

*На правах рукописи*

**ТРИФОНОВА Ая Арслановна**

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ПОПУЛЯЦИЯХ ОСОБО  
ОХРАНЯЕМЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена в лаборатории генетики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук **КУДРЯВЦЕВ Александр Михайлович**, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук **ШАНЦЕР Иван Алексеевич**, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной систематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук  
кандидат биологических наук **СИНЮШИН Андрей Андреевич**, доцент кафедры генетики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г. Москва

Защита состоится «11» октября 2018 г. в \_\_\_\_ ч. на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3, aspirantura@vigg.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н. Горячева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Более 24 000 видов растений занесено в международный список видов, уже исчезнувших или находящихся под угрозой исчезновения [The IUCN Red List of Threatened Species]. В Конвенции о биологическом разнообразии, в рамках которой действует Программа по глобальной стратегии сохранения растений (Global Strategy for Plant Conservation), 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]. Знания о генетическом разнообразии видов, очевидно, важны для разработки эффективных программ по их сохранению [Holsinger, Vitt 1997; Алтухов, 2004]. Сохранение множества генетически отличных локальных популяций – основная задача, позволяющая предотвратить вымирание вида и сохранить его эволюционный потенциал [Luck et al., 2003., Allendorf, Luikart, 2009].

Определить уровень внутри и межпопуляционного генетического разнообразия и установить популяционно-генетическую структуру вида позволяют современные молекулярно-генетические методы, поэтому их применение очень важно при изучении редких видов растений и разработке стратегии их сохранения.

В последние десятилетия работа по сохранению биоразнообразия и 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]. Так, Волгоградский региональный ботанический сад проводит большую работу по сохранению и воспроизводству редких видов растений области. При этом особое внимание уделяется изучению и сохранению генетического разнообразия. Мероприятия по изучению генетического разнообразия внесены в программы по мониторингу таких редких видов растений, как лук регелевский (*Allium regelianum* A.K. Becker ex Pjin (семейство Amaryllidaceae), эндемик юго-востока европейской части РФ, занесен в Красную Книгу РФ, статус: 2a – вид, сокращающийся в численности) и бельвалия сарматская (*Bellevalia sarmatica* Misc. (семейство Asparagaceae), вид занесен в Красную Книгу РФ, статус 2 – вид, сокращающийся в численности). Эти виды культивируются сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада в искусственных условиях, включены в банки семян и банк *in vitro*. Однако генетические исследования данных видов не проводились. Кроме того,

одним из специфичных ландшафтов Волгоградской области являются меловые степи, где произрастает множество редких растений, в том числе полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca* M. Vieb. ex. Besser (семейство Asteraceae), Донецко-Донской эндемик, занесен в Красную Книгу РФ, статус 2 – сокращающийся в численности вид), также включенная в работу, изучение генетического разнообразия этого вида ранее не проводилось.

**Степень разработанности темы исследования.** Изучению генетических основ сохранения биоразнообразия посвящено множество работ, начиная со второй половины прошлого века [Voipio, 1950; Soulé and Wilcox, 1980; Frankel and 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; Светлакова, 2012; Шигапов, 2014; Снегин, 2016 и др.], так и зарубежными исследователями [Ma et al., 2013; Kaulfub, Reisch, 2017; Atnaf et al., 2017; Hamilton et al., 2017; Ahrens et al., 2017]. 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: *Bellevalia sarmatica*, *Allium regelianum* и *Artemisia hololeuca* с использованием методов молекулярно-генетического маркирования (RAPD-, ISSR-, AFLP-, SSR-анализ, NBS-профайлинг). Получены первые данные об уровне генетического разнообразия и уровне генетической дифференциации в популяциях изучаемых видов. 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*, и на основе полученных данных определен уровень внутривидового полиморфизма и уточнен таксономический статус видов *A. regelianum* и *B. sarmatica*. Впервые даны рекомендации по сохранению генофондов изучаемых видов на основе результатов генетического анализа.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** 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 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 внутривидового 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 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 (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.

**Личный вклад автора.** Основные результаты работы были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Сбор растений *A. regelianum* и *B. sarmatica* проводился сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада, а сбор образцов *A. hololeuca* – при участии автора. Амплификация последовательностей ядерного и хлоропластного генома *A. regelianum* и *B. sarmatica*, а также NBS-профайлинг проводились совместно с сотрудниками группы молекулярных методов анализа генома, ФИЦ Биотехнологии РАН. Анализ *B. sarmatica* с помощью мультилокусных методов проводился совместно с Горюновой С.В., Хадеевой Н.В.

**Апробация.** Результаты работы были представлены автором на молодежной конференции «Популяционная генетика и геогеография: 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.

**Публикации.** По материалам работы опубликовано семь печатных работ, в том числе четыре – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 223 страницах и состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы, включающего 327 наименований. Работа содержит 40 таблиц и 70 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1 Обзор литературы** состоит из трех частей. Первая часть посвящена проблемам сохранения генофондов растений. Во второй части обсуждаются молекулярно-генетические методы, применяемые для изучения редких растений. В третьей части описываются объекты исследований, их ботанические и экологические характеристики.

**Глава 2 Материалы и методы исследования.** Для проведения исследований на территории Волгоградской области был собран 41 образец *B. sarmatica* из пяти популяций, 93 образца *A. regelianum* из 11 популяций, 89 образцов *A. hololeuca* из 13 популяций. Кроме того, коллекция образцов *A. regelianum* была дополнена 11 образцами из других регионов России (полученными из гербарных коллекций Главного ботанического сада им. Цицина РАН и Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова). Для оценки внутривидового полиморфизма были использованы современные методы молекулярно-генетического маркирования: мультилокусные (RAPD-, ISSR-, AFLP-анализ, NBS-профайлинг), монолокусные (SSR-анализ, анализ нуклеотидных последовательностей ядерного и цитоплазматического генома). Для статистической обработки полученных данных использованы стандартные программы: GenAlEx 6.41 [Peakall, Smouse, 2006], POPGEN 1.32 [Yeh et al., 1999], PAST 3.11 [Hammer et al., 2001], Structure v.2.3.4 [Pritchard et al., 2000]. Первичные нуклеотидные последовательности анализировались с помощью программ Chromas 1.45 и MEGA 6.0 [Tamura et al., 2013].

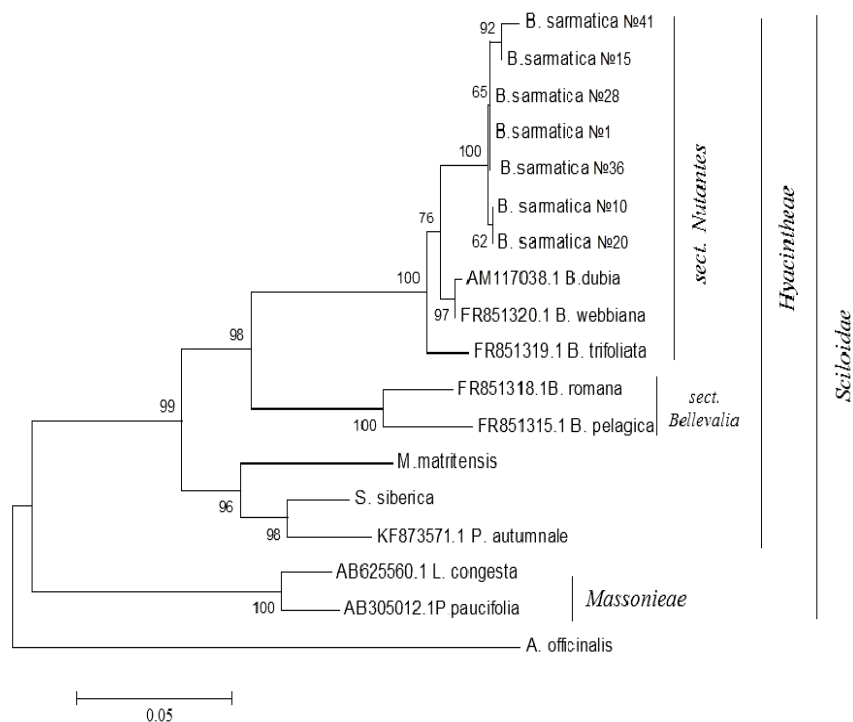
### Глава 3 Результаты и обсуждение

#### Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *Bellevalia sarmatica*

Анализ некодирующих участков ядерного и цитоплазматического геномов. В анализ были взяты семь образцов *B. sarmatica* из разных популяций. Были проанализированы нуклеотидные последовательности ядерного (ядерный рибосомальный оперон ITS1-5.8S-ITS2) и хлоропластного генома (спейсеры *ndhJ-trnL*, *trnC-petN*).

При анализе нуклеотидных последовательностей **ITS1-5.8S-ITS2** *B. sarmatica* уровень внутривидовой вариабельности 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 1), все семь образцов *B. sarmatica* образуют единый кластер (индекс бутстрепа=100), внутри которого анализируемые образцы разделяются на группы, в каждую из которых попали растения, представляющие различные популяции. При анализе межвидового полиморфизма (для этого из базы данных NCBI были взяты нуклеотидные последовательности ITS1-5.8S-ITS2 других видов рода *Bellevalia* и подсемейства Scilloideae) было определено филогенетическое положение

*B. sarmatica* и показано, что изучаемый вид относится к секции *Nutantes* (Рисунок 1). Наиболее близкими видами являются *B. webbiana* и *B. dubia* (96,7% гомологии).



**Рисунок 1.** Дендрограмма, построенная по результатам анализа ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей у анализируемых видов Scilloideae, методом Neighbor Joining.

Также построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *B. sarmatica*, топология которой аналогична предложенной и описанной ранее для представителей других родов растений (*Cycas* [Xiao et al., 2010], *Amaranthus* [Слугина и др., 2014]).

Изученные последовательности хлоропластного генома (межгенные спейсеры *trnC-petN* и *ndhJ-trnL*) имели крайне низкий

уровень полиморфизма (0 и 0,4% соответственно) и не могут быть использованы для анализа разнообразия образцов *B. sarmatica*.

Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *B. sarmatica* методами мультилокусного анализа. Все использованные методы мультилокусного анализа (RAPD-, ISSR-, AFLP-анализ и NBS-профайлинг) позволили выявить полиморфизм 41 образца *B. sarmatica*. Каждый из анализируемых образцов был охарактеризован специфичным спектром фрагментов. Уровень внутривидового полиморфизма был довольно высоким и составил: 68,9% по результатам ISSR-анализа; 91,6% по результатам AFLP-анализа; 95,8% по результатам NBS-профайлинга, 97,7% по результатам RAPD-анализа.

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

Учитывая полученные данные о внутривидовой изменчивости, можно говорить об относительно благополучном состоянии популяций *B. sarmatica*. Наибольший уровень разнообразия отмечен в популяциях Кумылженского и Калачевского районов (Таблица 1). Для популяций Серафимовичского и Клетского районов отмечен меньший



уровень разнообразия. Наиболее однородно частоты аллелей распределены в популяциях Серафимовичского и Кумылженского района (эти популяции в большинстве случаев имели наибольшее среднее число аллелей и наименьшую долю редких аллелей), наименее однородное распределение аллелей отмечено для популяций Клетского и Суrowsикинского районов.

**Таблица 1. Показатели внутривидового разнообразия *B. sarmatica*, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.**

Популяция	Полиморфные локусы (%)				Уровень ожидаемой гетерозиготности (He)			
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS	RAPD	ISSR	AFLP	NBS
Калачевский р-н	73,71	63,22	65,93	74,91	0,278	0,236	0,223	0,278
Клетский р-н	56,57	54,02	54,81	57,58	0,213	0,214	0,195	0,215
Кумылженский р-н	70,86	58,62	77,04	71,89	0,291	0,236	0,284	0,290
Суrowsикинский р-н	64,57	63,22	47,41	66,62	0,260	0,259	0,174	0,261
Серафимовичский р-н	57,14	51,72	54,07	59,15	0,220	0,201	0,201	0,222
Среднее значение показателей полиморфизма по каждому методу	64,57	58,16	59,85	66,03	0,252	0,229	0,215	0,253

Анализируя генетические расстояния Нея между популяциями, можно сказать, что наиболее близкими генетически являются популяции Клетского и Серафимовичского районов (генетические расстояния между этими популяциями не превышали 0,067), эти же популяции и географически более близки друг к другу, чем остальные. Наиболее отдаленными генетически являются популяции Кумылженского и Калачевского районов, индекс генетических расстояний Нея между этими популяциями был не ниже 0,159 (и достигал 0,256). В целом же, генетические расстояния между популяциями *B. sarmatica* Волгоградской области были невысокими, и максимальное значение этой величины составило 0,256.

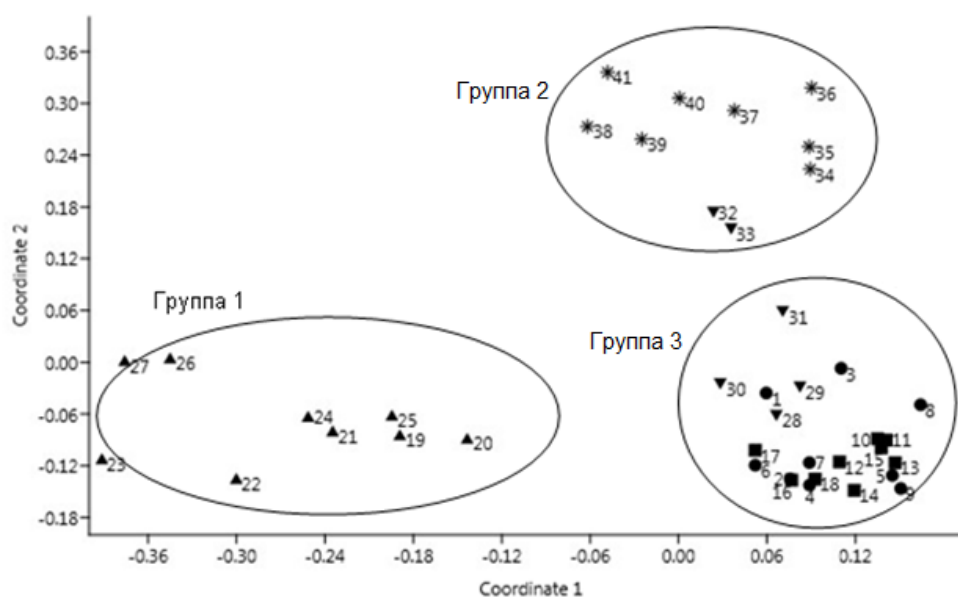
Уровень подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) был на среднем уровне. Анализ молекулярной дисперсии показал, что на долю межпопуляционной изменчивости у *B. sarmatica* приходится не более 25%, а все остальные различия связаны с внутривидовой изменчивостью (Таблица 2).

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием, проведенный по результатам RAPD и ISSR-анализа, демонстрирует корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций. По данным AFLP-анализа и NBS-профайлинга эффекта изоляции расстоянием выявлено не было.

**Таблица 2. Показатели межпопуляционной дифференциации изучаемых видов, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.**

Показатель	Вид анализа	<i>B. sarmatica</i>	<i>A. regelianum</i>	<i>A. hololeuca</i>
$G_{ST}$ ( $F_{ST}$ для SSR анализа)	RAPD	0,266	0,286	0,505
	ISSR	0,270	0,220	0,526
	AFLP	0,291	0,250	0,516
	NBS	0,275	0,146	-
	SSR	-	0,180	-
Доли внутри-и межпопуляционной изменчивости, %	RAPD	75/25	77/23	59/41
	ISSR	75/25	83/17	55/45
	AFLP	76/24	81/19	57/43
	NBS	77/23	90/10	-
	SSR	-	85/15	-

Анализируя дифференциацию образцов *B. sarmatica* на графиках главных координат, а также результаты анализа в программе Structure, можно говорить о наличии трех групп популяций (Рисунок 2). Первую группу составляют образцы из популяции Кумылженского района. Вторую группу образуют образцы из Калачевского района. Третья группа объединяет образцы из популяций Клетского и Серафимовичского районов.



**Рисунок 2. 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 района; 10–18(■) – популяция Серафимовичского района; 19–27(▲) – популяция Кумылженского района, 28–33(▼) – популяция Суrowsикинского района, 34–41(\*) – популяция Калачевского района.**

Положение образцов из популяции Суrowsикинского района по данным разных методов отличается. По результатам ISSR-анализа данная популяция скорее относится к третьей группе образцов (популяции Клетского и Серафимовичского районов), а по результатам AFLP-анализа – ко второй группе образцов (популяция Калачевского района). RAPD-анализ, NBS-профайлинг, а также анализ, проведенный по объединенным данным

(Рисунок 2), показали, что часть образцов *B. sarmatica* этой популяции можно объединить со второй группой, а часть образцов с третьей. Географически популяция Суровикинского района располагается между популяциями Калачевского и Клетского районов, поэтому можно предположить, что она образовалась из генотипов популяций соседних 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 в большей степени проявляется для популяции Кумылженского района, которая наиболее удалена от других географически и по результатам всех проводимых анализов была достаточно обособлена. Для оставшихся популяций эффект изоляции расстоянием проявляется меньше.

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 учитывать данные проведенного генетического анализа. В программу по сохранению следует включить популяции из каждой выявленной в ходе исследования группы. Особое внимание следует обратить на популяцию Кумылженского района, как наиболее уникальную в генетическом плане, а также 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, особенности произрастания растений. Для отбора образцов при сохранении *ex situ* можно использовать данные генетического анализа и выбирать наиболее генетически отдаленные образцы.

#### **Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *Allium regelianum***

Анализ нуклеотидных последовательностей некодирующих участков ядерного и цитоплазматического геномов. Для определения внутривидового полиморфизма *A. regelianum* и уточнения его таксономического статуса был проведен анализ нуклеотидных последовательностей ядерного (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. Для анализа межвидового полиморфизма, а также определения положения *A. regelianum* внутри рода были взяты нуклеотидные последовательности ITS1-

5.8S-ITS2, *ndhJ-trnL*, *trnC-petN* 24 других представителей рода *Allium* различных подродов и секций (предоставлены группой молекулярных методов анализа генома ФИЦ Биотехнологии РАН).

У образцов *A. regelianum* в последовательностях **ITS1-5.8S-ITS2** было выявлено 29 переменных позиций (25 SNPs в последовательностях ITS1 и ITS2 и 4 SNPs в последовательности гена 5.8S рРНК). Уровень внутривидовой изменчивости составил 5%, что сопоставимо с данными, полученными для других редких видов рода *Allium* [Mashayekhi and Columbus, 2015]. На дендрограмме, построенной по результатам анализа ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей, образцы *A. regelianum* образуют единый кластер (индекс бутстрепа=100), внутри которого анализируемые образцы разделяются на несколько подкластеров, причем в каждый из этих подкластеров попали растения, представляющие популяции из разных районов. Также построена вероятная вторичная структура молекулы 5.8S рРНК у *A. regelianum*, топология которой аналогична предложенной и описанной ранее для 20 видов рода *Allium* [Филюшин, Кочиева, 2014].

При изучении последовательностей хлоропластного генома, уровень внутривидового разнообразия был ниже. У образцов *A. regelianum* в последовательностях *ndhJ-trnL* переменных сайтов выявлено не было, а в последовательностях спейсера *trnC-petN* выявлено две однонуклеотидные индели. На дендрограмме, построенной на основе объединенной последовательности пластидных спейсеров, все образцы *A. regelianum* образуют единый кластер без дальнейшей дифференциации.

Межвидовая дифференциация образцов рода *Allium* по результатам анализа нуклеотидных последовательностей ядерного генома, хлоропластного генома, а также объединенной последовательности всех изучаемых участков (Рисунок 3) в целом была сходна и не противоречила классификации рода по молекулярным данным [Friesen et al., 2006]. На всех дендрограммах отдельный подкластер формировали образцы подрода *Allium*, секции *Allium*, в том числе и *A. regelianum*. Положение изучаемого вида внутри секции *Allium* различается. По результатам анализа последовательности ITS1-5.8S-ITS2, *A. regelianum* показал наибольшее сходство с видом *A. pyrenaicum*, между ними отмечено наименьшее значение генетического расстояния (0,065). По результатам анализа последовательностей *ndhJ-trnL* и *trnC-petN*, *A. regelianum* наиболее схож с видами *A. ampeloprasum* и *A. commutatum* (99% гомологии).

На дендрограмме, построенной по результатам анализа объединенной последовательности всех изучаемых участков (Рисунок 3), образцы *A. regelianum* также образуют общий подкластер с *A. ampeloprasum* и *A. commutatum*. Такие различия в положении вида связаны с тем, что секция *Allium* является активно развивающейся, многие

виды этой секции имеют общий ареал и могут скрещиваться друг с другом, поэтому возникают трудности с установлением границ видов и значительно усложняется изучение филогении [Hanelt, 1996].

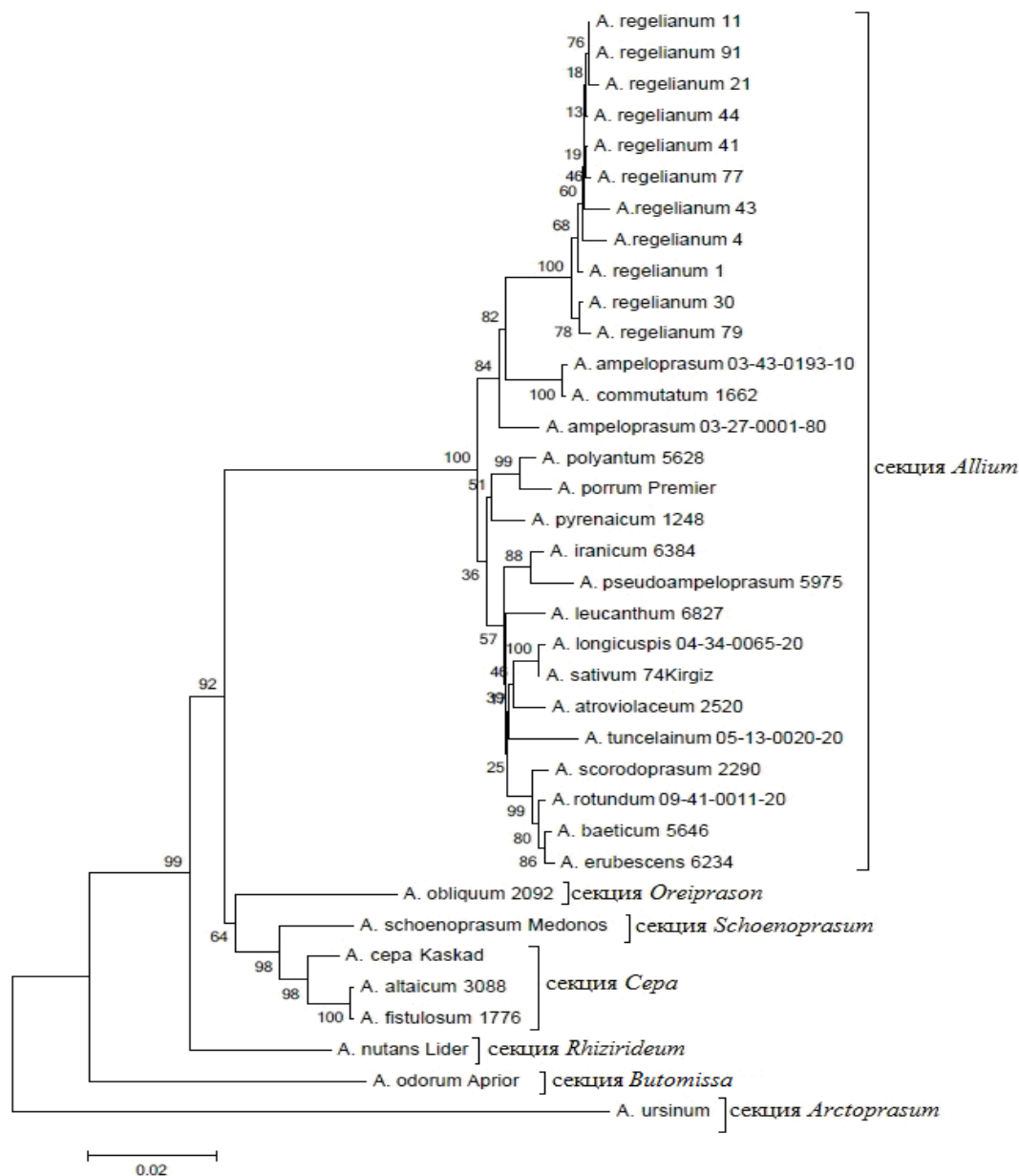


Рисунок 3. Дендрограмма, построенная по результатам анализа объединенной последовательности пластидных спейсеров *ndhJ-trnL*, *trnC-petN* и *ITS1-5.8S-ITS2* у анализируемых видов рода *Allium*, методом Neighbor Joining.

Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *A. regelianum* методами моно- и мультилокусного анализа. Чтобы оценить уровень полиморфизма генома *A. regelianum* были также применены методы мультилокусного (RAPD-, ISSR-, AFLP-анализ и NBS-профайлинг) и монолокусного анализа (SSR-анализ). Все использованные методы позволяли выявить полиморфизм исследуемых образцов. Каждый из 93 анализируемых образцов *A. regelianum* был охарактеризован специфичным спектром фрагментов. Уровень внутривидового полиморфизма составил: 32% по результатам NBS-профайлинга, 75,8% по

результатам RAPD-анализа, 79,8% по результатам ISSR-анализа, 80,5% по результатам AFLP-анализа и 100% по результатам SSR-анализа.

Для проведения SSR-анализа были отобраны четыре микросателлитных маркера, разработанные для культурных представителей рода *Allium*, которые по результатам предварительного тестирования выявляли полиморфизм и у изучаемого нами вида. Всего было выявлено 23 аллельных варианта у 88 анализируемых образцов. Количество аллелей на локус составило от 4 до 7. Также были отмечены уникальные аллели, которые встречаются только в определенной популяции, что может быть полезно при паспортизации популяций изучаемого вида.

При проведении NBS-профайлинга, кроме анализа внутривидового разнообразия, были также проанализированы межвидовые различия *A. regelianum* и других видов рода *Allium*. Образцы *A. regelianum* были достаточно дифференцированы от других представителей рода, что может говорить о некоторой степени уникальности семейства генов устойчивости изучаемого вида.

По результатам всех используемых методов анализа были рассчитаны показатели внутривидового разнообразия, которые оказались относительно невысокими. Анализ внутривидового полиморфизма был проведен для популяций, где количество собранных образцов превышало пять (Таблица 3). Среди проанализированных популяций наибольшим уровнем разнообразия отличалась популяция Николаевского р-на, лимана Хреноватый и популяция Серафимовичского р-на, хутора Красноярский. Наименьшие показатели внутривидового разнообразия отмечены для популяции Быковского р-на, лиман Тажи и Серафимовичского р-на, 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 представляется возможным из-за ограниченной численности растений в популяциях.

При SSR-анализе все локусы были полиморфными во всех проанализированных популяциях, а показатели внутривидового разнообразия имели большие значения, чем при анализе с помощью мультилокусных методов, что можно объяснить особенностями получаемых данных (невозможность выделения гетерозигот при использовании доминантных маркеров).

Анализируя среднее число аллелей и долю редких аллелей в популяциях, можно сказать, что наиболее равномерно частоты аллелей 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.

**Таблица 3. Показатели внутривидового разнообразия *A. regelianum*, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.**

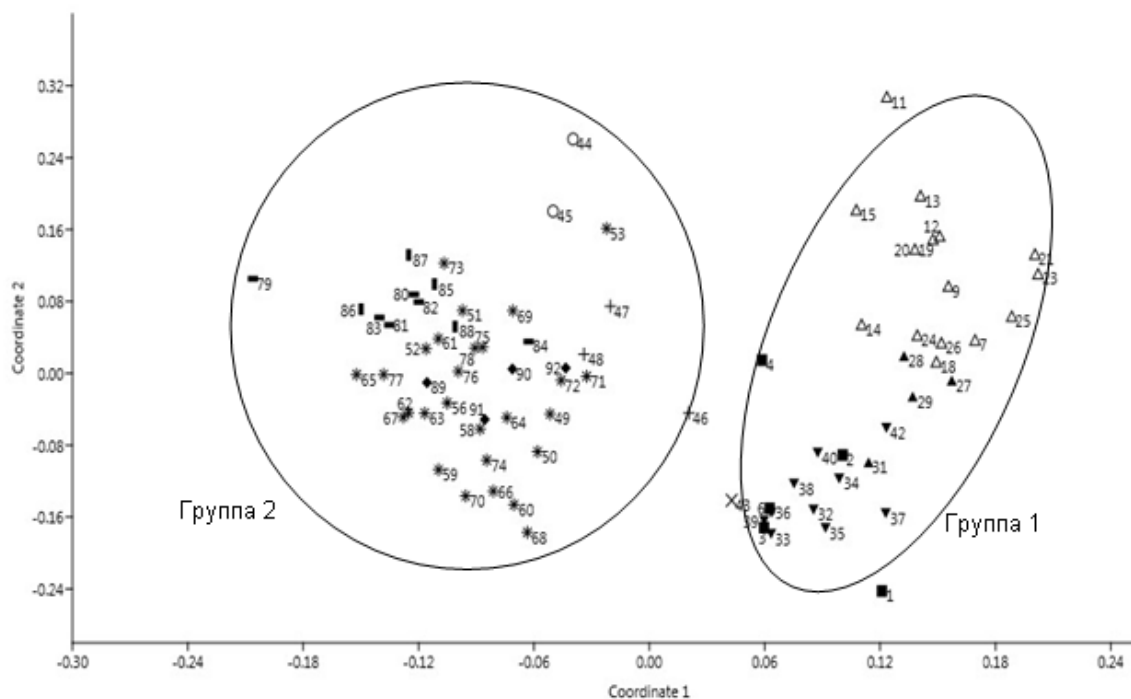
Популяция	Полиморфные локусы (%)				Уровень ожидаемой гетерозиготности (He)				
	RAPD	ISSR	AFLP	NBS	RAPD	ISSR	AFLP	NBS	SSR
Быковский р-н, лиман Тажи	32,97	41,30	42,34		0,124	0,161	0,164		-
Николаевский р-н, лиман Хреноватый	64,84	65,14	68,17	27,36	0,267	0,243	0,240	0,146	0,58
Николаевский р-н, лиман Богатырев	52,75	54,12	56,46	26,13	0,188	0,204	0,207	0,133	0,52
Серафимовичский р-н, хут. Красноярский	68,13	68,83	69,07	29,39	0,234	0,231	0,235	0,131	0,56
Серафимовичский р-н, хут. Буерак-Поповский	56,04	33,90	36,94	25,53	0,232	0,122	0,130	0,144	0,64
Среднее значение показателей полиморфизма по каждому методу	54,95	52,66	54,60	37,59	0,209	0,192	0,195	0,139	0,575

Далее были проанализированы данные по межпопуляционному разнообразию *A. regelianum*. Рассматривая данные о дифференциации популяций, можно говорить об их достаточно низком уровне подразделенности (Таблица 2). Большая часть изменчивости приходится на внутривидовую составляющую. Значения генетического расстояния Нея между популяциями *A. regelianum* в целом очень низкие (не выше 0,195). Наиболее близкими генетически являются популяции лимана Хреноватый (Николаевский р-н) и хутора Красноярский (Серафимовичский р-н), и популяции хутора Красноярский и Буерак-Поповский (Серафимовичский р-н) (индекс генетических расстояний Нея был не выше 0,123). Наиболее отдаленными генетически являются популяции Быковского р-на и Серафимовичского р-на (хутор Буерак-Поповский) и популяций лимана Богатырев (Николаевский р-н) и хутора Буерак-Поповский (Серафимовичский р-н) (генетические расстояния был не ниже 0,113).

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием выявил корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций только по данным RAPD-анализа.

Анализируя дифференциацию образцов *A. regelianum* на графиках главных координат, а также результаты анализа в программе Structure, можно говорить об их достаточной однородности. Не наблюдается четкого деления образцов по популяциям. Чаще всего образцы *A. regelianum* образуют единую группу с разной степенью дифференциации.

Наименее дифференцированы популяции по результатам SSR-анализа и NBS-профайлинга, наиболее – по результатам AFLP-анализа, а также при объединении данных используемых мультилокусных методов (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Дифференциация изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по объединенным данным мультилокусных методов с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-6 (■) – популяция Быковского района, лиман Тажи; 7-26 (Δ) – популяция Николаевского района, лиман Хреноватый; 27-31 (▲) – популяция Николаевского района, лиман Медвежий; 32-42 (▼) – популяции Николаевского района, лиман Богатырев; 43 (×) – популяция Иловлинского района, хутор Ерецкий; 44-45 (○) – популяция Фроловского района, хутор Выездинский; 46-48 (+) – популяция Серафимовичского района, хутор Дружилинский; 49-78 (\*) – популяция Серафимовичского района, хутор Красноярский; 79-84 (■) – популяция Серафимовичского района, хутор Буерак Поповский; 85-88 (▮) – популяция Серафимовичского района, хутор Новоалександровский; 89-93 (◆) – популяция Алексеевского района, станица Усть-Бузулукская.

В целом, 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) (Рисунок 4). Данные группы, разделены крупной рекой (Волгой), которую можно считать важным фактором географической изоляции. Эти группы популяций также можно приурочить к природно-территориальным комплексам Волгоградской области [Брылев, Рябинина 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 (общность ландшафта, почвенно-климатические условия и специфика биогеоценозов). Л.А. Животовский показал,



что необходимо соотнесение групп популяций, выделенных на основе генетического анализа с известными природными комплексами, это может быть важно при планировании природоохранных мероприятий [Животовский, 2016]. Внутри групп популяций *A. regelianum* также наблюдается дифференциация, которая 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 генами, 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/разделение единой популяции на более мелкие группы. Однако эти события еще не успели привести к генетической дифференциации популяций.

Учитывая полученную в ходе исследований популяционно-генетическую структуру *A. regelianum* для сохранения необходимо выбрать 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 внутривидовой изменчивости. 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. Однако программа по сохранению *A. regelianum* должна основываться не только на данных генетических исследований, но и учитывать полевые данные и условия произрастания популяций.

#### **Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости *Artemisia hololeuca***

Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости вида *A. hololeuca* был проведен с помощью методов мультилокусного анализа (RAPD-, ISSR- и AFLP). Все использованные мультилокусные методы анализа позволяли выявить полиморфизм 89 исследуемых образцов. Каждый из анализируемых образцов *A. hololeuca* был охарактеризован специфичным спектром фрагментов. Уровень внутривидового полиморфизма составил: 78,8% по результатам RAPD-анализа, 85,71% по результатам ISSR-анализа и 88,79% по результатам AFLP-анализа.

Показатели внутривидовой изменчивости *A. hololeuca* были невысокими. Среди 13 проанализированных популяций наибольшим уровнем разнообразия отличаются популяция хутора Помалинский, Алексеевского р-на и популяция №2 из станицы Луковская,

Нехаевского р-на (по результатам RAPD и AFLP-анализа), а также популяция №2 станицы Акишевской (по результатам ISSR-анализа). Наименьшие показатели внутривидового разнообразия отмечены для популяции №3 хутора Нестеровский, Алексеевского р-на (Таблица 4). Наиболее равномерно частоты аллелей распределены в популяции станицы Усть-Бузулукская, Алексеевского р-на, а также в популяции №2 станицы Луковская, Нехаевского р-на, наименее – в популяции №3 хутора Нестеровский, Алексеевского р-на.

**Таблица 4. Показатели внутривидового разнообразия *A. hololeuca*, полученные с помощью разных мультилокусных маркеров.**

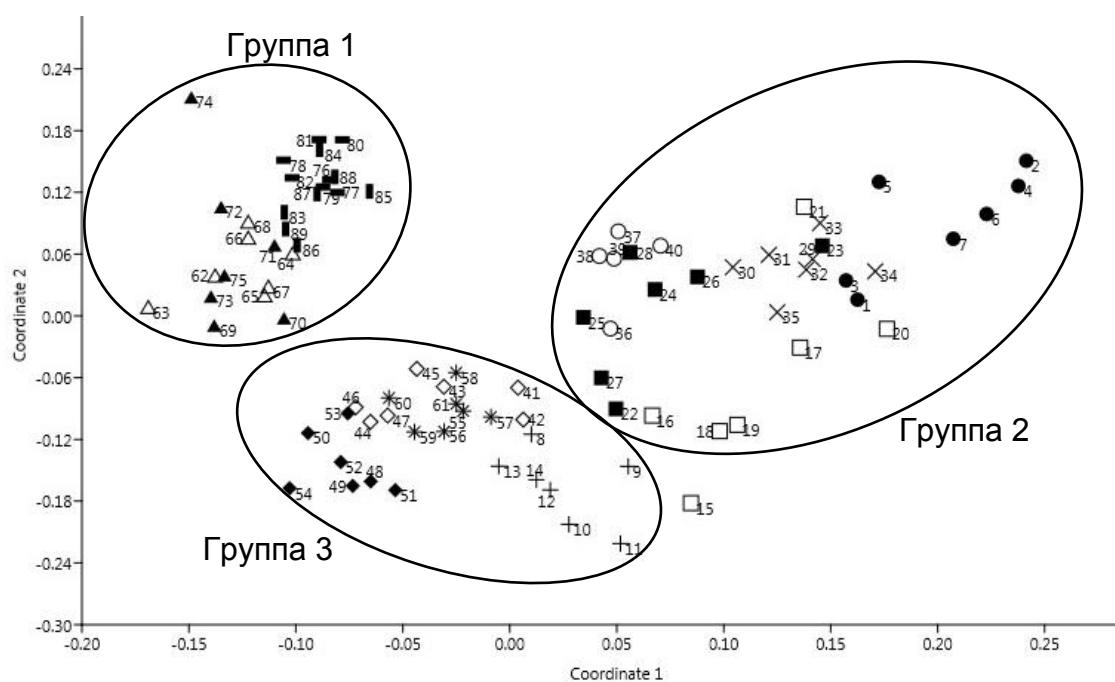
Популяция	Полиморфные локусы (%)			Уровень ожидаемой гетерозиготности (He)		
	RAPD	ISSR	AFLP	RAPD	ISSR	AFLP
Алексеевский р-н, ст-ца Усть-Бузулукская	34,62	31,09	32,74	0,097	0,100	0,099
Алексеевский р-н, хут. Помалинский	48,08	31,93	39,46	0,182	0,125	0,152
Алексеевский р-н, хут. Самолшинский	37,50	30,25	33,63	0,127	0,091	0,108
Алексеевский р-н, хут. Нестеровский, №1	33,65	30,25	31,84	0,118	0,085	0,100
Алексеевский р-н, хут. Нестеровский, №2	24,04	29,41	26,91	0,069	0,074	0,071
Алексеевский р-н, хут. Нестеровский, №3	17,31	20,17	18,83	0,054	0,058	0,056
Нехаевский р-н, ст-ца Акишевская, №1	32,69	31,09	31,84	0,106	0,105	0,105
Нехаевского р-на, ст-ца Акишевская, №2	29,81	36,97	33,63	0,107	0,128	0,118
Нехаевский р-н, хут. Красновский	22,12	32,77	27,80	0,079	0,112	0,097
Нехаевский р-н, ст-ца Луковская, №1	39,42	28,57	33,63	0,121	0,090	0,105
Нехаевского р-на, ст-ца Луковская, №2	44,23	31,93	37,67	0,161	0,102	0,130
Урюпинский р-н, хут. Белогорский, №1	37,50	34,37	30,49	0,122	0,085	0,102
Урюпинский р-н, хут. Белогорский, №2	30,77	26,05	28,25	0,115	0,089	0,101
Среднее значение показателей полиморфизма по каждому методу	33,21	30,37	31,29	0,112	0,096	0,103

Уровень генетической подразделенности популяций *A. hololeuca* был достаточно высоким. Доли внутривидового и межвидового изменчивости были примерно равными (Таблица 2).

Значения генетических расстояний  $F_{ST}$  между популяциями *A. hololeuca* не превышали 0,291. Минимальные значения данного показателя наблюдались между популяциями хутора Белогорский и популяциями №1 и №2 хутора Нестеровский (не выше 0,029). Наиболее генетически отдаленными являются популяции станицы Усть-Бузулукская (Алексеевский р-н) и станицы Акишевская №2 (Нехаевский р-н) и популяции хутора Самолшинский (Нехаевский р-н) и станицы Луковская №2 (Нехаевский р-н) (не ниже 0,240). Тест Мантеля выявил корреляцию между географическими и генетическими расстояниями по всем применяемым методам анализа.

Анализируя дифференциацию образцов *A. hololeuca* на графиках главных координат, а также результаты анализа в программе Structure, можно говорить о нескольких группах популяций, дифференциация между которыми в основном связана с их географическим положением. На Рисунке 5 представлена дифференциация популяций по объединенным данным всех применяемых методов анализа. Наиболее обособлены как генетически, так и

географически две популяции хутора Белогорский (Урюпинский р-н) и две популяции станицы Луковская (Нехаевский р-н) (группа 1). Вторую группу формируют три популяции из хутора Нестеровский, популяция хутора Самолшинский и станицы Усть-Бузулукская (все популяции из Алексеевского р-на). Внутри этой группы достаточно обособленное положение занимает популяция станицы Усть-Бузулукская (особенно по результатам ISSR-анализа). Отметим, что популяции хутора Нестеровский и станицы Усть-Бузулукская географически расположены достаточно близко друг от друга, а популяция хутора Самолшинский 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, вероятно, что популяция хутора Самолшинский могла образоваться в результате заноса некоторых генотипов популяций станицы Усть-Бузулукская и хутора Нестеровский на другой берег реки Хопер.



**Рисунок 5.** Дифференциация изучаемых образцов *A. hololeuca*, выявленная по объединенным данным мультилокусных методов, с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: 1-7 (●) – популяция Алексеевского района, станица Усть-Бузулукская; 8-14 (+) – популяция Алексеевского района, хутор Помалинский; 15-21 (□) – популяция Алексеевского района, хутор Самолшинский; 22-28 (■) – популяция Алексеевского района, хутор Нестеровский №1; 29-35 (×) – популяция Алексеевского района, хутор Нестеровский №2; 36-40 (○) – популяция Алексеевского района, хутор Нестеровский №3; 41-47 (◇) – популяция Нехаевского района, станица Акишевская №1; 48-54 (◆) – популяция Нехаевского района, станица Акишевская №2; 55-61 (\*) – популяция Нехаевского района, хутор Красновский; 62-68 (Δ) – популяция Нехаевского района, станица Луковская №1; 69-75 (▲) – популяция Нехаевского района, станица Луковская №2; 76-82 (—) – популяция Урюпинского района, хутор Белогорский №1; 83-89 (■) – популяция Урюпинского района, хутор Белогорский №2.

Две популяции станицы Акишевская, популяцию хутора Красновский (Нехаевский р-н) и популяцию хутора Помалинский (Алексеевский р-н) можно объединить в еще одну группу (группа 3) (Рисунок 5). 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). 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 и высокими показателями внутрипопуляционного разнообразия). Возможно, эта популяция образовалась из генотипов популяций соседних групп или же существует интенсивный обмен генетическим материалом между популяциями.

Внутри групп, популяции, собранные недалеко от разных населенных пунктов, генетически дифференцируются, а популяции, собранные вблизи одного населенного пункта, генетически не отличаются.

Учитывая ограниченность района сбора образцов, можно говорить о довольно высоком уровне дифференциации *A. hololeuca*. Это можно связать с особенностью мест обитания этого вида, которые приурочены только к выходам коренных плотных слоев мела, имеющих локальное распространение. Также для изучаемого вида полыни показан преимущественно вегетативный тип размножения [Сидорова, 2008]. 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 выборе популяций *A. hololeuca* для сохранения следует опираться на показатели генетического разнообразия (отбирать популяции с более высокими значениями этих показателей), а также на экологические и ботанические данные. Желательно сохранение нескольких популяций из перечисленных выше групп, т.к. внутри групп была отмечена генетическая дифференциация. Например, 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. Для успешного сохранения *A. hololeuca* следует уделить особое внимание сохранению мест обитания этого вида (исключить в районах произрастания выпас скота и добычу мела).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 между результатами, полученными и 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 видов 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 внутривидовому разнообразию полезны при выборе популяций для сохранения.

Уровень генетической дифференциации популяций отличался у разных видов. Наиболее подразделены генетически популяции полыни белойлочной, 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 приурочены 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 бельвалии сарматской. Географически близкие популяции этих видов 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 внутривидового разнообразия, как наиболее уязвимые.

## ВЫВОДЫ

1. Исследовано генетическое разнообразие трех редких видов растений (*Bellevalia 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 бильваллии 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 работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи из перечня рецензируемых научных журналов:

1. Хадеева, Н.В. Оценка состояния популяций гиацинта сарматского *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow в Волгоградской области с помощью молекулярно-генетического маркирования / Н.В. Хадеева, Е.Ю. Яковлева, С.В. Горюнова, А.А. Шишкина, **А.А. Кочумова (Трифонова)**, О.О. Жолобова, О.И. Коротков, А.М. Кудрявцев // Генетика. – 2012. – Т.48. – №5. – С.1-7.
2. **Трифонова, А.А.** Анализ ядерных спейсеров ITS1/ITS2 и вторичной структуры гена 5.8S рРНК у эндемичного вида *Bellevalia sarmatica* и родственных видов подсемейства *Scilloideae* / **А.А. Трифонова**, М.А. Филюшин, Е.З. Кочиева, А.М. Кудрявцев // Генетика. – 2016. – Т.52. – №5. – С.1-6.
3. **Трифонова, А.А.** Анализ вариабельности микросателлитных локусов у редкого и эндемичного вида *Allium regelianum* А.К. Becker ex Пјјин / **А.А. Трифонова**, Е.З. Кочиева, А.М. Кудрявцев // Генетика. – 2017. – Т.53. – №2. – С. 192-200.
4. **Трифонова, А.А.** Низкий уровень подразделенности популяций редкого вида *Allium regelianum* А.К. Becker ex. Пјјин Волгоградской области на основе данных ISSR-анализа / **А.А. Трифонова**, Е.З. Кочиева, А.М. Кудрявцев // Экологическая генетика. – 2017. – Т.15. – №1. – С. 30-37.

### Тезисы докладов:

1. **Кочумова (Трифонова), А.А.** Изучение генетического разнообразия редкого вида *Allium regelianum* А. Becker. / **А.А. Кочумова (Трифонова)**, Н.В. Хадеева, А.М. Кудрявцев // Молодежная конференция «Популяционная генетика и геногеография: наука и практика». Москва. – 2013. – С.20.
2. **Кочумова (Трифонова), А.А.** Анализ генетического разнообразия популяций редких и исчезающих видов растений Волгоградской области / **А.А. Кочумова (Трифонова)**, Н.В. Хадеева, С.В. Горюнова, О.И. Коротков, А.М. Кудрявцев // VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)». Ялта. – 2014. – С.172-173.
3. **Трифонова, А.А.** Анализ генетического разнообразия редкого и эндемичного вида *Allium regelianum* на основе данных NBS- профайлинга / **А.А. Трифонова**, Е.З. Кочиева, А.М. Кудрявцев // VII Международная научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)». Ялта. – 2016. – С.192-193.