

Федеральное государственно автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись М.И.Гладышев
ициалы, фамилия
«___»_____ 20___ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Генетический полиморфизм популяций и филогения сибирских видов р.
Trollius L.

Руководитель _____ профессор, д.б.н. И.Е. Ямских
подпись, дата

Выпускник _____ И.Р. Путилин
подпись, дата

Красноярск 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Общая характеристика и видовое разнообразие р. <i>Trollius</i>	5
1.2 Молекулярные методы изучения полиморфизма растительных популяций	12
1.3 Молекулярно-генетические методы изучения филогении растений... ..	16
1.3.1 Филогенетические деревья.....	17
1.3.2 Алгоритмы выравнивания.....	19
1.3.3 Фильтрация выравниваний	20
1.3.4 Выбор модели нуклеотидных замен	22
1.3.5 Построение филогенетических деревьев	23
ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
2.1 Районы исследования.....	25
2.2 Методика исследований	28
2.2.1 Молекулярно-генетический полиморфизм популяций.....	28
2.2.1.1 Выделение ДНК	29
2.2.1.2 ISSR-PCR метод	30
2.2.1.3 Статистическая обработка данных.....	32
2.2.2 Молекулярная филогения представителей р. <i>Trollius</i>	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	38
3.1 ISSR-PCR анализ	38
3.2 Филогенетический анализ	43
ВЫВОДЫ.....	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46

ВВЕДЕНИЕ

Процесс изучения популяций растений не только вносит вклад в экологию, ботанику, физиологию растений но также имеет и практическую направленность – изучение предпосылок и механизмов для устойчивого существования популяций различных видов растений в естественных фитоценозах (Работнов, 1950). Особенно это актуально для популяций редких и исчезающих видов растений (эндемиков, реликтов и т.д.). Изучение генетических и экологических особенностей отдельных видов растений поможет провести объективную оценку состояния их популяций и в случае необходимости организовать деятельность по их охране и восстановлению естественной среды.

На основании знаний об экологии и морфологии видов можно делать выводы об их видовой принадлежности. Но этого не всегда достаточно. Например, представители р. *Trollius* отличаются высокой степенью морфологической изменчивости, что затрудняет ревизию данного рода (Doroszewska, 1974). Объем рода трактуется исследователями по-разному (Luferov et. al., 2018). В последнее время для решения таксономических проблем используются молекулярные данные, позволяющие оценить степень генетической обособленности близкородственных видов друг от друга, в частности, геномные.

Знание о том, к какому виду относится то или иное растение важно с практической точки зрения, т.к. у каждого вида растений имеются свои биохимические особенности и видоспецифичные вещества, например, белковой природы, которые могут быть использованы для нужд медицины (Gupta, 1988, Chakraborty, 2018), в том числе и традиционной (Rajendran et. al., 2000).

Объектами наших исследований являются популяции видов р. *Trollius*, произрастающие на территории Южной Сибири, в частности *T. asiaticus* L.,

T. vitalii Stepanov., *T. sibiricus* Schipcz., *T. kolonok* Stepanov., *T. altaicus* C.A. Mey и *T. europaeus* L.

Цель работы: проведение сравнительного популяционно-генетического и филогенетического анализов видов р. *Trollius*, произрастающих на территории Южной Сибири

Задачи:

1. Изучить генетический полиморфизм популяций видов р. *Trollius* с помощью ISSR-PCR метода;
2. Определить уровень филогенетических взаимоотношений между популяциями видов р. *Trollius*;
3. Провести филогенетический анализ видов р. *Trollius* с использованием ITS, matK и rbcL маркеров.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика и видовое разнообразие р. *Trollius*

Род Купальница (*Trollius* L.) относится к семейству Лютиковые (Ranunculaceae L.) и включает в себя около 35 видов, произрастающих в областях Северного полушария, но преимущественно в Азии (Трулевич, 2001). Единственный полномасштабный обзор рода и его ревизия представлены в монографии Дорожевской, в которой она выделяет 35 видов и разделяет их на 7 секций: *Pumilotrollius* (*T. pumilus* Don, *T. micranthus* Hand.-Mazz., *T. ranunculoides* Hemsl., *T. vaginatus* Hand.-Mazz., *T. farreri* Stapf, *T. sikkimensis* (Brühl) grad. nov. et comb. nov. и *T. bhotanicus* (Brühl) Mukerjee), *Yunnanotrollius* (*T. yunnanensis* (Franch.) Ulbr. spp. *yunnanensis*, а также такие формы, как f. *yunnanensis*, f. *ubra* Stapf и f. *eupetala* Stapf; spp. *anemonifolius* (Brühl) comb. nov., *T. papaverus* Schipcz., *T. citrinus* Miyabe), *Acailitrollius* (*T. acaulis* Lindl., *T. lilacinus* Bge и *T. afghanicus* Hedge et Wandelbo), *Longipetala* (*T. asiaticus* L., *T. ledebouri* Bchb., *T. chinensis* Bge, *T. hondoensis* Nakai, *T. macropetalus* F. Schm., *T. sibiricus* Schipcz., *T. kytmanovii* Reverd.), *Trollius* (*T. europeaeus* L. var. *europaeus* и var. *transsilvanicus* (Schur) Bl, *T. apertus* (Perf.) Igosh., *T. altaicus* C.A.M. var. *altaicus* и var. *sajanensis* Malyshev, *T. dschungaricus* Reg. и *T. ranunculinus* (Smith) Stearn), *Insulaetrollius* (*T. riederianus* Fisch. et Mey. var. *riederianus* и var. *japonicus* (Miq.) Ohwi, *T. pulcher* Makino, *T. membranostylis* Hulten, *T. chartosepalus* Schipcz. и *T. schipczinskii* Miyabe) и *Laxotrollius* (*T. laxus* Salib. с двумя вариациями – var. *laxus* и var. *albiflorus* Gray). Однако, она указывает, что морфологически эти виды настолько полиморфны, что различить их довольно сложно (Doroszewska, 1974). На территории России выделяется 19-20 видов (Luferov et. al., 2018), из которых наибольшее разнообразие (около 12 видов) представлено в Сибири (Erst et. al., 2018).

Купальницы – это травянистые дикорастущие многолетние растения, входящие в состав луговых травостоев и лесных местностей (Конспект флоры Азиатской России, 2012).

Цветки обоеполые, актиноморфные, довольно крупные (20-50 мм в диам.), одиночные на верхушках стебля и его ветвей. Околоцветник двойной, жёлтый, оранжевый или красно-оранжевый. Чашелистики при плодах опадающие, в числе 5-20(30), от яйцевидных до почти округлых. Лепестки-nectарники значительно более узкие, чем чашелистики, и обычно короче их, оранжевые, в числе 5-20. Тычинки многочисленные, с тонкими нитями. Гинецей апокарпный, из 5-15(20) плодолистиков с многочисленными семязачатками. Плоды из 5-15(20) более-менее сросшихся близ основания или свободных листовок. Семена чёрные, блестящие. Голые многолетники 20-80 см высотой с прямостоячим стеблем и мочковатыми корнями. Прикорневые листья с длинными черешками и пальчато-разделёнными пластинками, из которых самые верхние часто почти сидячие (Цвелёв, 2001). Полный онтогенез купальниц достаточно продолжительный и длится чуть более 50 лет (Акшенцев, 2006).

Растения рода *Trollius* являются лекарственными, обладающими противовирусными (Li et. al., 2002, Cai et.al., 2006) и антибактериальными свойствами (Wang et.al., 2004). Они используются для приготовления отваров и экстрактов для лечения таких заболеваний, как ОРВИ, бронхит, фарингит, острый тимпанит, тонзиллит, а также для лечения афтозных язв в полости рта. Так как отвары из некоторых видов, в частности, *T. macropetalus* способны снижать температуру, их используют для лечения острого отита, лимфангита, конъюнктивита, для снижения симптомов при аппендиците и дизентерии (Witkowska-Banaszczak, 2015). В народной медицине цветки *T. europaeus* используются для лечения цинги, т.к. содержат большое количество витамина С (Gruenwald et al., 2004).

***Trollius asiaticus* L.** Стебель прямой, простой или ветвистый, 10—80 см выс., с 1, реже с несколькими цветками, при основании одетый остатками прошлогодних листьев. Прикорневые листья на длинных черешках, пластинки их в очертании пятиугольные, до основания рассеченные на 5 ромбических сегментов, глубоко надрезанных на неравнозубчатые дольки. Стеблевые листья в числе 1—5, нижние черешковые, верхние сидячие, с пластинками, сходными с прикорневыми, но кверху мельчающими. Цветки крупные, до 5 см в диаметре. Чашелистики оранжево-красные, в числе 10—20, широкоэллиптические или обратнояйцевидные. Лепестки в 2—3 раза длиннее тычинок и равны чашелистикам, оранжево-красные, постепенно от основания кверху расширенные и на верхушке заостренные. Плод из многочисленных листовок, 10—11 мм длиной, с коротким (0.5—1 мм) носиком, у основания загнутым внутрь (Электронный каталог сосудистых растений, 2019). Предпочитает мокрые места на лугах, в леса. Вид распространен в северной части Китая, Казахстана, Монголии и в южной части Сибири (Flora of China, 2019).

Вегетация растения длится около 4 месяцев – с конца мая до середины сентября. Рост надземных побегов происходит довольно быстро: длина прикорневых листьев достигает до 25 см (в июне) и 11-14 см в мае за первые 5-7 дней вегетации (Фризен, 1993).

Данных по использованию различных экстрактов или отваров из растений данного вида не было обнаружено.

***Trollius vitalii* Stepanov.** Стебель простой или ветвистый, 1-2 цветковый. Листья в основании стебля чешуевидные. Прикорневые листья в числе 1-4, более или менее длинночерешковые (до 1/2 стебля), верхние стеблевые – сидячие. Пластинка листа пальчато-пятираздельная на ромбические, глубоко надрезанные (на 3/4 – 5/6) доли. Цветки крупные 4-5 см в диаметре. Чашелистики ярко-оранжевые (в гербарии желтеющие), снаружи красноватые, в числе 16-25, яйцевидно-эллиптические, вверху

зубчатые, 2-3 см длиной, 1,5-3 см шириной, лепестки линейные 15-20 мм длиной, 1-1,5 мм шириной, кверху заострённые, почти равные или в 1,5 раза короче чашелистиков и в 2 раза длиннее тычинок. Завязи искривлённые 3-3,5 мм. Столбик по длине равен завязи. Листовки 1-1,5 см длиной с носиком 3-5 мм длиной, отогнутым в сторону от оси листовки на 30-90°. Многолистовка около 1 см в диаметре (Степанов, 1994).

Купальница Виталия характерна для субальпийских лугов, но также встречается по берегам рек, озёр, ключам и верховым болотам.

Нет сведений о медицинском применении различных экстрактов купальницы Виталия, т.к. вид на данный момент имеет спорное систематическое положение, что мешает проводить различные биохимические анализы данного вида купальниц.

Вид считается уязвимым, и его численность сокращается вследствие влияния антропогенного фактора – строительства дорог, туристических зон отдыха и сбора растения для букетов (Красная книга Красноярского края, 2012).

Н.В. Степанов, описывая *T. vitalii* Stepanov – купальнику Виталия, выводит родство от восточносибирского *T. bargusinensis* Sipl. (Степанов, 1994), однако ранее Н.В. Фризен в монографической обработке рода *Trollius* для Флоры Сибири не отделяет *T. bargusinenses* от *T. asiaticus* (Фризен, 1993). Так же Д.Н. Шауло говорит о том, что в принципе имеющиеся данные о флоре высокогорий Западного Саяна не позволяют выделить имеющиеся таксоны в роде *Trollius* в ранг видов (Шауло, 2006). В своём исследовании Л.В. Буглова указывает на то, что *T. vitalii* Stepanov. не выделяется в отдельных вид, указывая на морфологическую неоднородность собранных образцов, на основании которых данные организмы были выделены в отдельный вид. Так же указывается, что ряд образцов находится в пределах изменчивости *T. asiaticus* L. В этой же работе результаты генетических

исследований указывают на то, что генетически эти два вида настолько близки, что разделять их на два родственных вида нет никаких оснований (Буглова, 2018).

***Trollius kolonok* Stepanov.** Стебли около 60 см в высоту, до 100 см при плодоношении, простые или разветвленные выше середины, 1–3-цветковые. Базальные листья с черешком 40–70 см; листовая пластинка пятиугольная, до 16–26 см в диаметре; центральный сегмент ромбический, 3-раздельный, по краю надрезанно-зубчатый; боковые сегменты косовееровидные. Стеблевые листья похожи на базальные, короткочерешковые или сидячие. Цветок верхушечный (5)7–8(9) см в диам. Чашелистики в числе 10–12(18), тёмнооранжевые, широко обратнояйцевидные или обратнояйцевидные, 3,4–4 × 2–3,2 см, края целые или неправильно зубчатые в верхней части. Лепестки лопатчато-линейно-ланцетные, длиннее тычинок, но короче чашелистиков, 25–30 × 4–5 мм, 12–14-жилковые. Тычинки около 1,5–1,7 см. Листовок 18–20, стилодий до 3–4 мм дл.

Основные места обитания – субальпийские высокотравные луга, которые обычны у верхней границы леса и ниже – по заболоченным долинам и среди редколесий. Купальница колонковая может являться доминантом в травостое субальпийских лужаек или быть представленной менее обильно.

По данному виду так же нет сведений о медицинском применении различных частей и экстрактов, т.к. вид является недавно открытый, что не дало достаточно времени для того, чтобы проводить различные биохимические исследования.

Как отмечает сам автор, одним из важных морфологических признаков этого вида является строение листовок, имеющих довольно длинные носики при плодах. Близкие по длине носики отмечены у *T. vitalii*, но во время цветения и в начале плодоношения у этого вида они собраны в компактную структуру, благодаря чему гинецей имеет коническую форму и выглядит как одно целое, а отдельные листовки при этом имеют серповидную форму.

Гинецией у описанного с Кузнецкого Алатау вида состоит, как и у *T. asiaticus*, из более или менее обособленных листовок, но с более длинными вверх направленными носиками. Кроме особенностей гинецея, найденные растения отличаются крупными лепестками до 5 мм шир. с 12–14 жилками, большей высотой растения и более крупными цветками (Степанов, 2018).

***Trollius sibiricus* Schipcz.** Стебель 20—35(40) см высотой, простой, 3-листный, одноцветковый. Пластиинки листьев в очертании округлые, пальчато-5-раздельные, с ромбическими долями, рассеченными на пальчато-зубчатые дольки. Цветоножки 1—1.5 см длиной, при плодоношении удлиняющиеся. Цветки 3—4 см в диаметре. Чашелистики в числе 9—12, овально-ромбические или овально-обратнояйцевидные, желто-оранжевые. Лепестки линейно-ланцетные, на верхушке закругленные, равны или чуть длиннее тычинок, оранжевые, 3-нервные. Пестики около 5.5 мм длиной, с беловатыми, почти прямыми столбиками, равными по длине завязи. Листовки 7—11 мм дл. Носик 2—2.5 мм длиной, прямой, на верхушке крючковидно загнутый (Электронный каталог сосудистых растений, 2020).

Купальница сибирская – влаголюбивый вид, встретить её можно на болотистых лугах, по берегам рек и ручьёв. Произрастает она в Бурятии, Якутии и Красноярском крае, является эндемичным растением для Восточной Сибири.

Отвары из цветов используют в народной медицине для лечения заболеваний желудка, печени, а также при эпилепсии, стенокардии, чесотке, отеках различной этиологии, геморрое, цинге, фурункулезе.

***Trollius altaicus* C.A. Mey.** Травянистый, кистекорневой многолетник. Цветки шаровидные, оранжевые или золотисто-желтые, снаружи иногда красноватые, широкояйцевидные, крупные, диаметром до 5 см, слегка открытые. Чашелистики в количестве 10—20. Лепестки-nectарники оранжевые, в 2 раза короче чашелистиков, на верхушке закругленные, нерасширенные, узкие. Тычинки и пестики многочисленные. Пыльники

пурпурные. Во время цветения в центре видны черные пестики. Прикорневые листья на черешке пальчато-раздельные, собраны в розетку 25—30 см высотой. Стебель простой, реже ветвистый, высотой до 80—90 см. Стеблевые листья сидячие. Цветет в зависимости от места обитания в мае, июне. В полосе контакта с купальницей азиатской и с купальницей джунгарской на Тянь-Шане образует гибриды. Плоды-листовки расположены шарообразной головкой. Носик отогнут наружу. Семена гладкие, черные, с едва намеченными гранями.

Растет по верхней границе лесного пояса, на субальпийских и альпийских лугах. В пихтовых лесах при массовом цветении создает контрасты оранжевого и густо-зеленого цвета (Купальницы Сибири и Средней Азии, 2020).

Экстракты алтайской купальницы обладают ингибирующим эффектом на развитие (*in vitro*) таких бактерий, как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus pneumoniae*, соответственно, могут ослаблять эффект от заболеваний, которые они вызывают (Yan, 2020).

***Trollius europaeus* L.** Стебель 25—60 см выс., простой, одноцветковый. Листья пальчато-рассеченные на 5 ромбических, 3-надрезанных и острозубчатых доли; верхние сидячие, нижние на черешках. Цветок 2.5—3 см в диам., почти шаровидный, закрытый. Чашелистики в числе 12—15, округло-яйцевидные, сильно вогнутые, прикрывающие один другого, лимонно-желтые. Лепестки узкие, линейно-продолговатые, 6—10 мм дл., оранжевые, одинаковой длины с тычинками, которые почти вдвое короче чашелистиков. Листовки многочисленные, 8 мм дл., с коротким носиком (до 1 мм), круто загнутым внутрь.

Данный вид обитает в негустых смешанных и березовых лесах, по опушкам, кустарникам, на сыроподобных лугах.

В медицине используется в качестве источника витамина С для лечения и предотвращения цинги (Maciejewska-Rutkowska, 2007). Однако других данных об использовании в медицине, кроме исследований некоторых флавоноидов, обладающих антивирусным и антимикробным действиями (Witkowska-Banaszczak et. al., 2015) найдено не было.

1.2 Молекулярные методы изучения полиморфизма растительных популяций

Исследование генетического полиморфизма популяций растений связано с изучением различных маркеров, являющихся непосредственной реализацией генетической информации: это белковые маркеры и маркеры ДНК (Созинов, 1985).

В качестве белковых маркеров в основном используются изоферменты (Markert et. al., 1959) и запасные белки семян (Osborne, 1907). Однако, работа с белками гораздо более трудная и менее репрезентативная, нежели работа с нуклеиновыми кислотами. В довесок, тестировать генетический полиморфизм не на уровне экспрессии гена, а на геномном уровне гораздо более правильный подход (Мухина, 2011).

Изучение генетического полиморфизма на уровне генома можно условно разделить на две большие группы методов: полногеномные и фрагментные. Так как работа с полногеномными данными является очень дорогостоящей и требующей определённых навыков, было решено сделать большой упор на фрагментный анализ нуклеотидных последовательностей.

Фрагментный анализ ДНК – амплификация ДНК с использованием праймеров, специфичных к определённым участкам генома, с последующим разделением амплификата в электрическом поле (электрофорез).

С помощью фрагментного метода анализа ДНК можно реализовать следующие исследования:

- Генетическое типирование микросателлитных повторов - SSR (Morgante et. al., 1993) или участков между этими повторами - ISSR (Zietkiewicz et. al., 1994)
- Генотипирование с использованием SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Sylvänen, 2001)
- Фингерпринтинг (Vos, 1995) – AFLP, RAPD, SSR, ISSR и т.д.
- Относительная флуоресценция и др.

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs или «снип») очень распространены и по оценкам встречаются в 1 из 1000 случаев в геномах живых организмов (рис. 1). В зависимости от того, где находится однонуклеотидный полиморфизм, он может иметь различные последствия на фенотипическом уровне. SNPs регулярно анализируются для диагностических целей и целей выяснения генетической вариации в популяциях (Haica, 1999). Большинство SNPs находится в некодирующй части генома, что говорит о том, что данный полиморфизм генотипический совершенно никак не проявляется в фенотипе. Так же SNPs могут быть использованы в качестве маркеров, для идентификации некоторых генов (Risch et. al., 1996).

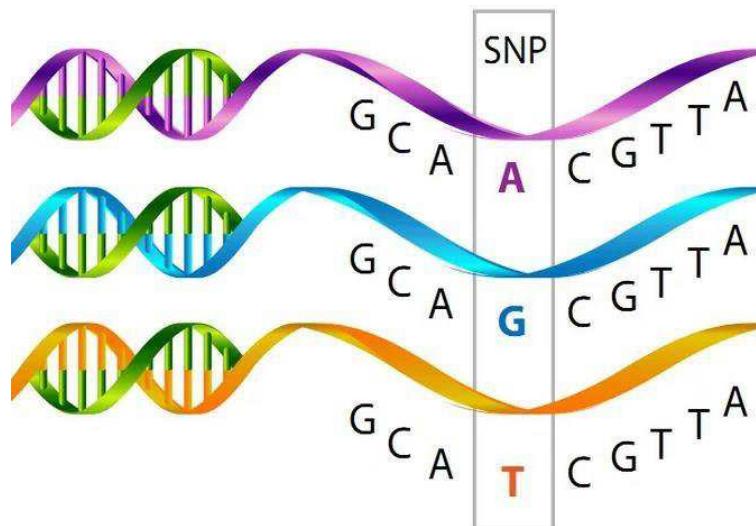


Рисунок 1 – Однонуклеотидный полиморфизм

Метод AFLP-анализа относится к категории селективных методов амплификации фрагментов, которые основаны на лигировании адаптеров с геномными рестрикционными фрагментами с последующей амплификацией методом ПЦР (Savelkoul, 1999). ДНК одновременно разрезается двумя рестриктазами (*Eco*I и *Mse*I), узнающими 4 и 6 оснований соответственно, и получаются фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем полученная геномная ДНК лигируется с адаптером, содержащим «липкие» концы рестрикционных сайтов (комплémentарные тем самым 3'-концам рестрицированной ДНК). После этого проводится две последовательные амплификации. В первой используются праймеры, полностью комплементарные адаптерам *Eco*RI и *Mse*I. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов амплификации между адапторами *Eco*RI и *Mse*I, которые трудно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэтому во второй ПЦР праймеры с адапторами *Eco*RI и *Mse*I содержат на 3'-конце от 1 до 3 дополнительных оснований, не комплементарных адапторам, для селективной амплификации (Рис. 2). Разделение фрагментов ДНК выполняется в полиакриламидном геле, с радиоактивной или флуоресцентной меткой (Vos, 1995).

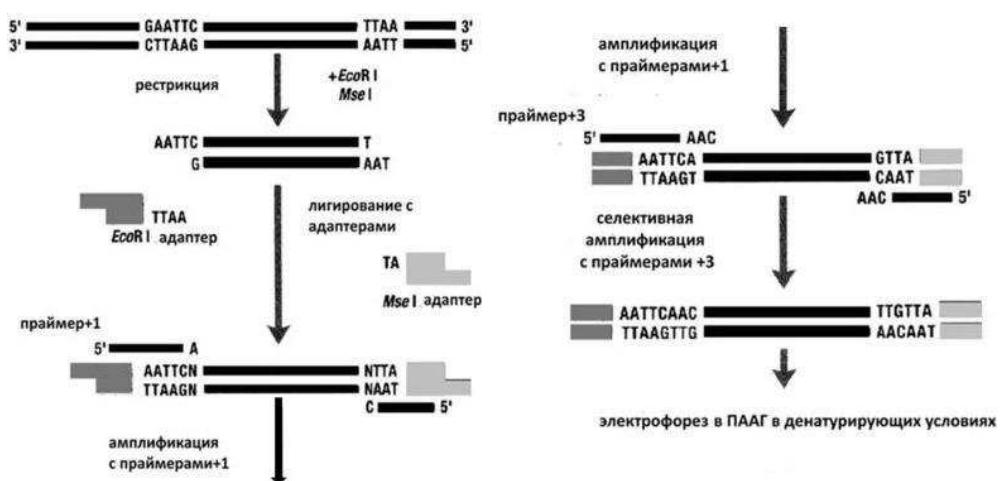


Рисунок 2 – Метод AFLP анализа

Чтобы выполнить анализ RAPD, один олигонуклеотид произвольной последовательности смешивают с геномной ДНК в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы и подходящего буфера и затем проводят реакцию амплификации. Продукты реакции зависят от последовательности и длины нуклеотида, а также от условий реакции. При соответствующей температуре отжига во время термического цикла единственный праймер связывается с сайтами на противоположных цепях геномной ДНК, которые находятся в пределах амплифицируемого расстояния друг от друга (например, в пределах нескольких тысяч нуклеотидов), и получается отдельный сегмент ДНК. Наличие или отсутствие этого специфического продукта, хотя и амплифицированного произвольным праймером, будет диагностическим для сайтов связывания олигонуклеотидов в геномной ДНК. На практике реакцию амплификации ДНК повторяют на ряде образцов ДНК с несколькими различными праймерами в условиях, которые приводят к амплификации разных участков ДНК. Часто один праймер можно использовать для идентификации нескольких полиморфизмов, каждый из которых отображается на свой локус (Williams, 1995).

Было показано, что геномы эукариот богаты простыми последовательностями, которые состоят из отрезков tandemно повторяющихся нуклеотидных мотивов, которые могут быть короткими от 1 до 4 (Braaten, 1988). Именно на этом свойстве и основан метод SSR-анализа. Особенностью метода является то, что перед тем, как производить дизайн праймеров для амплификации, предварительно необходимо знать последовательность ДНК, которая находится перед SSR-участком. Далее, после подбора и синтеза праймеров происходит амплификация и дальнейшее разделение полученного амплификаата в электрическом поле (электрофорез) (Morgante et. al., 1993).

Метод исследования межмикросателлитных последовательностей (ISSR – Inter sequence short repeats) – это техника, которая позволяет

использовать микросателлитные участки генома в качестве праймеров для проведения ПЦР и последующего разделения и анализа продуктов амплификации (Рис. 3) (Reddy, 2002). Данный метод генетического анализа используется для изучения генетического разнообразия, филогении, эволюционной биологии, популяционной генетики и т.д. на основе анализа всего ядерного генома и не требует ни секвенирования, ни клонирования. Это быстрый, простой и эффективный метод, который сочетает в себе положительные свойства методов SSR-PCR (Short sequence repeats), AFLP-PCR (Amplified fragment length polymorphism) и RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA) (Staub et al., 1996). Так же ISSR-PCR методу не свойственны такие лимитирующие факторы, как высокая себестоимость, свойственная AFLP-анализу, малый выход продуктов реакции свойственный RAPD-методу и требование знаний последовательности генома для дизайна праймеров, свойственный SSR-методу (Zietkiewicz et al., 1994).

Метод тесно ассоциирован с проведением ПЦР, где в качестве праймеров используются микросателлитные повторы, довольно часто встречающиеся в геномах эукариот, в частности, в геномах растений (Richard et al., 2008).

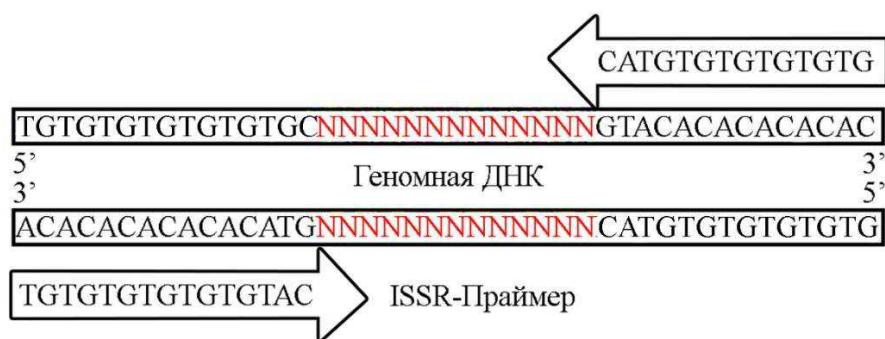


Рисунок 3 – Комплементарность ISSR-праймеров

1.3 Молекулярно-генетические методы изучения филогении растений

Филогенетика – неотъемлемая часть биологических исследований, особенно если речь идёт об изучении видового разнообразия. Филогенетика важна для разрешения различных биологических вопросов, таких как

взаимоотношения между видами или родами, происхождение и расселение видов. Этот раздел науки необходим для решения следующих вопросов:

- Классификация ныне живых и вымерших существ;
- Описание процессов видообразования;
- Перенос свойств более изученных объектов на менее изученные;
- Установление систематической принадлежности объектов.

В последнее время, в эру геномных данных, для изучения филогенетических особенностей организмов используются молекулярные данные, так как биополимеры есть у всех организмов (к тому же, состоят они из одинаковых элементов). Иногда, последовательности ДНК это единственное, что известно об организме. Также, они используются в комбинации с морфологическими данными. Иными словами, анализ биологических последовательностей необходим при недостатке данных, а также для подтверждения/опровержения данных морфологических.

1.3.1 Филогенетические деревья

Дерево, или *дендрограмма* (в том числе, филогенетическая) – связанный граф без цикла, обычно имеющий направленность. Если же говорить о биологической стороне этого термина, то это некоторый граф, отражающий эволюционные взаимосвязи между различными видами, имеющими общего предка. Филогенетическое дерево имеет в себе такие структуры, как *узлы* (точки объединения конкретных видов в клады), *клады*, или *монофилетические группы* (группы организмов, содержащие общего предка и его прямых потомков), *полифилетические группы* (группы организмов без включения общего предка), *парафилетические группы* (группы организмов, включающие общего предка и не всех потомков), *OTUs* (operational taxonomic unit – конкретный вид) или *листья*, и *ветви* (рис. 4) (Saitou et. al., 1987).

Иногда, при построении дендрограмм возникают такие ситуации, когда к общему предку сходится больше двух видов – политомии. Политомии бывают двух типов: *soft* (при недостатке данных) и *hard* (при быстром видеообразовании).

Дендрограммы, в свою очередь делятся на несколько типов, в зависимости от укоренения и информативности длинны ветвей:

- Относительно укоренения:
 - Укоренённые – если мы предполагаем общего предка;
 - Неукоренённые – если мы общего предка не предполагаем или не знаем;
- Относительно данных о длине ветвей (Avise, 2009):
 - Кладограмма – длина ветвей ничего не значит;
 - Филограмма – длина ветвей имеет какое-то значение:
 - Аддитивная – длина ветвей указывает на число замен (нуклеотидных или аминокислотных);
 - Ультраметрическая – длина ветвей указывает на время, в течении которого происходила эволюция таксона.

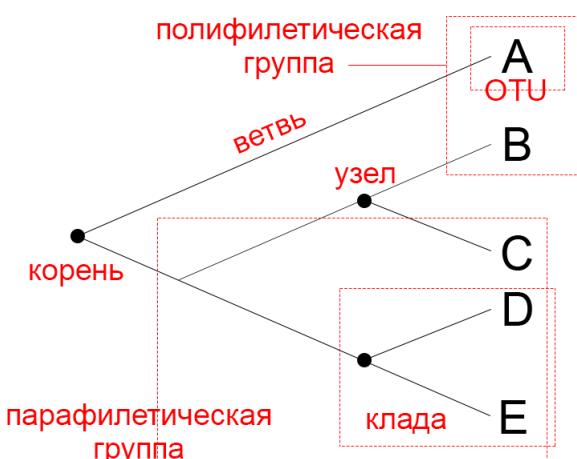


Рисунок 4 – Схематическое филогенетическое дерево

1.3.2 Алгоритмы выравнивания

Выравнивание – биоинформатический метод, основанный на расположении двух и более биологических последовательностей друг под другом так, чтобы видеть похожие участки в этих последовательностях. Алгоритмы выравнивания в первую очередь делятся на:

- Попарное
 - Глобальное (*Global*) – наилучшее выравнивание от начала и до конца (Needleman et. al., 1970);
 - Полуглобальное (*Semi-global, glocal*) (Brudno et, al., 2003);
 - Локальное (*Local*) – выравнивание похожих участков внутри последовательности (Smith et. al., 1981).
- Множественное

Алгоритмы множественного выравнивания построены на методах попарного глобального выравнивания.

CLUSTAL – наиболее распространённый алгоритм множественного выравнивания (Larkin et. al., 2007). Данный алгоритм отличается тем, что для поиска наилучшего выравнивания используются алгоритмы NJ – *Neighborhood-Joining* (Saitou et. al., 1987). Так же, выравнивание происходит от листьев к корню. Главной проблемой данного алгоритма является то, что если в выравнивании появляется пропуск, то в дальнейшем от него невозможно избавиться (рис. 5). Для того, чтобы избавиться от накопления ошибок, зачастую используются итеративные методы.

К наиболее часто используемым методам итеративных алгоритмов множественного выравнивания относятся *MAFFT*, *T-Coffee* и *MUSCLE*. Эти алгоритмы являются более точными и быстрыми, т.к. в качестве финального выравнивания используют консенсусное выравнивание, полученное в результате большого количества повторений.

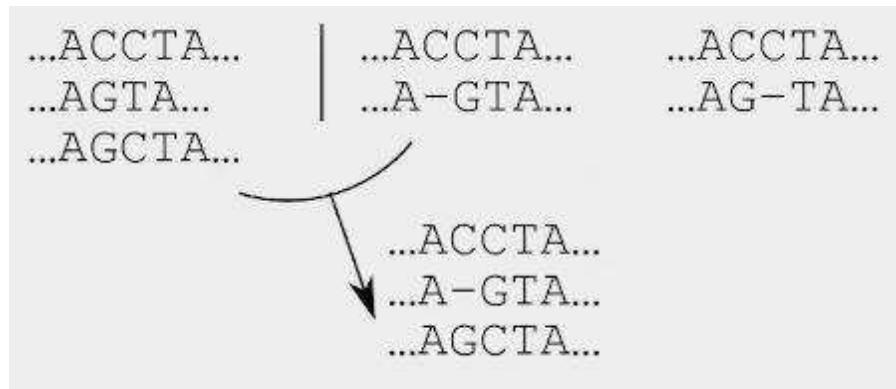


Рисунок 5 – Проблема с накоплением ошибки алгоритмов CLUSTAL

MAFFT – один из наиболее часто используемых итеративных алгоритмов множественного выравнивания. Данный метод, в сравнении с другими, является наиболее быстрым (Katoh et. al., 2005). *T-Coffee* является наиболее точным (Notredame et. al., 2000). Если же выбирать между скоростью и точностью, то наиболее оптимальным вариантом будет выбор *MUSCLE*, так как этот алгоритм является быстрее *T-Coffee*, быстрее и точнее *Clustal* (Edgar, 2004).

Алгоритм состоит из 3 этапов: прогрессивный набросок, улучшенный прогрессивный набросок и уточнение. На этапе прогрессивного наброска алгоритм производит предварительное множественное выравнивание, делая упор на скорость. На следующей стадии используется расстояние Кимуры (*Kimura distance*) для переоценки имеющегося дерева, чтобы произвести черновое выравнивание, где упор сделан на точность. На заключительной стадии уточняется второе выравнивание. В конце этого доступно несколько выравниваний. Перед началом выполнения алгоритма нужно указать количество итераций – именно столько раз будут произведены второй и третий этап и в конце, в качестве результата будет выведено дерево, являющееся выровненным наиболее лучшим образом (Edgar, 2004).

1.3.3 Фильтрация выравниваний

Фильтрация выравниваний – процесс вырезания участков с наибольшим количеством пропусков для того, чтобы повысить

информативность и увеличить скорость построение дерева. Однако, встаёт вопрос о том, нужно ли в действительности «фильтровать» выравнивания? Рассмотрим точки зрения на этот счёт.

Аргументы против. Во-первых, по итогу может быть отброшена значительная часть данных, часть из которых может быть информативной. В некоторых случаях сами инделы (инсерции-делеции) являются информативными, так как вырезаются в процессе фильтрации. Более того, исключение данных не всегда приводит к выводам, более близким к действительности. Во-вторых, стоит помнить, что вне зависимости от выбора алгоритма выравнивания, всегда имеется определённая вероятность ошибки, которая в результате может привести к тому, что не выровненные участки будут вырезаны (Wong et. al., 2008).

Аргументы за. Согласно результатам исследований, в среднем, деревья, полученные на основе фильтрованных выравниваний, обычно лучше, чем полученные на основе нефильтрованных. Также, было показано, что если использовать для выравнивания слишком длинные последовательности, содержащие большое количество мутаций, которые в целом не влияют на структуру белка и вырезаются в процессе созревания пре-мРНК, возрастает вероятность построения ошибочного дерева, т.к. количество факторов, влияющих на построение становится гораздо больше (Tan et. al., 2015).

Наиболее часто используемой программой для фильтрации является *GBlocks*.

GBlocks – это программа, которая удаляет плохо выровненные последовательности и расходящиеся области выравнивания последовательностей ДНК и аминокислот. Программа выбирает блоки аналогично тому, как это раньше делалось вручную. Выбранные для удаления блоки должны удовлетворять определённым требованиям в отношении отсутствия больших сегментов неконсервативных позиций,

отсутствия позиций с разрывами, что делает выравнивание более подходящим для филогенетического анализа (Castresana, 2000).

1.3.4 Выбор модели нуклеотидных замен

Выбор модели нуклеотидных замен это одна из самых важных вещей в молекулярной филогенетике, так как эволюционные процессы в разных группах организмов протекают по разным сценариям. Выбор модели необходим для того, чтобы строить филогенетические деревья методом ML и с помощью байесовской статистики (Sullivan et. al., 2005). Существуют следующие модели нуклеотидных замен (наиболее часто используемые):

- Jukes and Cantor (*JC*, *JC69*) – равная частота замен и частота оснований (Jukes et. al., 1969);
- Felsenstein (*F81*) – равная частота замен, но разная частота оснований (Felsenstein, 1981);
- Kimura 1980 (*K89*, *K2P*) – неравная частота транзиций и трансверсий, равная частота оснований (Kimura, 1980);
- Hasegawa, Kishino and Yano (*HKY*, *HKY85*) – неравная частота транзиций и трансверсий, неравная частота оснований (Hasegawa et. al., 1985);
- Tamura and Nei (*TN*, *TN93*) – тоже самое, что и *HKY*, однако разная частота замен пуриновых оснований на пиримидиновые и наоборот (Tamura et. al., 1993)
- Kimura 1981 (*K81*, *K3P*) – три типа замен и одинаковая частота оснований (Kimura, 1981);
- General time reversible (*GTR*) – неравная частота и замен и оснований, однако равная частота замен между пуринами и пиримидинами (Tavare, 1986) и другие.

Выбор модели нуклеотидных замен происходит зачастую в таких программах, как jModelTest2 (Darriba et. al., 2012) и IQTree (Nguyen et. al., 2015). Критерием достоверности являются Bayesian Information Criterion (*BIC*) (Chen et. al., 1998) и Akaike Information Criterion (*AIC*) (Akaike, 1976). Наиболее часто в качестве решающего критерия выбирают *BIC*, так как он работает с известными моделями, тогда как *AIC* находит неизвестную модель, и сравнивает её с уже имеющимися (*AIC* и *BIC* 2020, 2020).

1.3.5 Построение филогенетических деревьев

Построение филогенетических деревьев является закономерным продолжением предыдущих шагов. Методы построения деревьев можно разделить на две группы:

Методы расстояний. Характеризуют каждую последовательность как точку в системе координат, затем находят расстояние между координатами и это число является расстоянием

- Невзвешенное попарное сравнение (*UPGMA*) (Sneath, 1973);
- Присоединение ближайшего соседа (*NJ*);
- Метод наименьших квадратов (*LS*);
- Минимальная эволюция (*ME*) (Rzhetsky et. al., 1993);

Дискретные методы используют максимум информации о последовательности – состав, длина, инделы и т.д.

- Максимальная парсимония (*MP*) (Goodman et. al., 1977);
- Максимальное правдоподобие (*ML*);
- Байесовский метод (*MB*);

Наиболее часто в статьях используются *ML* и *MB*, и в последние результаты сравнивают. *MP* используется реже, так как менее биологически

оправдан, т.е. исходит из того, что мутации в последовательностях всегда невыгодны для организма (Khan, 2008). Методы расстояний используются в качестве построения инициального дерева, относительно которого и идёт расчёт о наиболее правильной дендрограмме.

ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Районы исследования

Исследования проводились в пределах Красноярского края, Иркутской области, Республики Бурятия. Основная часть исследований проведена в северо-восточной части Западного Саяна (Ермаковский район). Часть сборов гербарных материалов произведенав пределах Красноярской лесостепи (Емельяновский район), в пределах республики Хакасия (Орджоникидзевский и Бейский районы) а также на восточном и западном побережьях оз. Байкал в пределах Иркутской области (Слюдянский и Шелеховский районы).

Окрестности Красноярска располагаются в Красноярско-Канской провинции и относятся к Красноярскому округу. Тектоническая основа этой провинции – мезо-кайнозойский прогиб края Сибирской платформы на контакте со структурами Восточного Саяна. Данная провинция является самой низкой краевой частью Среднесибирского плоскогорья. В рельефе выделяются две обширные холмистые равнины: Приенисейская (западная) и Канская (восточная) (Кириллов и др., 1962).

Климат Красноярска умеренно континентальный (Баженова, 2006). Средняя годовая температура воздуха – 0,5-0,6°C, средняя температура января -28,7°C, июля - +15,7°C. Годовое количество осадков колеблется от 338 до 380 мм при довольно резкой разнице в распределении их между основными сезонами. Зима малоснежная, с частыми оттепелями. Строительство ГЭС привело к изменению гидротермического режима р. Енисей, следовательно, температура воздуха в холодное время года стала на 2-4°C выше, а в тёплое время года на 2-3,3°C ниже (Антипова и др., 2016).

Характер растительного покрова г. Красноярска обусловлен местонахождением его территории близ границы лесостепной и таёжной природных зон и антропогенным воздействием. Также, основным фактором,

обуславливающим развитие различных типов растительности, является климат, в особенности количественные показатели тепла и влаги. Мощным трансформатором всех климатических факторов выступает рельеф, он определяет размещение растительных сообществ. Существенный отпечаток на закономерности распределения растительности накладывает химический состав почвообразующих пород (Шумилова, 1962).

Западный Саян – это горная система, расположенная в пределах Южной Сибири, на юге Красноярского края и севере Тувы. С запада ограничена Шапшальским хребтом Восточного Алтая и Абаканским хребтом Кузнецкого Алатау (Енисейский энциклопедический словарь, 1998). Западный Саян представляет собой сильно расчленённый горный массив, широкой полосой простирающийся от истоков р. Абакана в северо-восточном направлении, до верховьев р. Казыра, где соединяется с Восточным Саяном (Красноборов, 1976).

Климат Западного Саяна – резко континентальный с продолжительной и холодной зимой. Средние температуры января в горах до $-25,9^{\circ}\text{C}$, в котловинах – до $-34,9^{\circ}\text{C}$. Средняя температура июля от $12,3-12,6^{\circ}\text{C}$ (в горах), до 10°C (в котловинах). Максимум осадков – в июле, минимум – в феврале. Значительная мощность снежного покрова на северном макросклоне Западного Саяна, особенно на хребте Ергак-Таргак-Тайга, способствует активному проявлению лавинной деятельности. В высокогорьях много снежников, сохраняющихся в течении всего лета (Большая российская энциклопедия, 2020).

В распределении ландшафтов чётко выражены высотно-поясные закономерности. Поясность представлена степным, лесостепным, подтаёжным, черневым таёжным, субальпийским и альпийским поясами (Назимова и др., 1981).

Климат северного макрослона Хамар-Дабана имеет некоторые океанические черты. Средняя температура воздуха на побережье в январе -

18°С, в горах -19°С. Лето прохладное и влажное. Средняя температура июля 14,1°С.

На северном макросклоне Хамар-Дабана, который отличается высокой влажностью, мощным снеговым покровом и непромерзающими почвами, лесной пояс, в основном, представлен темнохвойной кедрово-пихтовой тайгой. На отдельных участках склона преобладают кедровые леса различных типов. Предгорные террасы, протянувшиеся вдоль берега Байкала, заняты смешанными лесами со значительным участием березняков и верховых сфагново-осоковых болот (Зоогеография, 2020).

Местообитания изучаемых популяций жарков приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Изучаемые популяции видов р.*Trollius*

№	Название сообщества, местоположение
ТА-1	<i>Trollius asiaticus</i> L. Сосново-елово-берёзовый лес осоково-разнотравный (окр. д. Крутая, Емельяновский район, Красноярский край)
ТА-2	<i>Trollius asiaticus</i> L. Сосновый лес орляково-разнотравный (окр. п. Майна, устье р. Уй, Бейский район, Республика Хакасия)
ТА-3	<i>Trollius asiaticus</i> L. Пихтово-берёзовый лес широкотравно-злаковый (окр. п. Танзыбей, Ермаковский район, Красноярский край)
ТА-4	<i>Trollius asiaticus</i> L. Березняк с елью разнотравно-осоковый (пойма р. Иджим Усинской котловины, Ермаковский район, Красноярский край)
ТА-5	<i>Trollius asiaticus</i> L. Березняк с примесью сосны разнотравно-злаковый (ст. Глубокая, Шелеховский район, Иркутская область)
ТА-6	<i>Trollius asiaticus</i> L. - (окрестности посёлка Жаровск, Курагинский район, Красноярский край)
ТА-7	<i>Trollius asiaticus</i> L. Редкостойный березняк злаково-высокотравный (долина р. Сарала, район Ивановских озёр, Орджоникидзевский район, Республика Хакасия)
TV-1	<i>Trollius vitalii</i> Stepanov. Субальпийский разнотравный луг (Природный парк Ергаки, район ручья Горного, Ермаковский район, Красноярский край)

Окончание таблицы 1

№	Название сообщества, местоположение
TV-2	<i>Trollius vitalii</i> Stepanov. Субальпийское пихтовое редколесье (Природный парк Ергаки, смотровая площадка, Ермаковский район, Красноярский край)
TS-1	<i>Trollius sibiricus</i> Schipcz. Заболоченный разнотравно-злаковый луг (дол. р. Паньковка, Слюдянский район, Иркутская область)

Географическое распределение популяций в пределах Красноярского края, республики Хакасии и Иркутской области представлено на рисунке 6.

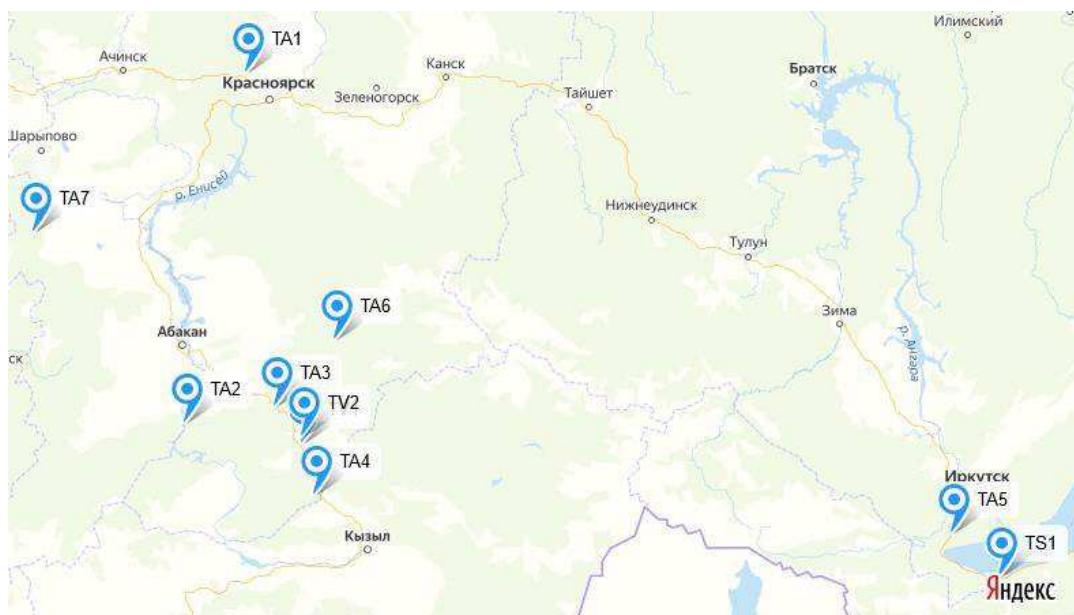


Рисунок 6 – Географическое распределение популяций купальнищ

2.2 Методика исследований

2.2.1 Молекулярно-генетический полиморфизм популяций

В ходе работы была использована ДНК из 10 популяций различных видов р. *Trollius*: 7 популяций *T. asiaticus*, 2 популяции *T. vitalii* и одна популяция *T. sibiricus*. В каждой популяции случайным образом были выбраны по 10 отдельных экземпляров, заведомо не являющихся клонами .

2.2.1.1 Выделение ДНК

Выделение ДНК производили из 30-40 г сухой гомогенизированной растительной ткани с использованием СТАВ-буфера (2% СТАВ, 1,4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-HCl pH 8) (Doyle et al., 1987).

Протокол выделения:

- 1) Растереть 30-40 г. высушенного образца в ступке пестиком. Перенести образец в 1,5 мл. пробирку.
- 2) Добавить 1000 мкл СТАВ 2%-буфера и поместить в термостат на 2,5 часа при 65°C.
- 3) Открутить в центрифуге при 13000 оборотов/мин. в течение 20 минут при 20°C.
- 4) Отобрать 700 мкл. супернатанта в чистую пробирку, добавить равное количество охлаждённого фенол-хлороформа, встряхнуть смесь на вортексе.
- 5) Открутить в центрифуге при 13000 оборотов/мин. в течение 20 минут при 20°C.
- 6) Отобрать 600-650 мкл. супернатанта в чистую пробирку, добавить равное количество охлаждённого хлороформа, встряхнуть смесь на вортексе.
- 7) Открутить в центрифуге при 13000 оборотов/мин. в течение 15 минут при 20°C.
- 8) Повторить пункты 6-7 ещё раз с теми же объёмами (по возможности).
- 9) Отобрать в чистую пробирку 500 мкл. супернатанта, добавить равное количество охлаждённого изопропанола, перевернуть пробирку в руках 3-4 раза для гомогенизации, поместить в морозильную камеру на 40 минут. В это же время поставить центрифугу на охлаждение (холостой запуск при 4°C на 15 минут).

- 10) Открутить на центрифуге при 13000 оборотов/мин. в течение 15 минут при 4°C.
- 11) Слить жидкость (следить за осадком), добавить 700 мкл. 80%-ного этилового спирта, встряхнуть на вортексе.
- 12) Открутить на центрифуге при 13000 оборотов/мин. в течение 10 минут при 4°C.
- 13) Повторить пункты 11-12 ещё 2 раза.
- 14) Спирт слить и оставить ДНК в открытой пробирке для сушки (достаточно 1 часа).

Высохшую ДНК растворили в 40 мкл дистиллированной воды.

2.2.1.2 ISSR-PCR метод

Микросателлитные повторы, или микросателлиты – короткие ди-, три-, тетра- и реже пентануклеотидные tandemные повторы, обычно длиной в 16-25 пар нуклеотидов. Соответственно предварительный дизайн праймеров становится намного легче, ведь в качестве праймеров можно использовать олигонуклеотидные последовательности, комплементарные микросателлитным повторам, на конце которых будут расположены 1-3 так называемых «якорных» нуклеотида, которые будут комплементарны межмикросателлитному участку (Gupta et al., 1994).

В рамках популяционной генетики данный анализ подходит больше для поиска генетических расстояний между популяциями внутри одного вида (Qian et al., 2001; Tanya et al., 2011). В том числе данный анализ подходит и для видов в пределах семейства *Ranunculaceae* (Odat et al., 2004). Однако некоторые исследователи используют данный анализ и для нахождения генетических расстояний между разными видами, что является довольно сложной задачей (Буглова и др., 2018; Roy et al., 2006).

Для дальнейшего изучения генетического полиморфизма методом ISSR-PCR (Inter Sample Sequence Repeats) был осуществлен подбор

праймеров, дающих наибольшее количество чётко различимых бэндов на электрофореграмме. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 10 мкл готовой PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 6 мкл дистиллированной воды, 2 мкл ДНК и 2 мкл праймера. Программа амплификации:

- 1) 95°C (5 минут) – денатурация белковых комплексов для активации Таq-полимеразы;
- 2) 13 циклов: 95°C (20 секунд) – «плавление» ДНК, 55°C (45 секунд, понижение температуры на 0,7°C в каждом последующем цикле) – отжиг праймеров, 72°C (90 секунд) – элонгация цепи;
- 3) 25 циклов: 95°C (20 секунд) – «плавление» ДНК, 44°C (30 секунд) – отжиг праймеров, 72°C (90 секунд) – элонгация цепи; 72°C (7 минут) – достройка всех цепей.

Все использованные в подборе праймеры представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, использованных в подборе

Название	Последовательность
17899A	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-AG-3'
17899B	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GG-3'
HB8	5'-GAG-AGA-GAG-AGA-GG-3'
HB9	5'-GTG-TGT-GTG-TGT-GG-3'
HB10	5'-GAG-AGA-GAG-AGA-CC-3'
HB12	5'-CAC-CAC-CAC-GC-3'
HB13	5'-GAG-GAG-GAG-GC-3'
HB14	5'-CTC-CTC-CTC-GC-3'
HB15	5'-GTG-GTG-GTG-GC-3'
844A	5'-CTC-TCT-CTC-TCT-CTC-TAC-3'
ISSR-09	5'-ATG-ATG-ATG-ATG-ATG-ATG-3'
ISSR-17	5'-GAC-AGA-CAG-ACA-GAC-A-3'
ISSR-23	5'-ACA-CAC-ACA-CAC-ACA-CTA-3'

Разделение продуктов амплификации производилось в агарозном геле различной концентрации в электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при

напряжении 100V. При приготовлении геля в раствор добавлялся бромид этидия для окраски полученных продуктов. Конечный гель фотографировали в проходящем УФ-излучении.

Для последующей статистической обработки были выбраны праймеры 17899A, HB12, ISSR-17 и HB14, дающие наибольшее количество воспроизводимых полиморфных фрагментов. Количество бэндов (локусов) составило 73.

2.2.1.3 Статистическая обработка данных

Полученные результаты были переведены в математическую матрицу, где присутствие локуса отмечается «1», а его отсутствие – «0». Эти данные в последствии подвергаются непараметрической статистической обработке, в частности, кластерному анализу (Reddy, 2002).

В первую очередь, полученные матрицы переводились в вид, удобный для работы в программе PopGene (Population Genetics), версия 1.32 (Yeh, 1999), где были подведены расчёты следующих показателей:

- Р – количество полиморфных локусов;
- Н_e – генетическое разнообразие Нэя (Nei, 1972), рассчитываемое по формуле:

$$D = -\ln \left(\frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum_i a_i^2} \sqrt{\sum_i b_i^2}} \right),$$

где a_i – аллель в популяции А, b_i – аллель в популяции В;

- Іо – информационный индекс Шеннона, адаптированный под биологические исследования Робертом Макартуром (MacArthur, 1955).
- Gst – коэффициент подразделенности популяции.

Коэффициент подразделенности популяций оценивали по классификации Райта (Wright, 1978). Значение показателя G_{st}, принимающее

значение от 0 до 0,05, соответствовало низкому уровню подразделённости, 0,05-0,15 – среднему уровню подразделённости, 0,15–0,25 – высокому уровню и выше 0,25 – очень высокому уровню подразделённости популяций. Индекс подразделенности популяций рассчитывали для всей выборки.

Далее, в программе TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) (Miller, 1997) была построена дендрограмма сходства популяций, отражающая степень родства исследуемых популяций по ISSR-спектру. Расчёт генетического расстояния между популяциями для построения дендрограммы производили по формуле Нея (1972) (Nei, 1972). Также, дендрограммы были построены в программе TFPGA – по формуле Нея (1978) и в программе PAST4 - кластеризация производилась методом UPGMA (Hart, 1983), мера сходства – Евклидово расстояние.

Для оценки генетической структуры популяций был использован байесовский поход (МСМС – Markov Chain Monte-Karlo), реализованный в программе STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et. al., 2000). Использовалось длительное выгорание (burn-in) – 20000 циклов и МСМС – 60000 циклов. Максимальное количество кластеров оценивалось с помощью ΔK (Evanno et. al., 2005). Количество возможных кластеров (K) тестировалось от 2 до 12 в десяти повторностях. Для визуализации результатов была использована программа STRUCTURE Harvester Web 0.6.94 (Earl et. al., 2012).

2.2.2 Молекулярная филогенетия представителей р. *Trollius*

Для проведения филогенетического анализа была использована ДНК, выделенная из листьев 6 представителей р. *Trollius*. Амплификация полученного материала проводилась с использованием праймеров к последовательностям ITS (ITS-for – 5'-CGT-AAC-AAG-GTT-TCC-GTA-G-3', ITS-rev – 5'-GGA-ATC-CTT-GTA-AGT-TTC-TTT-3'), matK (matK 1R_KIM – 5'-CGT-ACA-GTA-CTT-TTG-TGT-TTA-CGA-G-3', matK 3F_KIM – 5'-CCC-AGT-CCA-TCT-GGA-AAT-CTT-GGT-TC-3') и rbcL (rbcL 1F – 5'-ATG-TCA-

CCA-CAA-ACA-GAA-AC-3', rbcL 724R – 5'-TCG-CAT-GTA-CCT-GCA-GTA-GC-3'). Проверка качества выделения проводилась с помощью электрофореза при 100V. Выделенная и амплифицированная ДНК была секвенирована с помощью набора реактивов BigDive Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, MD, USA). Определение нуклеотидных последовательностей forward-цепей проводилась методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130 (г. Новосибирск).

Файлы были получены в формате ABIF, то есть включали в себя помимо самих последовательностей ещё и хроматограммы, относительно которых и происходило определение нуклеотидной последовательности (рис. 7). Проверка сиквенсов на предмет неоднозначных результатов и дальнейшая их конвертация в формат FASTA (стандартный текстовый формат для нуклеотидных и полипептидных последовательностей) происходила в программе Unipro UGENE v 34.0 (далее UGENE) (Okonechnikov et. al., 2012).

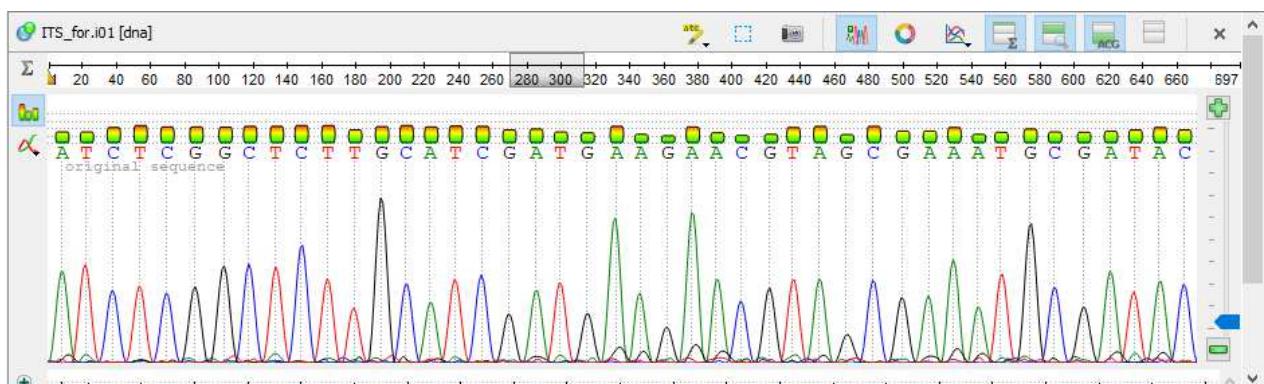


Рисунок 7 – Участок последовательности ITS *Trollius altaicus*

После перевода последовательностей в другой формат, встал вопрос о том, последовательности каких видов нужно выбрать, чтобы построить биологически оправданное филогенетическое дерево. Было решено выбрать последовательности видов, семейства Лютковые, произрастающих примерно в тех же широтах, что и исследуемые образцы. Так же, в качестве аутгруппы для укоренения деревьев были выбраны последовательности трёх

целевых участков для вида *Papaver somniferum* L., согласно соображениям о том, что аутгруппы для построения филогенетических деревьев должны быть родственными по ближайшей таксономической единице, объединяющей исследуемые данные. В данном случае, исследуемые последовательности объединены в семейство Лютниковые, а *Papaver somniferum* L. относится к семейству маковых; оба эти семейства объединяются в порядок Люткоцветных (Wang et. al., 2009). Все последовательности были подобраны в базе данных NCBI, в разделе «Nucleotide» (таблица 3).

Следующим шагом анализа являлось множественное выравнивание последовательностей. Множественное выравнивание производилось в программе MEGA v10.1.8 (далее – MEGA) (Kumar et. al., 2018) с помощью алгоритма MUSCLE с методом кластеризации UPGMA.

Таблица 3 – Последовательности, взятые из базы данных NCBI

rbCL	matK	ITS
<i>Aconitum barbatum</i> JF940656.1	-//- JF953024.1	-//- KY417292.1
<i>Actaea spicata</i> KF997475.1	-//- JQ033440.1	-//- Z98279.1
<i>Adonis amurensis</i> EU053900.1	-//- FJ626486.1	-//- KU570389.1
<i>Anemone narcissiflora</i> MF572154.1	-//- MF543478.1	-//- MF543747.1
<i>Caltha palustris</i> EU053906.1	-//- AB069845.1	-//- AY148283.1
–	<i>Clematis vitalba</i> HE967387.1	-//- GU732643.1
<i>Coptis chinensis</i> AB817806.1	-//- AB817805.1	-//- JF423949.1
<i>Halerpestes ruthenica</i> KF312697.1	<i>H. cymbalaria</i> KC474866.1	<i>H. uniflora</i> GU552270.1
<i>Papaver somniferum</i> MF973030.1	-//- JN896016.1	-//- AY689330.1
<i>Paraquilegia microphylla</i> EF437146.1	-//- EF437136.1	-//- JX233771.1

Окончание таблицы 3

rbcL	matK	ITS
<i>Ranunculus repens</i> MK526485.1	-//- AY954182.1	-//- HQ338339.1
<i>Thalictrum simplex</i> FJ449863.1	<i>T. occidentale</i> KX677446.1	<i>T. simplex</i> KC417090.1
<i>Trollius ledebouri</i> EU053926.1	-//- AY515237.1	-//- AY148271.1

Следующим шагом анализа являлось множественное выравнивание последовательностей. Множественное выравнивание производилось в программе MEGA v10.1.8 (далее – MEGA) (Kumar et. al., 2018) с помощью алгоритма MUSCLE с методом кластеризации UPGMA (рис. 8).

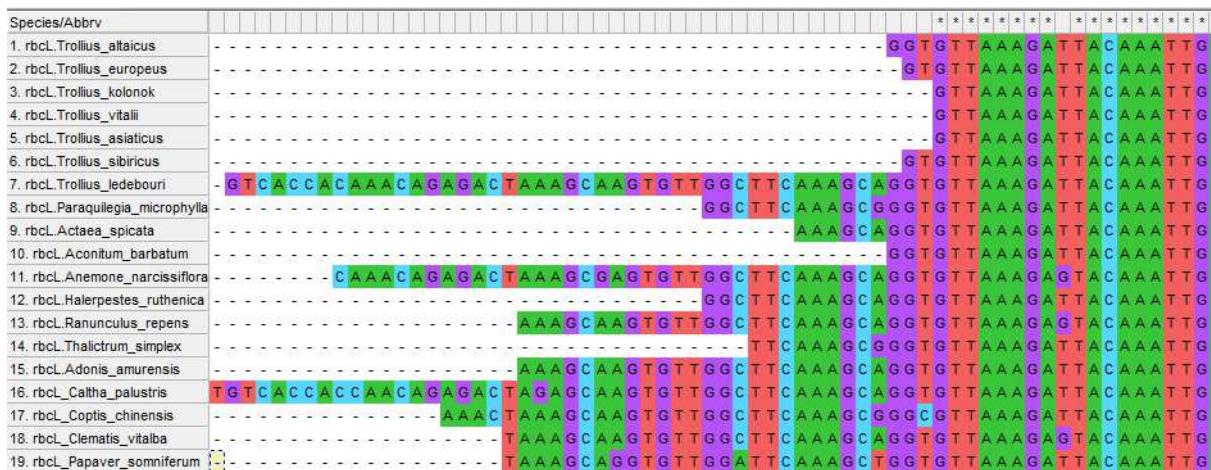


Рисунок 8 – Результат множественного выравнивания для последовательности rbcL

После выравнивания необходимо было отфильтровать последовательности, т.к. большое количество пропусков, либо слишком вариабельные сайты будут неинформативными, и к тому же, анализ таких последовательностей займёт гораздо большее время.

Фильтрация последовательностей происходила в программе GBlocks v0.91b с менее строгими параметрами для того, чтобы получить более

длинные нуклеотидные последовательности для анализа и для того, чтобы была учтена любая вариабельность в последовательностях.

Следующим этапом является подбор наиболее подходящей модели нуклеотидных замен. Подбор производился с помощью программы jModelTest2 v2.1.6 на платформе XSEDE. Для подбора были выбраны следующие параметры: топология основного дерева для расчётов правдоподобия – Maximum Likelihood (ML), эвристика для поиска топологий – Subtree Pruning and Regrafting (SPR), информационный критерий – Bayesian Information Criterion, остальные параметры – по умолчанию.

Далее, используя данные о наиболее подходящих моделях нуклеотидных замен были построены филогенетические деревья двумя методами – метод максимального правдоподобия (ML) (Murshudov et. al., 1997) и байесовский метод (Beaumont et. al., 2002). Метод ML был реализован в программе MEGA, байесовский метод с использованием алгоритмов MrBayes (Huelsenbeck, 2001) был реализован в программе UGENE.

Для построения деревьев методом ML были использованы следующие параметры: бутстрэп – 1000, эвристика для подбора топологии – SPR, метод построения исходного дерева – NJ, остальные параметры – стандартные и соответствующие данным о подборе нуклеотидных замен. Для построения деревьев алгоритмами MrBayes использовались также стандартные и соответствующие данным о подборе нуклеотидных замен параметры.

Визуализация деревьев производилась в программе MEGA.

ВЫВОДЫ

1. ISSR-PCR методом анализа генетической изменчивости популяций видов р. *Trollius* выявлено 114 локусов, суммарный полиморфизм которых составляет 98,25%. Коэффициент подразделённости популяций (G_{ST}) равен 0,52, следовательно, изученные популяции имеют высокую степень дифференциации по классификации Райта (1972) и разделяются на отдельные виды.

2. На дендрограмме сходства выделяется 2 кластера, один из которых формируют популяции, относящиеся к виду *T. sibiricus*. Во второй кластер входят популяции *T. asiaticus*, и *T. vitalii*. Обособленную группу образуют байкальская и иджимская популяции. При построении дерева по отдельным представителям наблюдается четкое разделение популяций на обособленные группы.

3. При проведении филогенетического анализа по нуклеотидным последовательностям ITS регионов, хлоропластных генов *matK* и *rbcL* выявлено отсутствие значимых различий между видами *T. asiaticus*, *T. vitalii*, *T. kolonok*, *T. europaeus* L., *T. altaicus* и *T. sibiricus*. Единичные однонуклеотидные замены отмечены в последовательностях *matK* у *T. europaeus*, *T. altaicus* и *T. kolonok*. Для того, чтобы провести четкую границу между видами необходимо изучение морфологической изменчивости на популяционном уровне, а также поиск новых, более надежных молекулярных маркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акшенцев, Е.В. Пространственно-временная организация ценопопуляций купальницы европейской (*Trollius europaeus* L.) : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.16 / Е.В. Акшенцев. – Новосибирск. 2006. – 18 с.
2. Антипова, С.В. Урбанфлора города Красноярска (сосудистые растения) : монография / С.В. Антипова, Е.М. Антипова ; Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. – Изд. 2-е., испр. и доп. – Красноярск : 2016. – 373 с.
3. Баженова О. И. Ландшафтно-климатические типы систем экзогенного рельефообразования субаридных районов юга Сибири / О.И. Баженова //География и природные ресурсы. – 2006. – №. 4. – С. 57-65.
4. Большая российская энциклопедия. Западный Саян [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://bigenc.ru/geography/text/1988160>
5. Буглова, Л.В. Естественные гибриды *Trollius asiaticus* x *T. altaicus*: признаки и распространения / Л.В. Буглова // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2018. – Т. 1. – С. 180–183.
6. Зоogeография [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.zooge365.ru/public_card/2857/klimat_hamar-dabana/
7. Кириллов, М.В. Красноярский край. Природное и экономико-географическое районирование / М.В. Кириллов, Ю.А. Щербаков. – Красноярск : Кн. изд-во, 1962. – 404 с.
8. Конспект флоры Азиатской России: сосудистые растения / Л.И. Малышев и др.. – Новосибирск : СО РАН, 2012. – 640 с.
9. Красная книга Красноярского края. Т. 2 : Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений и грибов / отв. ред. Н.В. Степанов; Сибирский фед. ун-т. – 2 изд., перераб. и доп. – Красноярск, 2012. – 576 с.
10. Красноборов, И.М. Высокогорная флора Западного Саяна: монография / И. М. Красноборов; отв. ред. А. И. Толмачев; Академия наук [АН] СССР. Сибирское отделение [СО]. Центральный сибирский

ботанический сад [ЦБС]. - Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1976. - 379 с.: ил.

11. Купальницы Сибири и Средней Азии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://flower.onego.ru/other/trolli_s.html

12. Мухина Ж. М. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях / Ж.М. Мухина, Е.В. Дубина // Политеатический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 66.

13. Назимова, Д.И. Высотная поясность и климат в горах Южной Сибири / Д.И. Назимова, Н.И. Молокова, К.К. Джансейтов // География и природные ресурсы, 1981. - №2. – С.68-78.

14. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах / Т.А. Работнов // Труды БИН АН СССР. Сер. 3, Геоботаника. –М.: АН СССР, 1950. – №6. – С. 7-204.

15. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 245 с.

16. Степанов, Н. В. Новый вид *Trollius* L. (Ranunculaceae) из Кузнецкого Алатау / Н.В. Степанов // Систематические заметки по материалам гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. – 2018. – №. 117. – С.40-45

17. Степанов, Н.В. Флорогенетический анализ (на примере северо-восточной части Западного Саяна): Учебное пособие. Часть 1 / Н.В. Степанов. – Красноярск : Краснояр. гос. ун-т., 1994. – 108 с.

18. Трулевич, Н.В. Купальницы / Н. В. Трулевич. - М.: Армада-Пресс, 2001. 32 с.

19. Фризен, Н.В. *Trollius* L. – Жарок, или купальница / Н.В. Фризен // Флора Сибири. В 14 т. Т.6. – Новосибирск, 1993. – С. 103–108.

20. Цвелёв, Н.Н. Флора Восточной Европы / Н.Н. Цвелёв // СПб. : СПХФА, 2001. – 670 с.

21. Шауло, Д.Н. Флора Западного Саяна / Д.Н. Шауло // *Turczaninowia*. – 2006. – Т.9, №1-2. – С. 5-336
22. Шумилова Л.В. Ботаническая география Сибири : Учеб. пособие / Под ред. д-ра биол. наук проф. Л. П. Сергиевской ; Томский гос. ун-т им. В. В. Куйбышева. - Томск : Изд-во Том. ун-та, 1962. - 439 с.: ил.
23. Электронный каталог сосудистых растений. Купальница сибирская [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.nsc.ru/win/elbib/atlas/flora/3701.html>
24. AIC и BIC 2020 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://ru.esdifferent.com/difference-between-aic-and-bic>
25. Akaike, H. Canonical correlation analysis of time series and the use of an information criterion / H. Alaike // Mathematics in Science and Engineering. – 1976. – Vol. 126. – P. 27-96.
26. Avise, J.C. Timetrees: beyond cladograms, phenograms, and phylogenograms / J.C. Avise // The Timetree of Life. – 2009. – P. 19-25.
27. Braaten D. C. Locations and contexts of sequences that hybridize to poly (dG-dT) (dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes / D.C. Braaten et. al. //Nucleic acids research. – 1988. – Vol. 16. – №. 3. – P. 865-881.
28. Brudno, M. Glocal alignment: finding rearrangements during alignment / M. Brudno et. al. //Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. – № 1. – P. 54-62.
29. Cai S. Q. Antiviral flavonoid- type C- glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* / S.Q. Cai et. al. //Chemistry & biodiversity. – 2006. – Vol. 3. – №. 3. – P. 343-348.
30. Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis / J. Castresana // Molecular biology and evolution. – 2000. – Vol. 17. – №. 4. – P. 540-552.

31. Chakraborty, P. Herbal genomics as tools for dissecting new metabolic pathways of unexplored medicinal plants and drug discovery / P. Chakraborty // Biochimie open. – 2018. – Vol. 6. – P. 9-16.
32. Chen, S. Speaker, environment and channel change detection and clustering via the bayesian information criterion / S. Chen et. al. // Proc. DARPA broadcast news transcription and understanding workshop. – 1998. – Vol. 8. – P. 127-132.
33. Darriba, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing / D. Darriba, D. Posada // Nature methods. – 2012. – Vol. 9. – №. 8. – P. 772.
34. Doroszewska A. The genus *Trollius* L. / Doroszewska. A taxonomical study. Monogr. bot. 1974. - P. 1-184.
35. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle //Phytochemical bulletin. – 1987. – Vol. 19. – №. 1. – P. 11-15.
36. Earl D. A STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D.A. Earl et. al. //Conservation genetics resources. – 2012. – T. 4. – №. 2. – C. 359-361.
37. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.C. Edgar // Nucleic acids research. – 2004. – Vol. 32. – №. 5. – P. 1792-1797.
38. Erst A. *Trollius austrosibiricus* (Ranunculaceae), a new species from South Siberia / A. Erst et. al. // Phytokeys. – 2019. – № 115. – P. 83-92
39. Erst, A.S. The genus *Trollius* L. (Ranunculaceae) in the flora of the Altai Mountain Country / A.S. Erst et al. // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. – 2018. – №118. – C. 64-67
40. Evanno G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet //Molecular ecology. – 2005. – Vol. 14. – №. 8. – P. 2611-2620.

41. Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach / J. Felsenstein // Journal of molecular evolution. – 1981. – Vol. 17. – №. 6. – P. 368-376.
42. Flora of China [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://flora.huh.harvard.edu/china/PDF/PDF06/TROLLIUS.pdf>
43. Goodman, M. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method / M. Goodman, J.F. Pechere // Journal of molecular evolution. – 1977. – Vol. 9. – №. 2. – P. 131-158.
44. Greunwald, J. PDR for herbal medicines / J. Greunwald et al. – Montvale: Thomson Healthcare Inc. – 2007. – P.387-388
45. Gupta M. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats / M. Gupta et. al. //Theoretical and applied genetics. – 1994. – Vol. 89. – №. 7-8. – P. 998-1006.
46. Gupta R. Genetic resources of medicinal plants / R. Gupta //Indian Journal of Plant Genetic Resources. – 1988. – T. 1. – №. 1. – P. 98-102.
47. Hacia J. G. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays / J.G. Haica et. al. //Nature genetics. – 1999. – Vol. 22. – №. 2. – P. 164-167.
48. Hart G. The occurrence of multiple UPGMA phenograms //Numerical taxonomy. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1983. – P. 254-258.
49. Hasegawa, M. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA / M. Hasegawa, H. Kishino, T. Yano // Journal of molecular evolution. – 1985. – Vol. 22. – №. 2. – P. 160-174.
50. Huelsenbeck J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J.P. Hueselbeck, F. Ronquist //Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – №. 8. – P. 754-755.
51. Jukes, T.H. Evolution of protein molecules / T.H. Jukes, C.R. Cantor // Mammalian protein metabolism. – 1969. – Vol. 3. – P. 21-132.

52. Katoh, K. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment / K. Katoh et. al. // Nucleic acids research. – 2005. – Vol. 33. – №. 2. – P. 511-518.
53. Khan, H. Bayesian, maximum parsimony and UPGMA models for inferring the phylogenies of antelopes using mitochondrial markers / H. Khan et. al. // Evolutionary Bioinformatics. – 2008. – Vol. 4. – P. EBO. S934.
54. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // Journal of molecular evolution. – 1980. – Vol. 16. – №. 2. – P. 111-120.
55. Kimura, M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences / M. Kimura // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1981. – Vol. 78. – №. 1. – P. 454-458.
56. Kumar S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms //Molecular biology and evolution. – 2018. – Vol. 35. – №. 6. – P. 1547.
57. Larkin, M.A. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M.A. Larkin et. al. // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23. – №. 21. – P. 2947-2948.
58. Li Y. L. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge / Y.L. Li et. al.//Journal of ethnopharmacology. – 2002. – Vol. 79. – №. 3. – P. 365-368.
59. Luferov A.N., Erst A.S., Luferov D.N., Shmakov A.I., Wang W. The genus *Trollius* (Ranunculaceae) in the Russian Far East // Turczaninowia. – 2018. – 21(2)., P. 110-116.
60. MacArthur R. Fluctuations of animal populations and a measure of community stability //ecology. – 1955. – Vol. 36. – №. 3. – P. 533-536.
61. Maciejewska-Rutkowska, I. Chemical Composition and Morphology of Basal Leaves of *Trollius europaeus* L. and *T. altissimus* Crantz (Ranunculaceae) / I. Maciejewska-Rutkowska et. al. // Polish Journal of Environmental Studies. – 2007. – T. 16. – №. 4.

62. Markert C. L. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species-specific patterns / C.L. Markert, F. Møller //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1959. – T. 45. – №. 5. – C. 753.
63. Miller M. P. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: a Windows Program for the Analysis of Elysium and Molecular Population Genetic Data //<http://www.marksgeneticssoftware.net/>. – 1997.
64. Morgante M. PCR- amplified microsatellites as markers in plant genetics / M. Morgante, A.M. Olivieri //The plant journal. – 1993. – Vol. 3. – №. 1. – P. 175-182.
65. Murshudov G. N. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method / G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dods //Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 1997. – Vol. 53. – №. 3. – P. 240-255.
66. Needleman, S.B. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S.B. Needleman, C.D. Wunsch // Journal of molecular biology. – 1970. – Vol. 48. – №. 3. – P. 443-453.
67. Nei M. Genetic distance between populations //The American Naturalist. – 1972. Vol. 106. №. 5-6. P. 283-292
68. Nguyen, L. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L. Nguyen et. al. // Molecular biology and evolution. – 2015. – Vol. 32. – №. 1. – P. 268-274.
69. Notredame, C. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment / C. Notredame, D.G. Higgins, J. Heringa // Journal of molecular biology. – 2000. – Vol. 302. – №. 1. – P. 205-217.
70. Odat N. Genetic diversity of *Ranunculus acris* L. (Ranunculaceae) populations in relation to species diversity and habitat type in grassland communities / N. Odat, G. Jetschke, F.H. Hellwig //Molecular Ecology. – 2004. – Vol. 13. – №. 5. – P. 1251-1257.

71. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov et. al. //Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – №. 8. – P. 1166-1167.
72. Osborne T. B. The proteins of the wheat kernel. – Carnegie institution of Washington, 1907. – №. 84.
73. Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly //Genetics. – 2000. – Vol. 155. – №. 2. – P. 945-959.
74. Qian W. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers / W. Qian, S. Ge, D.Y. Hong //Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – Vol. 102. – №. 2-3. – P. 440-449.
75. Rajendran, A. Plant genetic resources and knowledge of traditional medicine in Tamil Nadu / A. Rajendran, K. Ravikumar, A.N. Henry // Ancient science of life. – 2000. – Vol. 20, №. 1-2. – P. 25.
76. Reddy M. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding / M.P. Reddy, N. Sarla, E.A. Siddiq //Euphytica. – 2002. – Vol. 128. – №. 1. – P. 9-17.
77. Reddy M. P. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding / M.P. Reddy, N. Sarla, E.A. Siddiq //Euphytica. – 2002. – Vol. 128. – №. 1. – P. 9-17.
78. Richard G. F. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes / G.F. Richard, A. Kerrest, B. Dujon //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2008. – Vol. 72. – №. 4. – P. 686-727.
79. Risch N. The future of genetic studies of complex human diseases / N. Risch, K. Merikangas //Science. – 1996. – Vol. 273. – №. 5281. – P. 1516-1517.
80. Rzhetsky, A. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference / A. Rshetsky, M. Nei // Molecular biology and evolution. – 1993. – Vol. 10. – №. 5. – P. 1073-1095.

81. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular biology and evolution. – 1987. – Vol. 4. – №. 4. – P. 406-425.
82. Slowinski J. B. Molecular polytomies / J.B. Slowinski //Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2001. – Vol. 19. – №. 1. – P. 114-120.
83. Smith, T.F. Identification of common molecular subsequences / T.F. Smith, M.S. Waterman // Journal of molecular biology. – 1981. – Vol. 147. – №. 1. – P. 195-197.
84. Sneath, P.H.A. Unweighted pair group method with arithmetic mean / P.H.A. Sneath, R.R. Sokal // Numerical Taxonomy. – 1973. – P. 230-234.
85. Syvänen A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms //Nature Reviews Genetics. – 2001. – Vol. 2. – №. 12. – P. 930-942.
86. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // Molecular biology and evolution. – 1993. – Vol. 10. – №. 3. – P. 512-526.
87. Tan, G. Current methods for automated filtering of multiple sequence alignments frequently worsen single-gene phylogenetic inference / G. Tan et. al. // Systematic biology. – 2015. – Vol. 64. – №. 5. – P. 778-791.
88. Tanya P. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers / P. Tanya et. al. //Plant Molecular Biology Reporter. – 2011. – Vol. 29. – №. 1. – P. 252-264.
89. Tavare, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences / S. Tavare // Lectures on mathematics in the life sciences. – 1986. – Vol. 17. – №. 2. – P. 57-86.
90. Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos et. al. //Nucleic acids research. – 1995. – Vol. 23. – №. 21. – P. 4407-4414.
91. Wang R. F. A bioactive alkaloid from the flowers of *Trollius chinensis* / R.F. Wang et. al. //Heterocycles-Sendai Institute of Heterocyclic Chemistry. – 2004. – Vol. 63. – №. 6. – P. 1443-1448.

92. Williams J. G. K. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers / J.G.K. Williams et. al. //Recombinant DNA Methodology II. – Academic Press, 1995. – P. 849-884.
93. Witkowska-Banaszczak, E. New flavonoid compound of *Trollius europaeus* / E. Witkowska-Banaszczak, W. Bylka //Acta Physiologiae Plantarum. – 2015. – Vol. 37. – №. 5. – P. 99.
94. Witkowska-Banaszczak, E. The genus *Trollius* — review of pharmacological and chemical research / E. Witkowska-Banaszczak // Phytotherapy Research. – 2015. – Vol. 29. – №. 4. – P. 475-500.
95. Wong K. M. Alignment uncertainty and genomic analysis / K.M. Wong, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck //Science. – 2008. – Vol. 319. – №. 5862. – P. 473-476.
96. Yan, L. Antibacterial and antibiofilm activities of *Trollius altaicus* CA Mey. On *Streptococcus mutans* / L. Yan, W. Wu, S. Tian // Microbial Pathogenesis. – 2020. – Vol. 149. – P.104265.
97. Yeh F. C. POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft Window-Bases Freeware for Population Genetic Analysis //<http://www. ualberta. ca/~ fyeh/>. – 1999.
98. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda //Genomics. – 1994. – Vol. 20. – №. 2. – P. 176-183.

Федеральное государственно автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

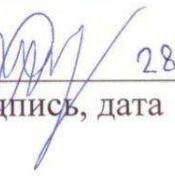
М.И.Гладышев
подпись инициалы, фамилия
«___» _____ 20 ___ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Генетический полиморфизм популяций и филогения сибирских видов р.
Trollius L.

Руководитель  28.06.21 профессор, д.б.н. И.Е. Ямских
подпись, дата

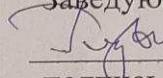
Выпускник  28.06.21 И.Р. Путилин
подпись, дата

Красноярск 2021

Федеральное государственно автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

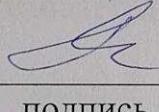
Кафедра водных и наземных экосистем

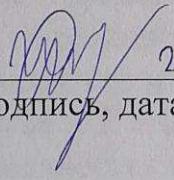
УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 М.И.Гладышев
подпись инициалы, фамилия
«___» _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Генетический полиморфизм популяций и филогения сибирских видов р.
Trollius L.

Руководитель  28.06.21 профессор, д.б.н. И.Е. Ямских
подпись, дата

Выпускник  28.06.21 И.Р. Путилин
подпись, дата

Красноярск 2021