae) an endangered New Zealand shrub / T. T. J. Armstrong, P. J. De Lange // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2005. – V. 149. – №. 2. – P. 229-239.
95. Atnaf, M. Molecular genetic diversity and population structure of Ethiopian white lupin landraces: Implications for breeding and conservation / M. Atnaf, N. Yao, K. Martina, K. Dagne, D. Wegary, K. Tesfaye // PloS one. – 2017. – V. 12. – №. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188696>
96. Badr, A. Genetic diversity of *Artemisia* populations in central and north Saudi Arabia based on morphological variation and RAPD polymorphism / A. Badr, H.H. El-Shazly, N.S. Helail, W. El Ghanim // Plant systematics and evolution. – 2012. – V. 298. – №. 5. – P. 871-886.
97. Baldwin, B.G. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny / B.G. Baldwin, M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski C.S. Campbell, M.J. Donoghue // Ann. Missouri Bot. Gard. – 1995. – V. 82. – №2. – P. 247-277
98. Bareka, P. Molecular cytogenetics of *Bellevalia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece / P. Bareka, S. Siljak-Yakovlev, G. Kamari // Plant systematics and evolution. – 2012. – V. 298. – №. 2. – P. 421-430.
99. Barrett, S.C.H. Genetic and evolutionary consequences of small population sizes in plants: Implications for conservation / S.C.H. Barrett, J.R. Kohn In Genetics and Conservation of Rare Plants, Eds. D.A. Falk, K.A., Holsinger – New York: Oxford University Press, 1991. – 3-30 pp.
100. Benbouza, H. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels / H. Benbouza, J. Jacquemin, J. Baudoin, G. Mergeai // BASE (Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement). – 2006. – V.10. – №.2. – P. 77-81.
101. Booy, G. Genetic diversity and the survival of populations / G. Booy, R. J. J. Hendriks, M. J. M. Smulders, J. V. Groenendaal, B. Vosman // Plant biology. – 2000. – V. 2. – №. 4. – P. 379-395.
102. Bornet, B. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting / B. Bornet, M. Branchard // Plant molecular biology reporter. – 2001. – V. 19. – №. 3. – P. 209-215.
103. Borzatti von Loewenstern, A. Phylogenetic relationships of Italian *Bellevalia* species (Asparagaceae), inferred from morphology, karyology and molecular systematics / A. Borzatti von Loewenstern, T. Giordani, G. Astuti, A. Andreucci, L. Peruzzi // Plant Biosystems. – 2013. – V. 147. – №. 3. – P. 776-787.

104. Bothmer, R. Cytological and morphological variation in *Bellevalia* / R. Bothmer, P. Wendelbo // Nordic Journal of Botany. – 1981. – V. 1. – №. 1. – P. 4-11.
105. Bremer, K. Asteraceae: Cladistics and Classification / K. Bremer. – Portland: OR, Timber Press, 1994. – 752p.
106. Bremer, K. Generic monograph of the Asteraceae-Anthemideae / K. Bremer, C. Humphries // London Bull Nat Hist Museum. – 1993. – V.23. – P.1-177.
107. Brugmans, B. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS-profiling // B. Brugmans, D. Wouters, H. van Os, R. Hutten, G. van der Linden, R. G. F. Visser, H. J. van Eck, E. A. G. van der Vossen // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – V. 117. – № 8. – P. 1379-1388.
108. Burstin, J. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum* / J. Burstin, G. Deniot, J. Potier, C. Weinachter, G. Aubert, A. Barranger // Plant Breeding. – 2001. – V. 120. – №. 4. – P. 311-317.
109. Buso, G.S.C. Genetic diversity studies of Brazilian garlic cultivars and quality control of garlic-clover production / G.S.C. Buso, M.R. Paiva, A.C. Torres, F.V. Resende, M.A. Ferreira, J.A. Buso, A.N. Dusi // Genetics and Molecular Research. – 2008. – V. 7. – №. 2. – P. 534-541.
110. Byers, D.L. Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae) / D.L. Byers // American Journal of Botany – 1995. – V. 82. – №. 8. – P. 1000-1006.
111. Carabeo, M. Estimating the genetic diversity and structure of *Quercus trojana* Webb populations in Italy by SSRs: implications for management and conservation / M. Carabeo, M. C. Simeone, M. Cherubini, C. Mattia, F. Chiocchini, L. Bertini, C. Caruso, T. La Mantia, F. Villani, C. Mattioni // Canadian Journal of Forest Research. – 2016. – V. 47. – №. 3. – P. 331-339.
112. Caujapé-Castells, J. Designing ex-situ conservation strategies through the assessment of neutral genetic markers: application to the endangered *Androcymbium gramineum* / J. Caujapé-Castells, J. Pedrola-Monfort // Conservation Genetics. – 2004. – V. 5. – №. 2. – P. 131-144.
113. Charlesworth, D. Inbreeding depression and its evolutionary consequences / D. Charlesworth, B. Charlesworth // Annual review of ecology and systematics. – 1987. – V. 18. – №. 1. – P. 237-268.

114. Chase, M. W. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae* and *Xanthorrhoeaceae* / M. W. Chase, J. L. Reveal, M. F. Fay // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2009. – V. 161. – №. 2. – P. 132-136.
115. Chen, S. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits / S. Chen, W. Chen, X. Shen, Y. Yang, F. Qi, Y. Liu, H. Meng // Biochemical Systematics and Ecology. – 2014. – V. 55. – P. 260-267.
116. Cipollini, K. Genetic structure of the endangered northeastern bulrush (*Scirpus ancistrochaetus*) in Pennsylvania, USA, using information from RAPD and SNPs / K. Cipollini, K. C. Millam, D. Burks, D. Cipollini, S. Girod, Z. VanGundy, J. L. Peters // Biochemical genetics. – 2013. – V. 51. – №. 9-10. – P. 686-697.
117. Clegg, M. T. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects / M. T. Clegg, G. Zurawski In Molecular systematics of plants, Eds. S. Soltis, E. Douglas, E. Soltis, J.J. Doyle – Boston: Springer, Boston, MA, 1992. – P. 1-13.
118. Cole, C. T. Genetic variation in rare and common plants / C. T. Cole // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. – 2003. – V. 34. – №. 1. – P. 213-237.
119. Collevatti, R. G. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species / R. G. Collevatti, S. G. Rabelo, R. F. Vieira // Annals of Botany. – 2009. – V. 104. – №. 4. – P. 655-664.
120. Collevatti, R. G. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci / R. G. Collevatti, D. Grattapaglia, J. D. Hay // Molecular ecology. – 2001. – V. 10. – №. 2. – P. 349-356.
121. Gómez-Gómez, L. Genetic characterization and variation within and among populations of *Anthyllis rupestris* Coss., and endangered endemism of southern Spain / L. Gómez-Gómez, O. Ahrazem, J. M. Herranz, P. Ferrandis // Biochemical systematics and ecology. – 2012. – V. 45. – P. 138-147.
122. Comino, C. Selection in *Artemisia umbelliformis* Lam. Piedmont ecotypes to improve cultivation in alpine environment / C. Comino, G. Pignata, E. Portis, Y. Dolzhenko, M. Casale, S. Nicola // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2015. – V. 62. – №. 4. – P. 567-577.
123. Condit, R. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes / R. Condit, S. P. Hubbell // Genome. – 1991. – V. 34. – №. 1. – P. 66-71.
124. Crawford, D.J. Allozyme diversity in the endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation / D.J. Crawford, E. Ruiz, T.F. Stuessy, E. Tepe, P. Aqueveque, F. Gonza'lez, R.J.

- Jensen, G.J. Anderson, G. Bernardello, M. Baeza, U. Swenson, M. Silva // *American Journal of Botany*. – 2001. – V. 88. – P. 2195-2203.
125. Crema, S. High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae) using ISSR fingerprinting / S. Crema, G. Cristofolini, M. Rossi, L. Conte // *Plant systematics and evolution*. – 2009. – V. 280. – №. 1-2. – P. 29-36.
 126. del Hoyo, A. Population genetics and conservation of the extremely narrow Pyrenean palaeoendemic *Glandora oleifolia* (Boraginaceae) / A. del Hoyo, J. López-Pujol, M. Yoon Chung, B.L. de la Vega // *Plant Ecology and Diversity*. – 2012. – V. 5. – №. 4. – P. 501-511.
 127. Ding, K. Allozyme variation in the diploid (A genome) populations of *Scilla scilloides* (Hyacinthaceae) // K. Ding, S. Ge, Z. Yu, D. Hong // *Plant systematics and evolution*. – 1999. – V. 218. – №. 1-2. – P. 23-31.
 128. Doyle, J. DNA Protocols for Plants/ J. Doyle // *Molecular Techniques in Taxonomy NATO ASI Series*. –1991. –V. 57. – P. 283–293.
 129. Earl, D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D.A. Earl // *Conservation genetics resources*. – 2012. – V. 4. – № 2. – P. 359-361.
 130. Ebrahimi, R. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers / R. Ebrahimi, Z. Zamani, A. Kashi // *Scientia Horticulturae*. – 2009. – V.119. – P. 345–351.
 131. Ellis, J. R. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener / J. R. Ellis, C. H. Pashley, D. E. McCauley // *Molecular Ecology*. – 2006. – V. 15. – №. 9. – P. 2345-2355.
 132. Ellstrand, N. C. Population genetic consequences of small population size – implications for plant conservation / N. C. Ellstrand, D. R. Elam // *Annual Review of Ecology and Systematics*. –1993. – V.24.– P.217–242.
 133. Feinbrun, N. A monographic study on the genus *Bellevallia* Lapeyr. (caryology, taxonomy, geography) (continued) / N. Feinbrun // *Palestine Journal Botany Jerusalem Series*. – 1940. – V. 1. – P. 336-409.
 134. Feliner N Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. / N. Feliner, G. & J.A. Rosselló // *Molecular Phylogenetics and Evolution* – 2007 – V. 44 – P. 911-919.
 135. Feng, X. Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers / X. Feng, Y. Wang, X. Gong // *BMC plant biology*. – 2014. – V. 14. – №. 1. – P. 187-202.

136. Fengrong, H. Genetic Diversity of 29 Hyacinth Germplasm Resources Revealed by Using ISSR Markers / H. Fengrong, H. Yuemiao, W. Fei, R. Cui // *Molecular Plant Breeding*. – 2015. – V. 2. – P. 026.
137. Fischer, D. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum* / D. Fischer, K. Bachmann // *Theor Appl Genet*. – 2000. – V.101. – P.153–164.
138. Fischer, M. Mating structure, and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae) / M. Fischer, and D. Matthies // *American Journal of Botany*. – 1997. – V.84. – P.1685-1692.
139. Francisco - Ortega, J. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective / J.Francisco - Ortega, A. Santos - Guerra, S. C. Kim, D. J. Crawford // *American Journal of Botany*. – 2000. – V. 87. – №. 7. – P. 909-919.
140. Frankel, O. H. 1970. Genetic conservation in perspective. Pp. 469–489 in Frankel, O. H., and E. Bennett, eds. *Genetic Resources in Plants – their Exploration and Conservation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
141. Frankel, O. H. *Conservation and Evolution* / O. H. Frankel, M. E Soule. – Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1981.
142. Frankel, O. H. The conservation of plant biodiversity / O. H. Frankel, A. H. D. Brown, J. J. Burdon. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 301 p.
143. Frankham, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife / Frankham // *Conservation Biology*. – 1996. – V.66. – P.1500-1508.
144. Friesen, N. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences / N. Friesen, R. M. Fritsch, F. R. Blattner // *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*. – 2006. – V. 22. – №. 1. – P. 372-395.
145. Fritsch, P. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation Genetic / P. Fritsch, L. H. Rieseberg In *Molecular genetic approaches in conservation*, Ed. T.B. Smith, R.K. Wayne – New York: Oxford University Press, 1996. – P. 54-74.
146. Fujii, N. Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan / N. Fujii, N. Tomaru, K. Okuyama, T. Koike, T. Mikami, K. Ueda, // *Plant Systematics and Evolution*. – 2002. – V. 232. – №. 1-2. – P. 21-33.
147. Gao, Q. Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments / Q. Gao, D. Zhang, Y. Duan, F. Zhang, Y. Li, P. Fu, S.Chen // *Botanical journal of the Linnean Society*. – 2012. – V. 168. – №. 2. – P. 204-215.

148. Ge, S. Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae) / S. Ge, D. Y. Hong, H. Q. Wang, Z. Y. Liu, C. M. Zhang, // International Journal of Plant Sciences. – 1998. – V. 159. – №. 2. – P. 351-357.
149. Ge, X. J. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis / X. J. Ge, Y. Yu, Y. M. Yuan, H. W. Huang, C. Yan // Annals of Botany. – 2005. – V. 95. – №. 5. – P. 843-851.
150. Geleta, M. Population genetic analysis of *Lobelia rhynchopetalum* Hemsl. (Campanulaceae) using DNA sequences from ITS and eight chloroplast DNA regions / M. Geleta, T. Bryngelsson // The Scientific World Journal. – 2012. – P. 1-10.
151. George, S. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms / S. George, J. Sharma, V.L. Yadon // American Journal of Botany. – 2009. – V. 96. – №. 11. – P. 2022-2030.
152. Gielly, L. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences / L. Gielly, P. Taberlet // Molecular biology and evolution. – 1994. – V. 11. – №. 5. – P. 769-777.
153. Gitzendanner, M.A Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners / M.A. Gitzendanner, P.S. Soltis // American Journal of Botany. – 2000. – V. 87. – P. 783-792.
154. Govaerts, R. World checklist of seed plants, Vol.2. – Antwerp:Continental publishing, 1996. – 492 p.
155. Guo, Y. P. AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae - Anthemideae) / Y.P. Guo, J. Saukel, R. Mittermayr, F. Ehrendorfer // New Phytologist. – 2005. – T. 166. – №. 1. – C. 273-290.
156. Hamilton, J. A. Population genetic consequences of geographic disjunction: a prairie plant isolated on Great Lakes alvars / J. A. Hamilton, C. G. Eckert // Molecular Ecology. – 2007. – V. 16. – №. 8. – P. 1649-1660.
157. Hammer, O. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis / O. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // Paleontologia Electronica. – 2001. – V.4. – №.1. – P.1-9.
158. Hamrick, J. L. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species/ J. L. Hamrick, M. J. W. Godt // Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 1996. – V. 351. – №. 1345. – P. 1291-1298.

159. Hamrick, J.L. Allozyme diversity in plant species / J.L. Hamrick, M.J.W. Godt In Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources, eds H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir. – Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 1989. – 43–63 p.
160. Hanelt, P. Infrageneric grouping of *Allium* – the Gatersleben approach, in The genus *Allium*: taxonomic problems and genetic resources / P. Hanelt, J. Schulze-Motel, R.M. Fritsch, J. Kruse, H. Maass, H. Ohle, K. Pistrick. Proceedings of an international symposium held at Gatersleben, Germany, 11–13 Jun 1991 / Eds. P. Hanelt et al. – Gatersleben: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, 1992. – P. 107–123.
161. Hannan, G. L. Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae) / G. L. Hannan, M. W. Orick // American Journal of Botany. – 2000. – V. 87. – №. 3. – P. 293-301.
162. Harpke, D. 5.8S motifs for the identification of pseudogenic ITS regions / D. Harpke, A. Peterson // Botany. – 2008. – V. 86. – P. 300–305.
163. Hedrick, P. W. Conservation genetics: techniques and fundamentals / P. W. Hedrick, P. S. Miller // Ecological Applications. – 1992. – V. 2. – №. 1. – P. 30-46.
164. Hellier, B.C. Genetic, morphologic, and habitat diversity of two species of *Allium* native to the Pacific Northwest, USA and their implications for in situ seed collection for the National Plant Germplasm System : дис. / B.C. Hellier– Washington State University, 2000.
165. Herden, T. *Allium ursinum* L. in Germany–surprisingly low genetic variability / T. Herden, B. Neuffer, N. Friesen // Feddes Repertorium. – 2012. – V. 123. – №. 1. – P. 81-95.
166. Hilborn, R. Biocomplexity and fisheries Sustainability / R. Hilborn, Quinn T. P., Schindler D. E., and Rogers D. E. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 11. – P. 6564-6568.
167. Hoban, S. Optimal sampling of seeds from plant populations for ex-situ conservation of genetic biodiversity, considering realistic population structure / S. Hoban, S. Schlarbaum // Biological Conservation. – 2014. – V. 177. – P. 90-99.
168. Holsinger, K. E. The Future of Conservation Biology: What's a Geneticist to Do? / K. E. Holsinger, P. Vitt // The ecological basis of conservation. – 1997. – P. 202-216.
169. Holsinger, K.E. Conservation of rare and endangered plants: Principles and prospects / K.E. Holsinger, L.D. Gottlieb In Genetics and conservation of rare plants, ed. D.A. Falk and K.E. Holsinger. – New York: Oxford University Press, 1991. – 195–208p.
170. Honjo, M. Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species

- Primula sieboldii* / M. Honjo, S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa // Biological Conservation. – 2004. – V. 120. – №. 2. – P. 211-220.
171. Honnay, O. A meta-analysis of the relation between mating system, growth form and genotypic diversity in clonal plant species / O. Honnay, H. Jacquemyn // Evolutionary Ecology. – 2008. – V. 22. – №. 3. – P. 299-312.
 172. Hornemann, G. Reproductive fitness, population size and genetic variation in *Muscari tenuiflorum* (Hyacinthaceae): the role of temporal variation / G. Hornemann, G. Weiss, W. Durka // Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. – 2012. – V. 207. – №. 10. – P. 736-743.
 173. Huang, D. Q. Intraspecific differentiation of *Allium wallichii* (Amaryllidaceae) inferred from chloroplast DNA and internal transcribed spacer fragments / D. Q. Huang, Q. Q. Li, C. J. Zhou, S. D. Zhou, X. J. He // Journal of systematics and evolution. – 2014. – V. 52. – №. 3. – P. 341-354.
 174. Huang, W.D. A combined approach using ISSR and ITS analysis for the characterization of *Artemisia halodendron* from Horqin sandy land, northern China / W.D. Huang, X.Y. Zhao, X. Zhao, H. L. Zhao, S.K. Wang, J. Lian // Biochemical systematics and ecology. – 2011. – V. 39. – P. 346-351.
 175. IUCN Species Programme [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.iucn.org/theme/species/about>
 176. Jakse, J. Single nucleotide polymorphism, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identifications / J. Jakse, W. Martin, J. McCallum, M.J. Havey // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2005. – V.130. – №.6. – P. 912–917.
 177. Jaros, U. Spatial patterns of AFLP diversity in *Bulbophyllum occultum* (Orchidaceae) indicate long-term refugial isolation in Madagascar and long-distance colonization effects in La Réunion / U. Jaros, G. A. Fischer, T. Pailler, H. P. Comes // Heredity. – 2016. – V. 116. – №. 5. – P. 434-446.
 178. Jehan, T. Genetic diversity and genetic relationships in Hyacinthaceae in India using RAPD and SRAP markers / T. Jehan, A. Vashishtha, S. R. Yadav, S. Lakhanpaul // Physiology and Molecular Biology of Plants. – 2014. – V. 20. – №. 1. – P. 103-114.
 179. Jian, S. Genetic variation in the endangered endemic species *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) in China and implications for conservation / S. Jian, Y. Zhong, N. Liu, Z. Gao, Q. Wei, Z. Xie, H. Ren // Biodiversity & Conservation. – 2006. – V. 15. – №. 5. – P. 1681-1694.

180. Jiang, Y. Genetic diversity of *Chimonanthus grammatus* populations determined with inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis: Implications for conservation / Y. Jiang, Y. Li, S. Lu, Y. Liu, J. Peng, D. Zhu // Journal of Medicinal Plants Research. – 2012. – V. 6. – №. 7. – P. 1272-1278.
181. Johansson, M. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*) / M.Johansson, C. R.Primmer, J.Merilae //Molecular Ecology. – 2007. – V. 16. – №. 13. – P. 2693-2700.
182. Johnson, M. A. T. New chromosome numbers in petaloid monocotyledons and in other miscellaneous angiosperms / M.A.T. Johnson, P. E. Brandham // Kew Bulletin. – 1997. – P. 121-138.
183. Johnson, M. A. T. Polyploidy and karyotype variation in Turkish *Bellevallia* (Hyacinthaceae) / M. A. T. Johnson //Botanical Journal of the Linnean Society. – 2003. – V. 143. – №. 1. – P. 87-98.
184. Kalendar, R. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar, T. Grob, M. Regina, A. Suoniemi, A. Schulman // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – V. 98. – №. 5. – P. 704-711.
185. Karron, J. D. Breeding Systems in Rare Plant Species / J. D. Karron In Genetics and conservation of rare plants, ed. D.A. Falk and K.E. Holsinger. – New York: Oxford University Press, 1991. – 87-93p.
186. Karron, J.D. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners / J.D. Karron//Evolutionary Ecology. – 1987. – V.1. – P. 47-58.
187. Kaulfuß, F. Reintroduction of the endangered and endemic plant species *Cochlearia bavarica* – Implications from conservation genetics / F. Kaulfuß, C. Reisch //Ecology and evolution. – 2017. – V. 7. – №. 24. – P. 11100-11112.
188. Keller, L. F. Inbreeding effects in wild populations / L.F. Keller and D.M. Waller // Trends in Ecology & Evolution. – 2002. – V. 17. – №. 5. – P. 230-241.
189. Kesseli, R.V. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers / R.V. Kesseli, I. Paran, R.W. Michelmore // In: Proceeding of the Symposium:Application of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, Minnesota, US, 1992 – p.31-36.
190. Kim, S. Integrative structural annotation of de novo RNA-Seq provides an accurate reference gene set of the enormous genome of the onion (*Allium cepa* L.) / S. Kim, M.S. Kim,

- Y.M Kim., S.I. Yeom, K. Cheong, K.T. Kim, J. Jeon, S. Kim, D.S. Kim, S.H. Sohn, Y.H. Lee, D. Choi // DNA Research. – 2015. – V. 22. – №1. – P. 19-27.
191. Kitner, M. Genetic structure of *Artemisia pancicii* populations inferred from AFLP and cpDNA data / M. Kitner, L. Majesky, L. Gillova, T. Vymyslicky, M. Nagler // Preslia. – 2012. – V.84. – P.97–120.
 192. Klaas, M. Applications and impact of molecular markers on evolutionary and diversity studies in the genus *Allium* / M. Klaas // Plant Breeding. – 1998. – V. 117. – №. 4. – P. 297-308.
 193. Kleynhans, R. Evaluation of genetic variation in *Lachenalia bulbifera* (Hyacinthaceae) using RAPDs / R. Kleynhans, J. J. Spies // Euphytica. – 2000. – V. 115. – №. 2. – P. 141-147.
 194. Konieczny, A. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co - dominant ecotype - specific PCR - based markers / A. Konieczny, F. M. Ausubel // The Plant Journal. – 1993. – V. 4. – №. 2. – P. 403-410.
 195. Konovalov, F.A. Molecular markers based on LTR retrotransposons *BARE-1* and *Jeli* uncover different strata of evolutionary relationships in diploid wheats / F.A.Konovalov, N.P.Goncharov, S.Goryunova, A. Shaturova, T. Proshlyakova, A. Kudryavtsev // Molecular Genetics and Genomics. – 2010. – V.283. – №. 6. – P. 551-563.
 196. Kumar, H. RAPD and ISSR marker-based comparative evaluation of genetic diversity among Indian germplasms of *Euryale ferox*: an aquatic food plant / H. Kumar, P. Priya, N. Singh, M. Kumar, B. K. Choudhary, L. Kumar, I. S. Singh, N. Kumar // Applied biochemistry and biotechnology. – 2016. – V. 180. – №. 7. – P. 1345-1360.
 197. Lacy, R. C. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision / R.C. Lacy // Conservation Biology. – 1987. – V.1. – P.143-158.
 198. Lamont, B. B. Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii*—a demonstration of the allee effect. / B. B. Lamont, P.G.L. Klinkhamer, E.T.F. Witkowski. // Oecologia. – 1993. – V.94. – P.446-450.
 199. Lampasona, S.G. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) / S. G. Lampasona, L. Martinez, J.L. Burba // Euphytica. – 2003. – V. 132. – №. 1. – P. 115-119.
 200. Lande, R. Mutation and conservation / R. Lande // Conservation biology. – 1995. – V. 9. – №. 4. – P. 782-791.
 201. Laurentin, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources / H. Laurentin // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2009. – V. 56. – №. 2. – P. 277-292.

202. Lee, G.A. Cross-amplification of SSR markers developed from *Allium sativum* to other *Allium* species / G. A. Lee, S.J. Kwon, Y.J. Park, M.C. Lee, H.H. Kim, J.S. Lee, S.Y. Lee, J.G. Gwag, C.K. Kim, K.H. Ma // *Scientia Horticulturae*. – 2011. – V.128. – P. 401–407.
203. Leimu, R. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? / R. Leimu, P. Mutikainen, J. Koricheva, M. Fischer // *Journal of Ecology*. – 2006. – V. 94. – P. 942-952.
204. Leimu, R. Population history, mating system, and fitness variation in a perennial herb with a fragmented distribution / R. Leimu, P. Mutikainen // *Conservation Biology*. – 2005. – V.19. – P.349-356.
205. Lewis, P. O. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae) / P. O. Lewis, D. J. Crawford // *American Journal of Botany*. – 1995. – V. 82. – №. 2. – P. 141-149.
206. Li, X. Genetic diversity and population structure of the endangered alpine quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) revealed by SSR analysis / X. L. Li, S. C. Li, H. J. Chu, Z. Z. Li, Y.Y. Chen // *Biochemical systematics and ecology*. – 2013. – V. 47. – P. 11-20.
207. Lienert, J. Isozyme variability of the wetland specialist *Swertia perennis* (Gentianaceae) in relation to habitat size, isolation, and plant fitness / J. Lienert, M. Fischer, J. Schneller, M. Diemer // *American Journal of Botany*. – 2002. – V. 89. – №. 5. – P. 801-811.
208. Linhart, Y. N. Relationships among reproduction, growth rate, and protein heterozygosity in ponderosa pine / Y. N. Linhart, J. B. Mitton. // *American Journal of Botany*. – 1985. – V. 72. – P.181-184.
209. Litt, M. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene / M. Litt, J. Luty // *American journal of human genetics*. – 1989. – V. 44. – №. 3. – P. 397.
210. Loeschcke V. Conservation genetics. V. Loeschcke, J. Tomiuk, S. K. Jain (ed.). – V. 68 – Birkhäuser, 2013. – 442 c.
211. Lombard, V. Genetic distance estimators based on molecular data for plant registration and protection: A review / V. Lombard, P. Dubreuil, C. Dilmann, C. Baril // *Acta Horticulturae*. – 2001. – V.546. - №2. – P. 55-63.
212. Loveless, M. D. Ecological determinants of genetic structure in plant populations / M.D. Loveless, J.L. Hamrick // *Annual review of ecology and systematics*. – 1984. – T. 15. – №. 1. – C. 65-95.
213. Luck, G. W. Population diversity and ecosystem services / G. W. Luck, Daily G. C., and Ehrlich P. R. // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2003. – V. 18. – №. 7. – P. 331-336.

214. Lynch, M. Mutation accumulation and the extinction of small populations / M. Lynch, J. Conery, R. Burger // *The American Naturalist*. – 1995. – V. 146. – №. 4. – P. 489-518.
215. Ma, Y. Conserving plant species with extremely small populations (PSESP) in China / Y. Ma, G. Chen, R. E. Grumbine, Z. Dao, W. Sun, H. Guo // *Biodiversity and Conservation*. – 2013. – V. 22. – №. 3. – P. 803-809.
216. Maes, D. Functional conservation units for the endangered Alcon Blue butterfly *Maculinea alcon* in Belgium (Lepidoptera: Lycaenidae) / D. Maes, W. Vanreusel, W. Talloen, H. Van Dyck // *Biological Conservation*. – 2000. – V. 120. – №. 10. – P. 229-241.
217. Mallor, C. Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers / C. Mallor, M.S. Arnedo-Andrés, A. Garcés-Claver // *Scientia Horticulturae*. – 2014. – V. 170. – P. 24–31.
218. Mantovani, P. Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat / P. Mantovani, G. van der Linden, M. Maccaferri, M. C. Sanguineti, R. Tuberosa // *Genome*. – 2006. – V. 49. – №. 11. – P. 1473-1480.
219. Martin, J. Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* s.l. and related genera (Asteraceae, Anthemideae): implications for subtribe Artemisiinae delimitation / J. Martin, M. Torrell, J. Valles // *Plant Biology*. – 2001. – V. 4. – P. 372-378.
220. Mashayekhi, S. Genetic diversity of *Allium munzii* (Amaryllidaceae), a rare southern California species and implication for its conservation / S. Mashayekhi, J. T. Columbus // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2015. – V. 59. – P. 91-99.
221. Mateu - Andrés, I. Population subdivision and genetic diversity in two narrow endemics of *Antirrhinum* L. / I. Mateu - Andrés, J. G. Segarra - Moragues // *Molecular Ecology*. – 2000. – V. 9. – №. 12. – P. 2081-2087.
222. Mathew, B. A review of *Allium* section *Allium* / B. Mathew. – Kew: Royal Botanic Gardens, 1996. – 176 p.
223. McArthur E. D., Plummer A. P. Biogeography and management of native western shrubs: a case study, section Tridentatae of *Artemisia* // *Great Basin Naturalist Memoirs*. – 1978. – P. 229-243.
224. McCallum, J. Genetic diversity analysis and single-nucleotide polymorphism marker development in cultivated bulb onion based on expressed sequence tag – simple sequence repeat markers / J. McCallum, S. Thomson, M. Pither-Joyce, F. Kenel // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2008. – V. 133. – №. 6. – P. 810–818
225. Melnikova, N.V. The *FaRE1* LTR-retrotransposon based SSAP markers reveal genetic polymorphism of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars / N.V. Melnikova, A.V.

- Kudryavtseva, A.S. Speranskaya, A. A. Krinitsina, A. A. Dmitriev, M. S. Belenikin, V.P. Upelnik, E.R. Batrak, I.S. Kovaleva, A. M. Kudryavtsev // Journal of Agricultural Science. – 2012. – V. 4. – №. 11. – P. 111-118.
226. Menges, E. S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species / Menges, E. S. // Conservation Biology. – 1991. – V. 5. – P. 158-164.
227. Meyers, B. C. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide - binding superfamily / B. C., Meyers, A. W. Dickerman, R. W. Michelmore, S. Sivaramakrishnan, B. W. Sobral, N. D. Young // The Plant Journal. – 1999. – V. 20. – №. 3. – P. 317-332.
228. Millar, C. I., and W. J. Libby. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species / Millar, C. I., and W. J. Libby. in Genetics and conservation of rare plants. Eds. D.A. Falk, K.A., Holsinger – New York: Oxford University Press, 1991. – 149-170 pp.
229. Moritz, C. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review / C. Moritz // Molecular Ecology. – 1994. – V. 3. – №. 4. – P. 401-411.
230. Mucciarelli, M. Genetic variability and population divergence in the rare *Fritillaria tubiformis* subsp. *moggridgei* Rix (Liliaceae) as revealed by RAPD analysis / M. Mucciarelli, D. Ferrazzini, P. Belletti // PLoS one. – 2014. – V. 9. – №. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101967>
231. Mueller, U. G. AFLP genotyping and fingerprinting / U. G. Mueller, L. L. R. Wolfenbarger // Trends in Ecology & Evolution. – 1999. – V. 14. – №. 10. – P. 389-394.
232. Mukherjee, A. RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus *Allium* (Alliaceae) / A. Mukherjee, B. Sikdar, B. Ghosh, A. Banerjee, E. Ghosh, M. Bhattacharya, S.C. Roy // Turkish Journal of Botany. – 2013. – V. 37. – №. 4. – P. 605-618.
233. Müller, K. F. Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: contrasting *matK*, *trnT-F*, and *rbcL* in basal angiosperms / K. F. Müller, T. Borsch, K. W. Hilu // Molecular phylogenetics and evolution. – 2006. – V. 41. – №. 1. – P. 99-117.
234. Nagaoka, T. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers / T. Nagaoka, Y. Ogihara // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – V. 94. – P. 597-602.
235. Nair, V. D. Assessment of diversity among populations of *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. from Southern Western Ghats of India, based on chemical profiling, horticultural

- traits and RAPD analysis / V. D. Nair, R. P. D. Raj, R. Panneerselvam, R. Gopi // *Fitoterapia*. – 2014. – V. 92. – P. 46-60.
236. Neel, M. C. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae) / M. C. Neel, Ellstrand N. C. // *Conservation Genetics*. – 2003. – V. 4. – №. 3. – P. 337-352.
237. Newton, A. C. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species / A. C. Newton, T. R. Allnutt, A. C. M. Gillies, A. J. Lowe, R. A. Ennos // *Trends in Ecology & Evolution*. – 1999. – V. 14. – №. 4. – P. 140-145.
238. Nguyen, H.T. Molecular Marker Systems for Genetic Mapping / H.T. Nguyen, X. Wu In: “The Handbook of Plant Genome Mapping. Genetic and Physical Mapping”. Eds.: K. Meksem and G. Kahl – Weinheim: Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. – 380 p.
239. Nguyen, N. H. A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; Alliaceae) with a focus on the western North American center of diversity / N. H. Nguyen, H. E. Driscoll, C. D. Specht // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2008. – V. 47. – №. 3. – P. 1157-1172.
240. Nybom, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants / H. Nybom // *Molecular ecology*. – 2004. – V. 13. – №. 5. – P. 1143-1155.
241. O'Grady, J.J. What are the best correlates of predicted extinction risk? / J.J. O'Grady, D.H. Reed, B.W. Brook // *Biological Conservation*. – 2004. – V.118. – P.513-520.
242. Olson, M. A common language for physical mapping of the human genome / M. Olson, L. Hood, C. Cantor, D. Botstein // *Science*. – 1989. – V. 245. – №. 4925. – P. 1434-1435.
243. Oostermeijer, J.G.B. Analysis of the relationship between allozyme heterozygosity and fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe* L. / J.G.B. Oostermeijer, N. C. Van Leeuwen, H. C. M. Den Nijs // *Journal of Evolutionary Biology*. – 1995. – V. 8. – P. 739-757.
244. Ouborg, N. J. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants / N. J. Ouborg, P. Vergeer, C. Mix // *Journal of Ecology*. – 2006. – V.94. – P.1233-1248.
245. Özhatay, N. A new hexaploid *Bellevia* (Hyacinthaceae) from European Turkey / N. Özhatay, M. A. Johnson, B. Mathew, G. Dalgıç // *Botanical Journal of the Linnean Society*. – 1991. – V. 107. – №. 1. – P. 89-99.
246. Özhatay, N. Some karyological remarks on Turkish *Allium* sect. *Allium*, *Bellevia*, *Muscari* and *Ornithogalum* subg. *Ornithogalum* / N. Özhatay, M.A.T. Johnson // *Bocconeia*. – 1996. – V. 5. – №. 1. – P. 239-249.
247. Paniego, N. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / N. Paniego, M. Echaide, M. Muñoz, L. Fernández, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan,

- M. Carrera, R. Zandomeni, E.Y. Suárez, H. E. Hopp //Genome. – 2002. – V. 45. – №. 1. – P. 34-43.
248. Peakall, R. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – V.28. – №.19. – P.2537–2539.
249. Pearce, S. R. Rapid isolation of plant *Ty1 - copia* group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies / S. R. Pearce, C. Stuart-Rogers, M. R. Knox, A. Kumar, T. H. Ellis, A. J. Flavell // The Plant Journal. – 1999. – V. 19. – №. 6. – P. 711-717.
250. Pepper, A.E. Evolution of *Caulanthus amplexicaulis* var. *barbarae* (Brassicaceae), a rare serpentine endemic plant: a molecular phylogenetic perspective / A.E. Pepper, L.E. Norwood // American Journal of Botany. – 2001. – V.88. – №.8. – P.1479-1489.
251. Perez-Collazos, E. Two approaches for the selection of Relevant Genetic Units for Conservation in the narrow European endemic steppe plant *Boleum asperum* (Brassicaceae) / E. Perez-Collazos, J. G. Segarra-Moragues, P.Catalan //Biological journal of the Linnean Society. – 2008. – V. 94. – №. 2. – P. 341-354.
252. Peruzzi, L. Chromosome diversity and evolution in *Allium* (Allioideae, Amaryllidaceae) / L. Peruzzi, A. Carta, F. Altinordu //Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. – 2017. – V. 151. – №. 2. – P. 212-220.
253. Pfosser, M. Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences / M. Pfosser, F. Speta //Annals of the Missouri Botanical Garden. – 1999. – P. 852-875.
254. Phillips, N.C. Detection of genetic variation in wild populations of three *Allium* species using amplified fragment length polymorphisms / N.C. Phillips, S.R. Larson, D.T. Drost //HortScience. – 2008. – V. 43. – №. 3. – P. 637-643.
255. Poljakov, P. Materials and systematics, the genus *Artemisia* L. / P. Poljakov // Trudy Inst Bot Alma-Ata. – 1961. – V.11. – P.134-177.
256. Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – V.155. – №.2. – P.945–959.
257. Prohens, J. Genetic diversity and conservation of two endangered eggplant relatives (*Solanum vespertilio* Aiton and *Solanum lidii* Sunding) endemic to the Canary Islands / J. Prohens, G. J. Anderson, F. J. Herraiz, G. Bernardello, A. Santos-Guerra, D. Crawford, F. Nuez //Genetic Resources and Crop Evolution. – 2007. – V. 54. – №. 3. – P. 451-464.
258. Puchooa, D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) / D. Puchooa // African Journal of Biotechnology. – 2004. – V. 3. – №. 4. – P. 253-255.

259. Putz, C.M. Living in isolation–population structure, reproduction, and genetic variation of the endangered plant species *Dianthus gratianopolitanus* (Cheddar pink) / C.M. Putz, C. Schmid, C. Reisch // *Ecology and evolution*. – 2015. – T. 5. – №. 17. – C. 3610-3621.
260. Qiu, Y. X. Population structure and genetic diversity of *Dysosma versipellis* (Berberidaceae), a rare endemic from China / Y. X. Qiu, J. H. Li, H. L. Liu, Y. Y. Chen, C. X. Fu // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2006. – V. 34. – №. 10. – P. 745-752.
261. Raji, J. Population genetic structure of rare and endangered plants using molecular markers / J. Raji, C. T. Atkinson – Hilo: Hawai'i Cooperative Studies Unit, University of Hawai'i, 2013. – 42 p.
262. Reed, D. H. Correlation between fitness and genetic diversity / D. H. Reed, R. Frankham // *Conservation biology*. – 2003. – V. 17. – №. 1. – P. 230-237.
263. Reza, B. The study of genetic diversity in different plant populations of *Artemisia Annua* L. native to northern Iran by molecular marker AFLP / B. Reza, N.M. Reza, O. Mansoor, T. Sepide, R. Shamsali, H.A. Farhad, S.A. Mehdi, B.S. Baharak, P. Saeed, S.K.M. Bagher // *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. – 2016. – V.9. – №.2. – P.51-59.
264. Riddler, B.R. Species as units of analysis in ecology and biogeography: time to take the blinders off / B. R. Riddler, D. J. Hafner // *Global Ecology Biogeography*. – 1999. – V. 8. – №. 6. – P. 433-441.
265. Ruiz - Sanchez, E. Influence of the geological history of the Trans - Mexican Volcanic Belt on the diversification of *Nolina parviflora* (Asparagaceae: Nolinoideae) / E. Ruiz - Sanchez, C.D. Specht // *Journal of Biogeography*. – 2013. – V. 40. – №. 7. – P. 1336-1347.
266. Rustaiee, A. R. Evaluation of genetic diversity among some populations of *Thymus daenensis* Celak., a vulnerable medicinal plant from Iran / A. R. Rustaiee, M. E. Hassani, S. M. F. Tabatabaei, R. Omidbaigi // *HORTICULTURE ENVIRONMENT and BIOTECHNOLOGY*. – 2010. – V. 51. – №. 4. – P. 335-342.
267. Ryder, O.A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies / O.A. Ryder // *Trends in Ecology and Evolution*. – 1986. – V. 1. – P. 9-10.
268. Sanz, M. Southern isolation and northern long-distance dispersal shaped the phylogeography of the widespread, but highly disjunct, European high mountain plant *Artemisia eriantha* (Asteraceae) / M. Sanz, P. Schönswetter, J. Vallès, G.M. Schneeweiss, R. Vilatersana // *Botanical Journal of the Linnean Society*. – 2014. – V. 174. – №. 2. – P. 214-226.

269. Saraste, M. The *P*-loop—a common motif in ATP-and GTP-binding proteins / M. Saraste, P. R. Sibbald, A. Wittinghofer // Trends in biochemical sciences. – 1990. – T. 15. – №. 11. – C. 430-434.
270. Seberg, O. Phylogeny of the Asparagales based on three plastid and two mitochondrial genes / O. Seberg, G. Petersen, J. I. Davis, J. C. Pires, D. W. Stevenson, M. W. Chase, M.F. Fay, D.S. Devey, T. Jorgensen, K.J. Sytsma, Y. Pillon // American Journal of Botany. – 2012. – V. 99. – №. 5. – P. 875-889.
271. Sedcenco, M. The conservation of species *Bellevia sarmatica* (Georgi) Woronov by the vitroculture method / M. Sedcenco, N. Ciorchina, D. Clapa, A. Fira / Journal of Plant Development. – 2011. – №. 18. – C. 11-15.
272. Segarra - Moragues, J. G. On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management / J. G. Segarra - Moragues, M. Palop - Esteban, F. González - Candelas, P. Catalán // Molecular Ecology. – 2005. – V. 14. – №. 4. – P. 969-982.
273. Shafie, M.S.B. RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia / M.S.B. Shafie, S.M.Z. Hasan, A.M. Zain, R.M. Shah // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. – V. 5. – №. 18. – P. 4426-4451.
274. Shafie, M.S.B. Study of genetic variability of Wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang region, Malaysia / M.S.B. Shafie, S.M.Z. Hasan, R.M. Shah // Plant Omics. – 2009. – V. 2. – №. 3. – P. 127.
275. Shaw, J. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III / J. Shaw, E.B. Lickey, E.E. Schilling, R.L. Small // Am. J. of Bot. – 2007. – V. 94. – №3. – P. 275-288.
276. Shaw, J. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis / J. Shaw, E. Lickey, J.T. Beck, S.B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling, R.L. Small // Am. J. of Bot. – 2005. – V. 92. – P. 142-166.
277. Smith, J.F. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae) / J.F. Smith and V.T. Pham // American Journal of Botany. – 1996. – V. 83. – № 6. – P.717–726.
278. Smýkal, P. Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers / P., Smýkal, J. Horáček, R. Dostálová, M.Hýbl, // Journal of applied genetics. – 2008. – V. 49. – №. 2. – P. 155-166.

279. Soltis, D. E. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications / D. E. Soltis, P. S. Soltis, B. G. Milligan In Molecular systematics of plants, Eds. S.Soltis, E. Douglas, E. Soltis, J.J. Doyle – Boston: Springer, Boston, MA, 1992. – P. 117-150.
280. Son, J.H. Species relationships among *Allium* species by ISSR analysis / J. H. Son, K.C. Park, S.I. Lee, J.H. Kim, N. S. Kim //Horticulture, Environment, and Biotechnology. – 2012. – V. 53. – №. 3. – P. 256-262.
281. Soule, M. E. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. in Soulé, M. E. and B. M. Wilcox, eds. Conservation Biology: an Evolutionary–Ecological Perspective. Sinauer, Sunderland, MA. 1980. Pp. 151–170
282. Soule, M.E. What do genetic and ecology tell us about the design of nature reserves? / M.E. Soule, D.S. Simberloff // Biology Conservation. – 1986. – V. 35. – P. 19-40.
283. Speta, F. Hyacinthaceae / F. Speta In: The families and genera of vascular plants, K. Kubitzki ed. – Berlin Heidelberg: Springer,1998. – p.261–285.
284. Stanford, A. M. Population genetics and reintroduction performance of *Solanum conocarpum*, an endemic shrub of St. John, US Virgin Islands / A. M. Stanford, G. J. Ray, V. Forbes, L. Y.Mustafa, // Caribbean journal of science. – 2013. – V. 47. – №. 2–3. – P. 173-180.
285. Su, Z. Genetic diversity and structure of an endangered desert shrub and the implications for conservation / Z. Su, B. A. Richardson, L. Zhuo, X. Jiang, W. Li, X. Kang //AoB Plants. – 2017. – V. 9. – №. 3. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx016>
286. Sun, X. D. De novo assembly and characterization of the Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) transcriptome using Illumina technology / X. D. Sun, X. H. Yu, S. M. Zhou, S. Q. Liu //Molecular genetics and genomics. – 2016. – T. 291. – №. 2. – C. 647-659.
287. Sun, X. De novo assembly and characterization of the garlic (*Allium sativum*) bud transcriptome by Illumina sequencing / X. Sun, S. Zhou, F. Meng, S. Liu // Plant Cell Rep. – 2012. – V. 31. – №10. – P. 1823-1828.
288. Szczecińska, M. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe / M. Szczecińska, G. Sramko, K. Wołosz, Sawicki J. //PloS one. – 2016. – V. 11. – №. 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>
289. Tam, S. M. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR / S. M. Tam, C. Mhiri, A. Vogelaar, M. Kerkveld, S. R. Pearce, M. A. Grandbastien // Theoretical and Applied Genetics. – 2005. – V. 110. – № 5. – P. 819-831.

290. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // Mol Biol Evol. – 2013. – V.30 – P. 2725-2729.
291. The IUCN Red List of Threatened Species [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.iucnredlist.org/>
292. Torrell, M. Cytogenetic and isozymic characterization of the narrow endemic species *Artemisia molinieri* (Asteraceae, Anthemideae): implications for its systematics and conservation / M. Torrell, M. Bosch, J. Martín, J. Vallès // Canadian journal of botany. – 1999. – T. 77. – №. 1. – С. 51-60.
293. Torres, E. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis / E. Torres, J. M. Iriondo, C. Pérez // American Journal of Botany. – 2003. – V. 90. – №. 1. – P. 85-92.
294. Traub, H. The subgenera, sections and subsections of *Allium* L. / H. Traub // Plant Life. – 1968. – Vol.24. – P. 147–163.
295. Valles, J. *Artemisia* systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights / J. Valles, E.D. McArthur // USDA Forest Service Proceedings. – 2001. – V. 21. – P. 67-74.
296. van der Linden, C. G. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling / C. G. van der Linden, D. C. Wouters, V. Mihalka, E. Z. Kochieva, M. J. Smulders, B. Vosman // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – V. 109. – №. 2. – P. 384-393.
297. van Heusden, A.W. AFLP linkage group assignment to the chromosomes of *Allium cepa* L. via monosomic addition lines / A. W. Van Heusden, M. Shigyo, Y. Tashiro, R. Vrielink-van Ginkel, C. Kik // Theoretical and applied genetics. – 2000. – V. 100. – №. 3-4. – P. 480-486.
298. Vandepitte, K. Conservation genetics of an endemic from the Mediterranean Basin: high genetic differentiation but no genetic diversity loss from the last populations of the Sicilian Grape Hyacinth *Leopoldia gussonei* / K. Vandepitte, A. S. Gristina, R. De Raedt, I. Roldàn-Ruiz, C. Marcenò, S. Sciandrello, O. Honnay // Conservation genetics. – 2013. – V. 14. – №. 5. – P. 963-972.
299. Vasseur, L. Allozymic diversity of *Allium tricoccum* (Ait.) Solander var. *burdickii* Hanes in isolated populations of Nova Scotia (Canada) / L. Vasseur // Plant Systematics and Evolution. – 2001. – V. 228. – №. 1-2. – P. 71-79.
300. Voipio, P. Evolution at the population level with special reference to game animals and practical game management/ Voipio, P. // Papers on Game Research (Helsinki). – 1950. – V. 5. – P. 1–175.

301. von Bothmer, R. The *Allium Ampeloprasum* complex on Crete / R. von Bothmer // Mitt. Bot. Munchen. – 1974. – V.12. – P.267-288.
302. von Kohn, C.M. Sequencing and annotation of the chloroplast DNAs of normal (N) male-fertile and male-sterile (S) cytoplasms of onion and single nucleotide polymorphisms distinguishing these cytoplasms / C.M. von Kohn, A. Kielkowska, M.J. Havey // Genome. – 2013. – V. 56. – №12. – P. 737-742.
303. Vos, P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, et al. // Nucleic Acids Research.— 1995. — V. 23. —№. 21. — P. 4407-4414.
304. Walisch, T. J. Divergent selection along climatic gradients in a rare central European endemic species, *Saxifraga sponhemica* / T. J. Walisch, G. Colling, M. Bodenseh, D. Matthies //Annals of botany. – 2015. – V. 115. – №. 7. – P. 1177-1190.
305. Wan, T. Analysis of genetic diversity of *Artemisia frigida* populations by RAPD in different synusiologic area of Inner Mongolia / T. Wan, P. Cai, C.B. Zhang, W.D. YI, F.Z. LI, H.B. Zhang //Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition). – 2008. – T. 36. – C. 166-169.
306. Wang, A. Genetic diversity of *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), an endangered species on Qinghai-Tibetan Plateau / A. Wang, W. Li // Biochemical Systematics and Ecology. – 2016. – V. 69. – P. 132-137.
307. Watson, L.E. Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera / L. E. Watson, P. L. Bates, T. M. Evans, M. M. Unwin, J. R. Estes //BMC Evolutionary Biology. – 2002. – V. 2. – P. 17-29.
308. Waugh, R. Genetic distribution of *Bare-1-like* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // R. Waugh, K. McLean, A. J. Flavell, S. R. Pearce, A. Kumar, B. B. T. Thomas, W. Powell // Molecular and General Genetics. – 1997. – V. 253. – № 6. – P. 687-694.
309. Wendelbo, P. Notes on *Hyacinthus* and *Bellevalia* (Liliaceae) in Turkey and Iran / P. Wendelbo // Notes Royal Botanical Garden Edinburgh. – 1980. – V.38. – P.423–434.
310. White, G. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species / G. White, W. Powell //Molecular Ecology. – 1997. – V. 6. – №. 9. – P. 851-860.
311. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor // PCR Protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – Ch. 38. – P. 315-322.

312. Whiteley, A. R. Genetic rescue to the rescue. / A. R. Whiteley, S. W. Fitzpatrick, W. C. Funk, D. A. Tallmon // Trends in ecology & evolution. – 2015. – V. 30. – №. 1. – P. 42-49.
313. Widen, B. Demographic and genetic effects on reproduction as related to population size in a rare, perennial herb, *Senecio integrifolius* / Widen, B. // Biological Journal of the Linnean Society. – 1993. – V.50. – P.179-195.
314. Williams, J. G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey // Nucleic acids research. – 1990. – V. 18. – №. 22. – P. 6531-6535.
315. Wright, S. Evolution in Mendelian Populations / S. Wright // Genetics. –1931. – V.16.– P.97-159.
316. Xia, T. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae) / T. Xia, S. Chen, S. Chen, D. Zhang, D. Zhang, Q. Gao, X. Ge //Biochemical systematics and Ecology. – 2007. – V. 35. – №. 4. – P. 209-214.
317. Xiao, L. High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: Incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes / L. Xiao, M. Muller, H. Zhu // Mol. Phylogenet. Evol. 2010. V. 55. P. 168–177.
318. Yang, H. Genetic diversity and population structure of the endangered medicinal plant *Phellodendron amurense* in China revealed by SSR markers / H. Yang, X. Li, D. Liu, X. Chen, F. Li, X. Qi, Z. Luo, C. Wang//Biochemical systematics and ecology. – 2016. – V. 66. – P. 286-292.
319. Yang, J. Genetic diversity and conservation evaluation of a critically endangered endemic maple, *Acer yangbiense*, analyzed using microsatellite markers /J. Yang, L. L. Zhao, J. B. Yang, W. B. Sun // Biochemical systematics and ecology. – 2015. – V. 60. – P. 193-198.
320. Yeh, F.C. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / F.C. Yeh, T.J.B. Boyle // Belgian Journal of Botany. – 1997. – V.129. – P.157.
321. Young, A.G. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations / A.G. Young, H.G. Merriam, and S.I. Warwick, // Heredity. –1993. – V.71.– P.227-289.
322. Young, A.G. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants / A.G. Young, T. Boyle, T. Brown // Trends in Ecology and Evolution. –1996. – V.11. – №10. – P.413-418.
323. Yu, Y. Genetic variability and population structure of *Disanthus cercidifolius* subsp. *longipes* (Hamamelidaceae) based on AFLP analysis / Y. Yu, Q. Fan, R. Shen, W. Guo, J. Jin,

- D. Cui, W. Liao //PloS one. – 2014. – V. 9. – №. 9. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107769>
324. Zhang, Z. Y. Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers / Z. Y. Zhang, Y. Y. Chen, D. Z. Li //Biochemical genetics. – 2005. – V. 43. – №. 5-6. – P. 239-249.
325. Zhang, T.Y. Polymorphic microsatellite markers for *Allium mongolicum* Regel (Amaryllidaceae) / T.Y. Zhang, H.K. Chen, C.R Zhang. //Genes & genetic systems. – 2014. – T. 89. – №. 3. – C. 133-136.
326. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – V. 20. – №. 2. – P. 176-183.
327. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction / Zuker M // Nucl. Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 3406–3415.

Приложения

Приложение 1

Последовательности праймеров, использованных в работе

Праймер	Последовательность 5' – 3'	T _{отж} °C
RAPD-праймеры		
OPA03	AGTCAGCCAC	37
OPD01	ACCGCGAAGG	37
OPD02	GGACCCAACC	37
OPD03	GTCGCCGTCA	37
OPD06	ACCTGAACGG	37
OPD12	CACCGTATCC	37
OPE05	TCAGGGAGGT	37
OPE06	AAGACCCCTC	37
OPE09	CTTCACCCGA	37
OPK04	CCGCCCAAAC	37
OPK09	CCCTACCGAC	37
OPK10	GTGCAACGTG	37
OPN13	AGCGTCACTC	37
OPN15	CAGCGACTGT	37
OPN19	GTCCGTA CTG	37
ISSR-праймеры		
UBC807	(AG) ₈ T	45
UBC810	(GA) ₈ T	45
UBC811	(GA) ₈ C	50
UBC826	(AC) ₈ C	50
UBC841	(GA) ₈ YC	50
UBC873	(GACA) ₄	45
AFLP-праймеры/адаптеры		
<i>EcoRI_adapter_top</i>	CTCGTAGACTGCGTACC	
<i>EcoRI_adapter_low</i>	AATTGGTACGCAGTCTAC	
<i>MseI_adapter_top</i>	GACGATGAGTCCTGAG	
<i>MseI_adapter_low</i>	TACTCAGGACTCAT	
E ₀₁	GACTGCGTACCAATTCA <u>A</u>	56
M ₀₂	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>C</u>	56
E ₃₂	GACTGCGTACCAATTCAAC <u>A</u>	56
E ₃₅	GACTGCGTACCAATTCA <u>CA</u>	56
E ₃₇	GACTGCGTACCAATTCA <u>CG</u>	56
E ₃₈	GACTGCGTACCAATTCA <u>CT</u>	56
M ₅₀	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AT</u>	56
M ₅₂	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CC</u>	56
M ₅₅	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>GA</u>	56
M _{55g}	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>GA</u> G	56
M _{55t}	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>GA</u> T	56
M ₆₀	GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CTC</u>	56

NBS-праймеры/адаптеры		
Адаптер long arm	ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA	
Адаптер short arm	TGGGATCTATACTT- (амино группа)	
Адаптерный праймер	GTTTACTCGATTCTCAACCCGAAAG	
NBS2	GTWGYTTTICCYRAICCISSCAT	59
NBS3	GTWGYTTTICCYRAICCIIGGCATICC	63
NBS5	YYTKRTHGTMITKGATGATGTITGG	63
NBS7	ATTGTTGGRATGGGMGGIMTIGG	62
NBS9	TGTGGAGGRTTACCTCTAGC	59
Праймеры для амплификации отдельных участков ядерной и хлоропластной ДНК		
ITS4 ¹	TCCTCCGCTTATTGATATGC	59
ITS5 ¹	TCGTAACAAGGTTCCCGTAGGTG	59
ndhJ ²	ATGCCYGAAAGTTGGATAGG	55
trnL(TabE) ²	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	55
trnC ³	CCAGTTCRAATCYGGGTG	59
petN (ycf6) ³	GCCCAAGCRAGACTTACTATATCCAT	59

¹ праймеры для амплификации участка ITS1-5.8S-ITS2

² праймеры для амплификации участка *ndhJ-trnL*

³ праймеры для амплификации участка *trnC-PetN*

Количество фрагментов, полученных с помощью используемых праймеров при анализе
B. sarmatica

Праймер	Число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	% полиморфных локусов
RAPD-праймеры			
OPA03	18	18	100
OPD01	20	18	90
OPD02	8	8	100
OPD03	17	17	100
OPD06	14	14	100
OPD12	17	17	100
OPE05	12	12	100
OPK09	15	15	100
OPK10	13	11	84,6
OPN13	9	9	100
OPN15	16	16	100
OPN19	16	16	100
Всего	175	171	97,7
Среднее значение	14,6	14,3	
ISSR-праймеры			
UBC807	14	10	71,4
UBC810	15	12	80
UBC811	16	13	81,3
UBC826	12	11	91,7
UBC841	17	13	76,5
UBC873	13	10	76,9
Всего	87	69	68,9
Среднее значение	14,5	11,5	
Комбинации AFLP-праймеров			
E ₃₂ /M ₅₂	52	48	92,31
E ₃₅ /M ₅₂	46	40	86,96
E ₃₅ /M ₅₅	45	43	95,56
Всего	143	131	91,6
Среднее значение	47,67	43,67	
Комбинации NBS-праймеров			
NBS2/Tru1I	178	175	98,3
NBS3/Tru1I	60	53	88,3
Всего	238	228	95,8
Среднее значение	119	114	

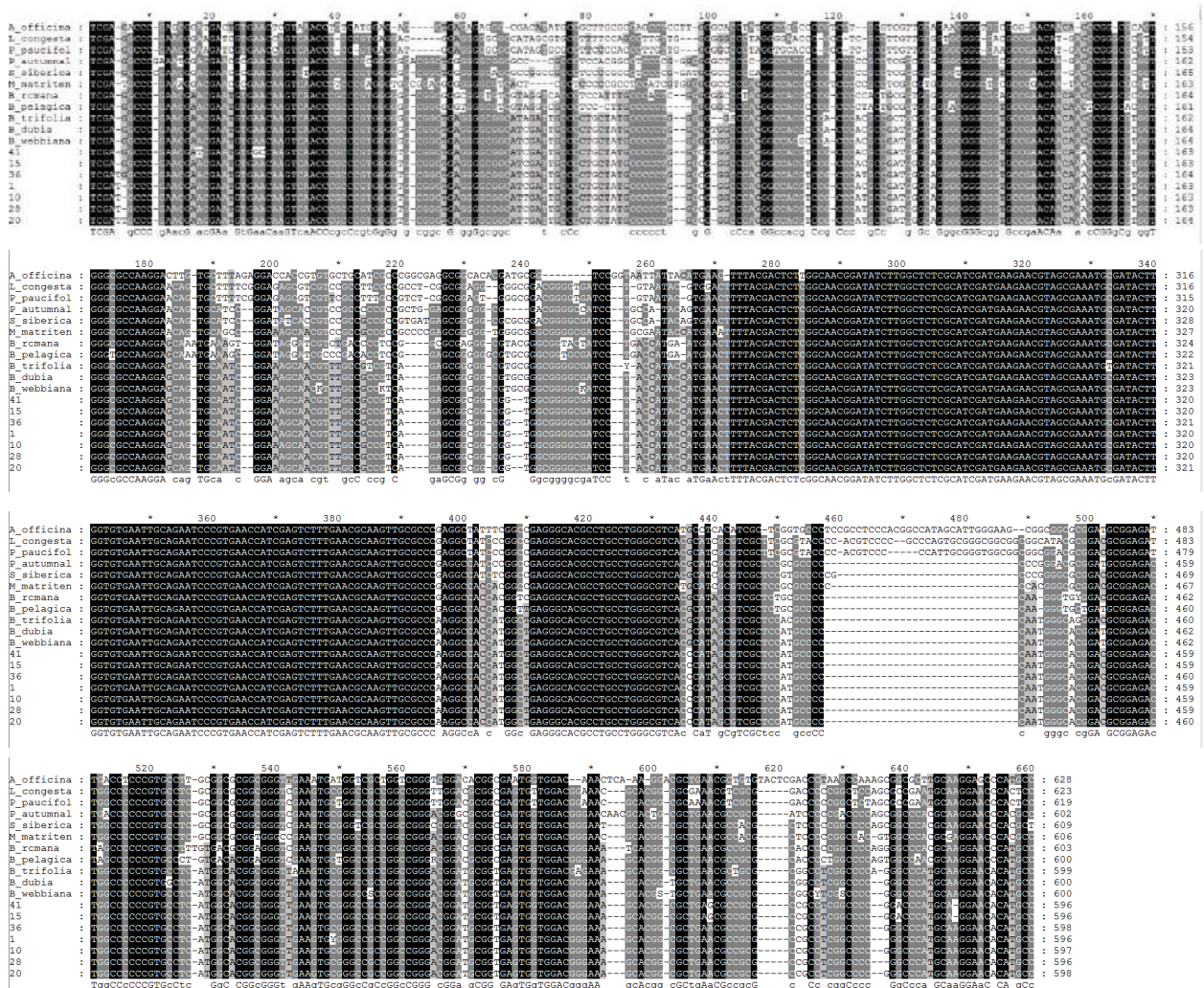
Количество фрагментов, полученных с помощью используемых праймеров при анализе
A. regelianum

Праймер	Число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	% полиморфных локусов
RAPD-праймеры			
OPD06	15	11	73,3
OPD12	13	10	76,9
OPE05	12	8	66,7
OPE06	22	15	68,2
OPK09	10	9	90
OPK10	16	16	100
OPN15	15	10	66,7
OPN19	17	12	70,6
Всего	120	91	75,8
Среднее значение	15	11,4	
ISSR-праймеры			
UBC807	17	13	76,5
UBC810	20	16	80,0
UBC811	17	15	88,2
UBC826	18	12	66,7
UBC841	22	18	81,8
UBC873	15	13	86,7
Всего	109	87	79,8
Среднее значение	18,2	14,5	79,9
Комбинации AFLP-праймеров			
E ₃₇ /M ₅₂	81	70	86,4
E ₃₈ /M ₅₂	85	68	80,0
E ₃₈ /M _{55g}	49	40	81,6
E ₃₈ /M _{55t}	54	48	88,9
E ₃₈ /M ₆₀	64	42	65,6
Всего	333	268	80,5
Среднее значение	66,6	53,6	
Комбинации NBS-праймеров			
NBS2	67	33	49
NBS3	66	33	50
NBS5	56	16	29
NBS9	61	23	38
NBS7			
Всего	250	105	
Среднее значение	62,5	26,3	42

Количество фрагментов, полученных с помощью используемых праймеров при изучении
A. hololeuca

Праймер	Число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	% полиморфных локусов
RAPD-праймеры			
OPD06	15	10	66,7
OPE06	14	8	57,1
OPE09	14	11	78,6
OPK04	13	10	76,9
OPK09	15	13	86,7
OPK10	13	11	84,6
OPN15	20	19	95,0
OPN19	14	11	78,6
Всего	118	93	78,8
Среднее значение	14,8	11,6	
ISSR-праймеры			
UBC807	18	14	77,78
UBC810	23	20	86,96
UBC811	18	17	94,44
UBC826	19	14	73,68
UBC841	24	21	87,50
UBC873	17	16	94,12
Всего	119	102	85,71
Среднее значение	19,83	17	
Комбинации AFLP-праймеров			
E ₃₅ /M ₅₀	58	50	86,21
E ₃₅ /M ₅₂	65	60	92,31
E ₃₅ /M ₅₅	55	41	74,55
E ₃₈ /M ₆₀	50	47	94,00
Всего	223	198	88,79
Среднее значение	55,75	49,5	

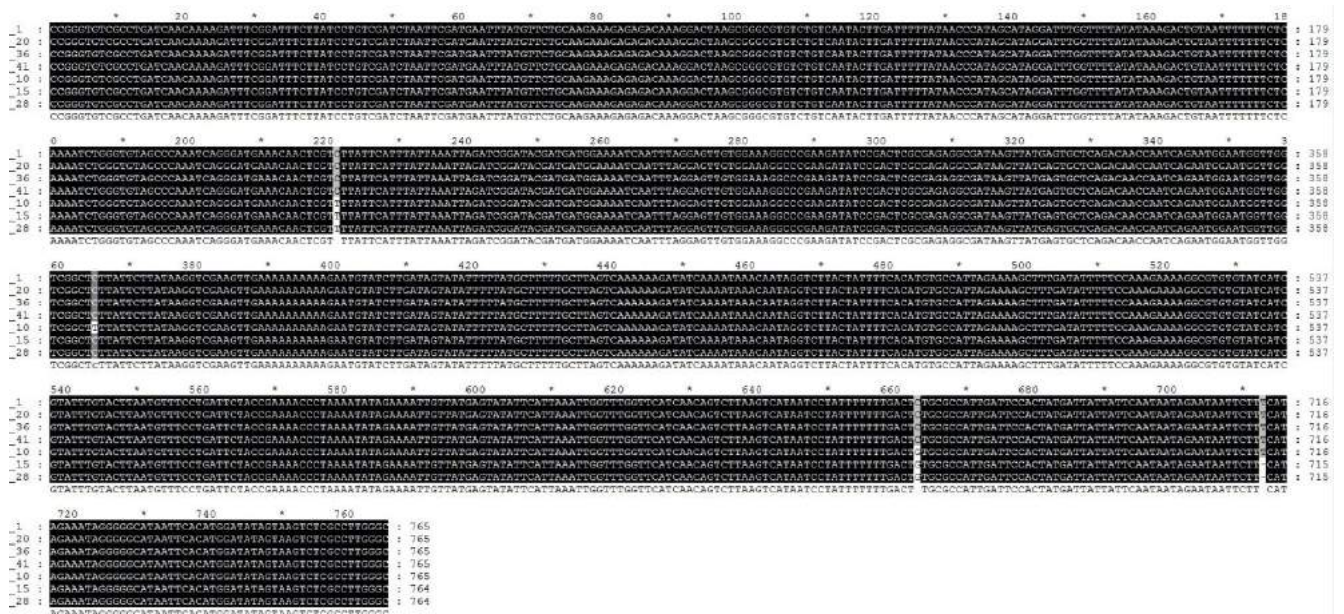
Выравнивание последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 анализируемых видов Scilloideae



Соответствие номеров на рисунке и анализируемых образцов:

- 1 – образец из популяции *B.sarmatica* Клетского р-на;
- 10, 15 – образцы *B.sarmatica* из популяции Серафимовичского р-на;
- 20 – образец *B.sarmatica* из популяции Кумылженского р-на;
- 28 – образец *B.sarmatica* из популяции Сурувикинского р-на;
- 36, 41 – образец *B.sarmatica* из популяции Калачевского р-на.

Выравнивание последовательностей *trnC-petN* анализируемых образцов *B.sarmatica*



Соответствие номеров на рисунке и анализируемых образцов:

1 – образец из популяции *B.sarmatica* Клетского р-на;

10, 15 – образцы *B.sarmatica* из популяции Серафимовичского р-на;

20 – образец *B.sarmatica* из популяции Кумылженского р-на;

28 – образец *B.sarmatica* из популяции Суровикинского р-на;

36, 41 – образец *B.sarmatica* из популяции Калачевского р-на.

ndhJ-trnL

[illegible]

1 – образец из популяции *B.sarmatica* Клетского р-на;

20 – образец *B.sarmatica* из популяции Кумылженского р-на;

36, 41 – образец *B.sarmatica* из популяции Калачевского р-на

Выравнивание последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 анализируемых образцов *A. regelianum* и родственных видов *Allium*

[illegible]

Соответствие номеров на рисунке и анализируемых образцов:

03-43-0193, 03-27-0001 – образцы *A. ampeloprasum*;

1, 4 – образцы *A. regelianum* из Быковского р-на, лиман Тажи;

11, 21 – образцы *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Хреноватый;

30 – образец *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Медвежий;

41 – образец *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Богатырев;

43 – образец *A. regelianum* из Иловлинского р-на, хутор Ерецкий;

44 – образец *A. regelianum* из Фроловского р-на, хутор Выездинский;

70, 77 – образцы *A. regelianum* из Серафимовичского р-на, хутор Красноярский;

79 – образец *A. regelianum* из Серафимовичского р-на, хутор Буерак-Поповский;

91 – образец *A. regelianum* из Алексеевского р-на, станция Усть-Бузулукская;

74Kirgiz – образец *A. sativum*;

2520 – образец *A. atrovioleaceum*;

5646 – образец *A. baeticum*;

1662 – образец *A. commutatum*;

6234 – образец *A. erubescens*;

6384 – образец *A. iranicum*;

6827 – образец *A. leucanthum*;

04-34-0065-20 – образец *A. longicuspis*;

5628 – образец *A. polyanthum*;

Premier – образец *A. porrum*;

5975 – образец *A. pseudoampeloprasum*;

1248 – образец *A. pyrenaicum*;

09-41-0011-20 – образец *A. rotundum*;

2290 – образец *A. scorodoprasum*;

05-13-0020-20 – образец *A. tuncelianum*;

3088 – образец *A. altaicum*;

Kaskad – образец *A. cера*;

1776 – образец *A. fistulosum*;

Medonos – образец *A. schoenoprasum*;

2092 – образец *A. obliquum*;

Lider – образец *A. nutans*;

Aprior – образец *A. odorum*;

ursinum – образец *A. ursinum*.

Выравнивания последовательностей *ndhJ-trnL* анализируемых образцов *A. regelianum* и родственных видов *Allium*

[illegible]

Соответствие номеров на рисунке и анализируемых образцов:

03-43-0193, 03-27-0001 – образцы *A. ampeloprasum*;

1, 4 – образцы *A. regelianum* из Быковского р-на, лиман Тажи;

11, 21 – образцы *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Хреноватый;

30 – образец *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Медвежий;

41 – образец *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Богатырев;

43 – образец *A. regelianum* из Иловлинского р-на, хутор Ерецкий;

44 – образец *A. regelianum* из Фроловского р-на, хутор Выездинский;

70, 77 – образцы *A. regelianum* из Серафимовичского р-на, хутор Красноярский;

79 – образец *A. regelianum* из Серафимовичского р-на, хутор Буерак-Поповский;

91 – образец *A. regelianum* из Алексеевского р-на, станция Усть-Бузулукская;

1662 – образец *A. commutatum*;

5628 – образец *A. polyanthum*;

Premier – образец *A. porrum*;

1248 – образец *A. pyrenaicum*;

2520 – образец *A. atrovioleaceum*;

5646 – образец *A. baeticum*;

6234 – образец *A. erubescens*;

6384 – образец *A. iranicum*;

5975 – образец *A. pseudoampeloprasum*;

6827 – образец *A. leucanthum*;

09-41-0011-20 – образец *A. rotundum*;

31 – образец *A. sativum* (74Kirgiz);

04-34-0065-20 – образец *A. longicuspis*;

2290 – образец *A. scorodoprasum*;

05-13-0020-20 – образец *A. tuncelianum*;

Aprior – образец *A. odorum*;

Lider – образец *A. nutans*;

2092 – образец *A. obliquum*;

Medonos – образец *A. schoenoprasum*;

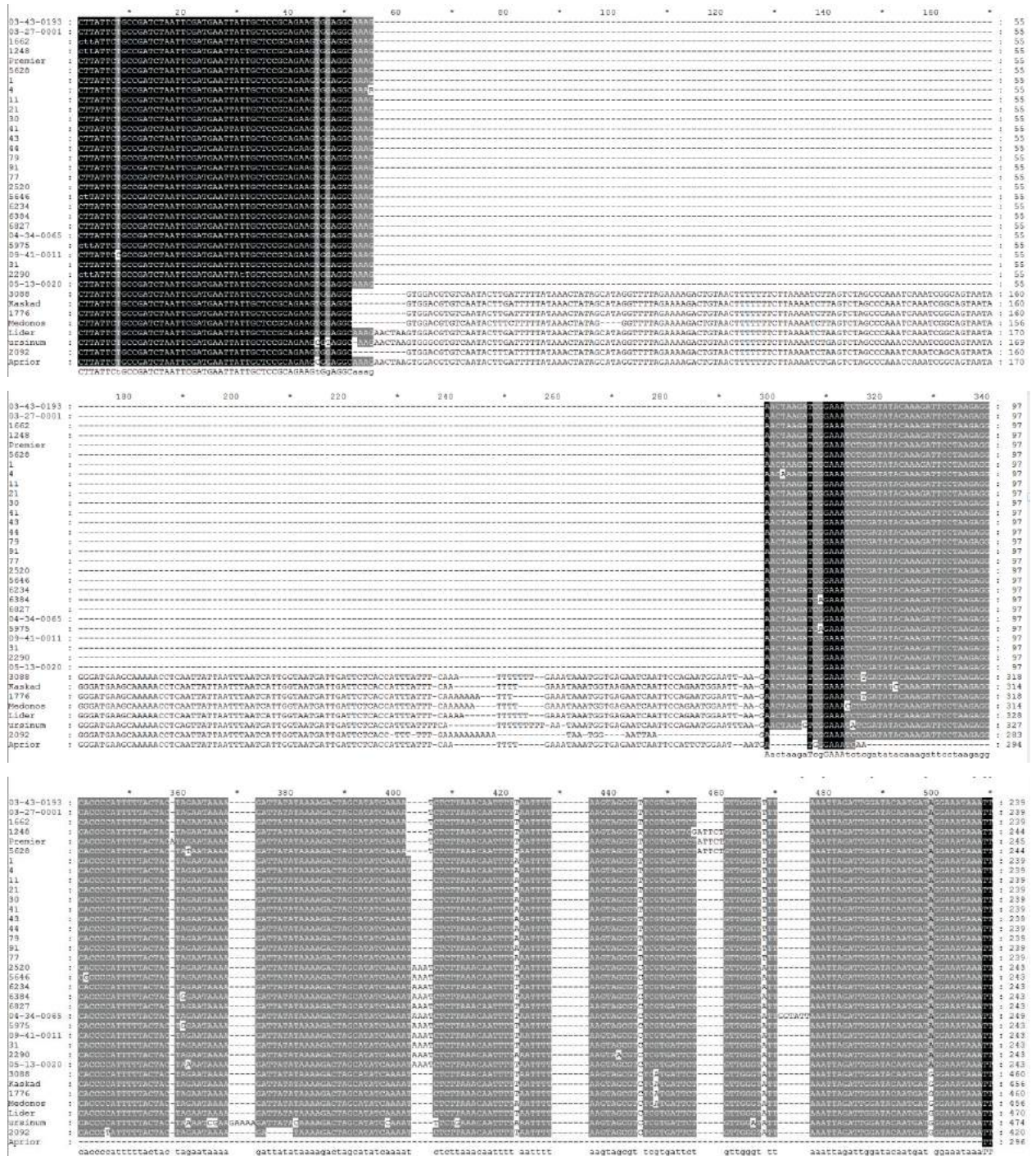
Kaskad – образец *A. cера*;

3088 – образец *A. altaicum*;

1776 – образец *A. fistulosum*;

ursinum – образец *A. ursinum*.

Выравнивания последовательностей *trnC-petN* анализируемых образцов *A. regelianum* и родственных видов *Allium*



03-43-0193, 03-27-0001 – образцы *A. ampeloprasum*;

1248 – образец *A. pyrenaicum*;

5628 – образец *A. polyanthum*;

11, 21 – образцы *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Хреноватый;

30 – образец *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Медвежий;

- 41 – образец *A. regelianum* из Николаевского р-на, лиман Богатырев;
43 – образец *A. regelianum* из Иловлинского р-на, хутор Ерецкий;
44 – образец *A. regelianum* из Фроловского р-на, хутор Выездинский;
70 – образец *A. regelianum* из Серафимовичского р-на, хутор Красноярский;
79 – образец *A. regelianum* из Серафимовичского р-на, хутор Буерак-Поповский;
91 – образец *A. regelianum* из Алексеевского р-на, станица Усть-Бузулукская;
2520 – образец *A. atrovioleum*;
5646 – образец *A. baeticum*;
6234 – образец *A. erubescens*;
6384 – образец *A. iranum*;
6827 – образец *A. leucanthum*;
04-34-0065-20 – образец *A. longicuspis*;
5975 – образец *A. pseudoampeloprasum*;
09-41-0011-20 – образец *A. rotundum*;
31 – образец *A. sativum* (74Kirgiz);
2290 – образец *A. scorodoprasum*;
05-13-0020-20 – образец *A. tuncelianum*;
3088 – образец *A. altaicum*;
Kaskad – образец *A. cера*;
1776 – образец *A. fistulosum*;
Medonos – образец *A. schoenoprasum*;
Lider – образец *A. nutans*;
ursinum – образец *A. ursinum*;
2092 – образец *A. obliquum*;
Aprior – образец *A. odorum*.

Корреляция между матрицами значений индекса генетического сходства Дайса между образцами *B.sarmatica*, полученными по результатам разных методов анализа

Сравниваемые методы	Коэффициент корреляции*
RAPD-AFLP	$R^2=0,554$, $p=0,0002$
RAPD-ISSR	$R^2=0,904$, $p=0,0002$
RAPD-NBS	$R^2=0,985$, $p=0,0002$
ISSR-AFLP	$R^2=0,463$, $p=0,0002$
ISSR-NBS	$R^2=0,882$, $p=0,0002$
AFLP-NBS	$R^2=0,636$, $p=0,0002$

* – коэффициент получен при проведении теста Мантеля

Корреляция между матрицами значений индексов генетических расстояний Нея между популяциями *B.sarmatica*, полученными по результатам разных методов анализа

Сравниваемые методы	Коэффициент корреляции*
RAPD-AFLP	$R^2=0,586$, $p=0,072$
RAPD-ISSR	$R^2=0,993$, $p=0,010$
RAPD-NBS	$R^2=0,992$, $p=0,010$
ISSR-AFLP	$R^2=0,564$, $p=0,072$
ISSR-NBS	$R^2=0,993$, $p=0,007$
AFLP-NBS	$R^2=0,569$, $p=0,066$

* – коэффициент получен при проведении теста Мантеля

Корреляция между матрицами значений индекса генетического сходства Дайса между образцами *A. regelianum*, полученными по результатам разных методов анализа

Сравниваемые методы	Коэффициент корреляции*
RAPD-AFLP	$R^2=0,5436$, $p=0,0002$
RAPD-ISSR	$R^2=0,5357$, $p=0,0002$
RAPD-NBS	$R^2=0,7224$, $p=0,021$
ISSR-AFLP	$R^2=0,878$, $p=0,0002$
ISSR-NBS	$R^2=0,462$, $p=0,017$
AFLP-NBS	$R^2=0,454$, $p=0,004$

* – коэффициент получен при проведении теста Мантеля

Корреляция между матрицами значений индексов генетических расстояний Нея между популяциями *A. regelianum*, полученными по результатам разных методов анализа

Сравниваемые методы	Коэффициент корреляции*
RAPD-AFLP	$R^2=0,659$, $p=0,009$
RAPD-ISSR	$R^2=0,619$, $p=0,037$
RAPD-NBS	$R^2=0,809$, $p=0,040$
RAPD-SSR	$R^2=0,938$, $p=0,042$
ISSR-AFLP	$R^2=0,956$, $p=0,009$
ISSR-NBS	$R^2=0,579$, $p=0,013$
ISSR-SSR	$R^2=0,472$, $p=0,049$
AFLP-NBS	$R^2=0,674$, $p=0,040$
AFLP-SSR	$R^2=0,931$, $p=0,046$
NBS-SSR	$R^2=0,432$, $p=0,050$

* – коэффициент получен при проведении теста Мантеля

Корреляция между матрицами значений индекса генетического сходства Дайса между образцами *A. hololeuca*, полученными по результатам разных методов анализа

Сравниваемые методы	Коэффициент корреляции*
RAPD-AFLP	$R^2=0,861$, $p=0,0002$
RAPD-ISSR	$R^2=0,514$, $p=0,0002$
ISSR-AFLP	$R^2=0,881$, $p=0,0002$

* – коэффициент получен при проведении теста Мантеля

Корреляция между матрицами значений индексов генетических расстояний Нея между популяциями *A. hololeuca*, полученными по результатам разных методов анализа

Сравниваемые методы	Коэффициент корреляции*
RAPD-AFLP	$R^2=0,793$, $p=0,0002$
RAPD-ISSR	$R^2=0,446$, $p=0,0004$
ISSR-AFLP	$R^2=0,898$, $p=0,0002$

* – коэффициент получен при проведении теста Мантеля