

Федеральное государственное автономное образовательное
Учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ И.Е. Ямских
подпись Инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Морфолого-генетический анализ популяций видов рода *Achillea* L.
(Asteraceae) в Южной Сибири

Направление подготовки 04.06.01 – Биология

Профиль 06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный
руководитель: _____
подпись, дата

профессор, д.б.н.
должность

Ямских И.Е.
фамилия, инициалы

Студент: _____
подпись, дата

ББ19-06М
номер группы

Стоянова Э.Е..
фамилия, инициалы

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Морфолого-генетический анализ популяций видов рода *Achillea* L. (Asteraceae) в Южной Сибири» содержит 75 страниц текстового документа, 18 иллюстраций, 12 таблиц, 3 приложения и 94 использованных источников.

Ключевые слова:

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ISSR-PCR АНАЛИЗ, ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ТЫСЯЧЕЛИСТНИК ОБЫКНОВЕННЫЙ, ТЫСЯЧЕЛИСТНИК АЗИАТСКИЙ, ТЫСЯЧЕЛИСТНИК ПОЙМЕННЫЙ, ТЫСЯЧЕЛИСТНИК ШАУЛО, ТЫСЯЧЕЛИСТНИК ШМАКОВА, ТЫСЯЧЕЛИСТНИК КУПРИЯНОВА.

Объектом исследования явились 6 видов рода *Achillea* L.: *Achillea millefolium* L., *Achillea asiatica* Serg., *Achillea inundata* Kondr., *Achillea schmakovii* Kupr., *Achillea kuprijanovii* Stepanov, *Achillea schauloi* Stepanov.

Цель работы: сравнительный морфолого-генетический анализ популяций и филогения представителей р. *Achillea*, произрастающих на территории Красноярского края и республики Хакасия.

В результате проделанной работы освоены следующие методы: морфометрический анализ гербарных образцов, статистический анализ данных и построение графиков в программе R 3.6.3., выделение ДНК (СТАВ), ISSR-PCR анализ, горизонтальный гель-электрофорез в агарозном геле, выравнивание нуклеотидных последовательностей в программе MEGA, подбор эволюционной модели замен с помощью программы Jmodeltest-2.1.10, построение филогенетических деревьев при помощи программы MrBayes-3.2.5, визуализация деревьев при помощи программы FigTree-1.4.4.

Полученные данные по морфометрии характеризуют близкородственные виды рода *Achillea*, как смешанную и слабо дифференцируемую группу, что может быть следствием гибридизации. Обособленное положение занимают популяции *A. millefolium*. Полученные данные по молекулярно-генетическому анализу показали, что изученные популяции обладают высоким уровнем внутривидовой генетической дифференциации ($G_{st}=0,2576$) и разделяются, преимущественно, по географическому принципу. Данные по филогенетическому анализу свидетельствуют о независимой эволюции участков ядерной и хлоропластной ДНК. Полученные результаты не позволяют сделать выводы о таксономической самостоятельности видов р. *Achillea*.

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 История и проблемы выделения видов рода <i>Achillea</i> в Сибири	5
1.2 Эколого-биологические особенности представителей рода <i>Achillea</i>	8
1.3 Изучение генетического полиморфизма популяций тысячелистника на основе ISSR.....	14
1.4 Проведение филогенетического анализа тысячелистника с использованием хлоропластного и ядерного маркеров	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Материал исследования.....	21
2.2 Методы анализа морфометрических данных.....	24
2.3 Методы анализа молекулярно-генетических данных	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
3.1 Морфологическая изменчивость популяций видов р. <i>Achillea</i>	32
3.2 Генетический полиморфизм популяций видов р. <i>Achillea</i> на основе ISSR-маркеров	34
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	43
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46

ВВЕДЕНИЕ

Achillea millefolium L. sensu lato является таксономически сложной группой и разнообразным в экологическом отношении полиплоидным комплексом, произрастающим по всему Северному полушарию (Saukel, 2003; Guo, 2008; Farajpour, 2012; Ebrahimi, 2012). F. Ehrendorfer (2006) по итогу многолетних исследований пишет о том, что гибридизация и, как следствие, «сетчатая эволюция» наблюдались у представителей р. *Achillea* с момента возникновения рода и именно они обусловили прогресс и расселение тысячелистников, а также широкую вариабельность популяций, в зависимости от условий местообитания.

Накопленный в течение длительного периода гербарный материал демонстрирует высокую внутривидовую изменчивость у видов р. *Achillea*, в связи с этим возникла необходимость ревизии видов, которые ранее были выделены из состава *A. millefolium*, а также ревизии отдельных форм данного полиморфного комплекса (Куприянов, 1998; Степанов, 2016).

Цель работы: сравнительный морфолого-генетический анализ популяций и филогения представителей р. *Achillea*, произрастающих на территории Красноярского края и республики Хакасия.

Задачи:

1. Изучить морфологическую изменчивость популяций видов р. *Achillea*.
2. Провести анализ генетического полиморфизма популяций видов р. *Achillea* с использованием ISSR маркеров.
3. Выполнить филогенетический анализ р. *Achillea* с использованием маркеров ITS и trnL-F.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История и проблемы выделения видов рода *Achillea* в Сибири

Род тысячелистник широко распространен в Северном полушарии и обладает большим разнообразием – насчитывается 142 вида (The Plant List, 2020) *Achillea millefolium* представляет собой один из самых разнообразных полиплоидных комплексов (Lopez-Vinyallonga, 2015), а полиплоидия является сильнейшим двигателем видообразования (Weiss-Schneeweiss, 2013). Виды рода тысячелистник – очень полиморфные, сильно варьирующие по размерам, степени опушения, характеру рассеченности листьев, размеру и форме корзинок, по форме и величине язычков краевых цветков и т. д. Имеют много форм различного таксономического значения, обычно неясно отграниченных друг от друга. Правильная оценка их возможна только при тщательном изучении в природе и комплексном анализе гербарных образцов (Комаров, 1961).

Сергиевской Л.П. в 1946 г. в самостоятельный вид выделен *Achillea asiatica* (тысячелистник азиатский). Во «Флоре Красноярского края» (1980) выделение *Achillea asiatica* в самостоятельный вид принято нецелесообразным и его рассматривают в составе *Achillea millefolium* L.s.l., хотя в последней сводке «Флора Сибири» (Шауло, 1997) все вышеперечисленные виды признаются самостоятельными.

Во «Флоре СССР» (1961) выделяется 5 видов тысячелистника, произрастающих в Сибири (*Achillea nobilis*, *Achillea millefolium*, *Achillea setacea*, *Achillea asiatica*, *Achillea micrantha*).

Группой томских ученых установлено, что как по качественному составу, так и по количественному содержанию монотерпеноидов и сесквитерпеноидов эфирные масла тысячелистника обыкновенного и тысячелистника азиатского очень близки; содержание хамазулена в эфирных маслах данных видов составляет 5-12%. (Калинкина, 2000). Это подтверждает мнение ряда томских

ботаников рассматривать тысячелистник азиатский в составе полиморфного вида *Achillea millefolium* L.s.l. (Копынева, 1980).

Во «Флоре Красноярского края» (1980) выделяется только два вида тысячелистника – т. обыкновенный и т. благородный. Т. благородный имеет дваждыперисторассеченные листья с 7-10 парами первичных долей и зубчатым в верхней половине общим стержнем листа, в то время как т. обыкновенный имеет дважды- или триждыперисторассеченные листья с 15-30 первичными долями и узкой цельнокрайней каймой плоского общего стержня листа. Отмечается, что тысячелистник обыкновенный весьма полиморфный вид. Сравнение обширных материалов из Сибири и европейской части СССР показало, что изменчивость строения листовых пластинок свойственна виду в пределах всего ареала и не связана с какими-то определенными условиями местообитаний. Основываясь на этом, авторы не считают возможным согласиться с выделением тысячелистника азиатского, как отдельного вида.

В «Растительных ресурсах России» (2011) на основе химического состава выделяется 5 видов тысячелистника, свойственных для Сибири – т. обыкновенный, т. азиатский, т. мелкоцветковый, т. благородный, т. щетинистый (Алтай, Западная Сибирь). Е.М. Антипова (2012) выделяет три вида тысячелистника для Красноярского края, различая их главным образом по месту произрастания, а в морфологии ссылаясь на ранее написанные работы (Шауло, 1997; Положий, 1985). Так, в свою очередь тысячелистнику азиатскому свойственно произрастание в луговых степях, на суходольных лугах, на полянах и опушках; т. обыкновенный предпочитает березовые и смешанные леса, лесные опушки, пойменные и остепненные луга; т. благородный произрастает в степях и на залежах, встречается крайне редко.

Борский М.Н. (2014) отмечает, что *A. millefolium* проявляет высокую степень внутривидовой изменчивости. В результате его особи, взятые из разных биотопов, могут существенно различаться между собой по значениям многих признаков. Это привело к тому, что в «период типологической концепции вида» (Скворцов, 2004) многие морфотипы *A. millefolium* были

описаны как самостоятельные виды. В результате своих исследований Борский М.Н. не обнаружил чётких морфологических, экологических или географических различий для строгого разграничения таких видов тысячелистника как *A.setacea* Waldst. & Kit, *A.inundata* Kondr и *A.millefolium*, ни по их описаниям в литературе (Афанасьев, 1961, Клоков М.В 1985, Кондратюк 1961), ни по собственным наблюдениям и сборам, и поэтому рассматривает их в составе единого таксона (*A. millefolium*), полиморфного по множеству признаков.

Н.В. Степанов (2016) выделяет 10 видов тысячелистника характерных для территории Приенисейских Саян, большая часть из них является довольно редкими. Он приводит такие виды как *A.millefolium* L. (т.обыкновенный), *A.asiatica* Serg. (т.азиатский), *A. nobilis* L. (т.благородный), *A.inundatum* Kondr. (т.пойменный), *A.schmakovii* Kupr. (т.Шмакова), *A.sergievskiana* Shaulo & Shmakov (т.Сергиевской), *A.setacea* Waldst. & Kit. (т.щетиный), *A.kuprijanovii* Stepanov (т.Куприянова), *A.schauloi* Stepanov (т.Шауло) и *A.jenisseensis* Stepanov (т.енисейский).

Таким образом, большинство авторов выделяют два вида тысячелистника, свойственных для Сибири – т. азиатский и т. обыкновенный, добавляя или исключая другие, такие как т. благородный и т. пойменный. (Копынева, 1980; Антипова, 2012; Шауло, 1997; Буданцев, 2012; Комаров, 1961) Однако среди наиболее новых работ встречаются такие, где автор на основе химического и морфологического анализа не видит доказательств, которые служат основой для разнесения этих двух таксонов и сводит их в один вид – тысячелистник обыкновенный (Борский, 2014). Так же, мы можем наблюдать другой взгляд на таксономическое разнообразие видов рода тысячелистник. Так Н.В. Степанов (2016) выделяет 10 видов тысячелистника в пределах Приенисейских Саян. А.Н. Куприянов (1998) выделяет три подвида *A. asiatica*, характерных для Южной Сибири. Такое разнообразие взглядов на объем рода обусловлено рядом цитогенетических исследований, которые указывают на

усиленную дифференциацию видов вследствие гибридизации, рекомбинации и новых мутаций (Guo, 2005).

1.2 Эколого-биологические особенности представителей рода *Achillea*

Achillea millefolium – бореальный евроазиатский вид (Орлова, 1993), травянистый многолетник, 5 – 120 см высотой, распространённый повсеместно в европейской части России, в Западной и Восточной Сибири, реже в Средней Азии. Ксеромезофит, в равной степени характерен как для естественной степной флоры, так и рудеральной (Немерешина, 2014). Цветет со второй половины мая до конца лета. Обладает приятным бальзамическим запахом и горьким вкусом.

Все растение опушено мягкими длинными белыми волосками. Листья в очертании ланцетные или продолговато-ланцетные, плоские, трижды перисторассеченные, с многочисленными сегментами в верхней части центрального стержня. Прикорневые и нижние стеблевые листья черешковые; стержень листа 0,6-2 мм шириной, сегменты первого порядка 5-25 мм длиной, размещены на стержне поочередно или супротивно на расстоянии 2-10 мм друг от друга. Сегменты второго порядка очередные или супротивные, длинные, конечные дольки листьев линейно-ланцетные или ланцетные, 0,2-0,5 мм шириной, оканчивающиеся коротким 0,1-0,2 мм длиной, хрящевидным острием; верхние стеблевые листья 1,6-16 см длиной и 0,5-2,6 см шириной, со стержнем 1-2 мм шириной, с коротким, 0,2-0,3 мм длиной, острием. Корзинки в рыхлых неравновысоких сложных щитках; обертки продолговатые, до почти яйцевидных, 3,4-5,5 мм длиной, 2-4 мм шир. Цветоложе от выпуклого до конического; листочки обертки продолговато-эллиптические, 1,5-4 мм длиной 0,9-1,3 мм шириной, зеленые, килеватые, с темно-бурой пленчатой каймой по краям. Язычки краевых цветков округло-овальные, почти округлые, на верхушке с 3, реже с 1-2 зубцами, обычно белые, реже розовые или пурпуровые. Семянки 1,8-2 мм длиной (Шауло, 1997).

Популяции тысячелистника обыкновенного в г.Красноярске и его округе, произрастающие на лугах с различным уровнем увлажнения, а также в антропогенно-нарушенных сообществах, не имеют четких морфологических отличий друг от друга. Более того, особи, произрастающие в нарушенных местообитаниях, характеризуются относительно крупными размерами вегетативных органов. Снижение проективного покрытия, урожайности, размеров растений зафиксировано для лесных фитоценозов. (Слатинская, 2016).

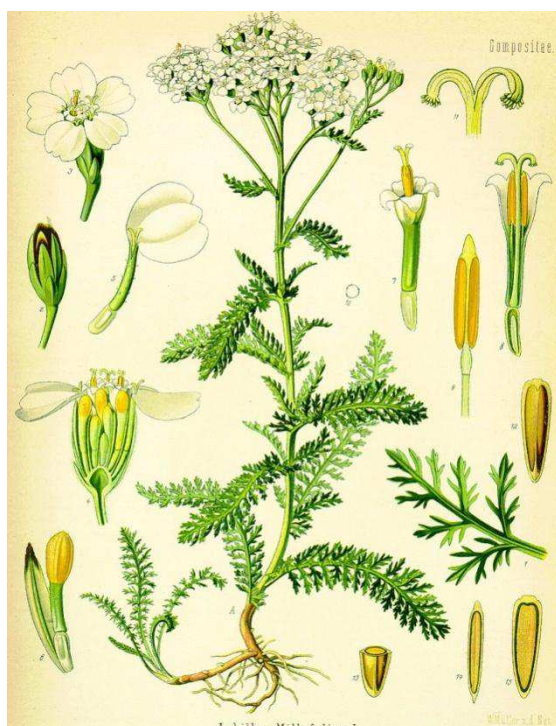


Рисунок 1 - Тысячелистник обыкновенный. А — цветущее растение; 1 — сегмент листа; 2 — нераскрытая корзинка; 3 — раскрытая корзинка; 4 — то же в продольном разрезе; 5 — ложноязычковый цветок; 6 — нераскрытый трубчатый цветок с прицветником; 7 — раскрытый трубчатый цветок; 8 — то же в продольном разрезе; 9 — отдельная тычинка; 10 — пыльцевое зерно; 11 — верхняя часть столбика с двухлопастным рыльцем; 12 — плод (семянка); 13 — то же в поперечном разрезе; 14, 15 — то же в продольном разрезе, вид с разных сторон. (Ф.Келер, 1887).

Тысячелистник азиатский – *A. asiatica* – имеет прямые, простые, олиственные стебли высотой до 80 см, с укороченными веточками в пазухах верхних листьев, у основания часто с перисторазделенными ушками. Стержень

листа цельный, 1-1,5 мм шириной. Сегменты в очертании широкотреугольные, яйцевидные или продолговатые, 1,5-8,5 мм длиной, 1-6 мм шириной, сложенные вдоль стержня, расставленные, не налегающие друг на друга, с обеих сторон точечно-ямчатые, надрезанные или разделенные на обратной стороне, яйцевидные, до продолговатых, дольки, 1-3 мм длиной, 0,5-1,6 мм шириной (реже сегменты цельные), последние 2-9 (11) на верхушке голые и оттянутые в короткое, 0,2 мм длиной, хрящеватое острие. Корзинки на тонких и сравнительно длинных ножках 2-6 мм длиной, 0,2-0,3 мм в диаметре, собраны в сложные плоские многоцветковые щитки; цветоножки от выпуклого до конического (в зависимости от стадии созревания семян). Обертки продолговато-яйцевидные, 2-4 мм длиной, 1,5-2 мм шириной; листочки обертки яйцевидные или продолговатые, 1,5-2 мм длиной, 0,6-1 мм шириной. С узкой белой пленчатой каймой. Язычки краевых цветков поперечно-овальные, мелкие, 0,7-1,5 мм длиной, 0,9-1,7 мм шириной, с 3 округлыми зубцами, желтые. Семянки продолговато-клиновидные, 0,7-1,3 мм длиной, 0,3-0,4 мм шириной, продольно-морщинистые, серые с белой окантовкой (Шауло, 1997).

A. asiatica нетребователен к богатству почвы, но избегает чрезмерно кислых и солонцеватых почв. Стоек к вытаптыванию. Вид также не требователен к теплу и влаге, но не встречается при сильном переувлажнении. Растение чувствительно к затенению, предпочитает открытые солнечные места. Характерной чертой *A. asiatica* является присутствие его во временных сообществах, сформировавшихся на нарушенных землях. Обилие вида снижается по мере заселения таких участков другими видами. Проявляет черты R-стратега, хотя не является пионерным растением. Он появляется на регенерационных нишах, когда формируются пригодные для него условия – тонкий почвенный слой, накапливающий влагу для развития растения в проростковом и ювенильном периодах (Скрипчинская, 2004).

Тип местообитания не имеет существенного влияния на урожайность *A. asiatica*. Его обилие и продуктивность прежде всего зависят от плодородия

почв, температурного режима и влагообеспеченности в вегетационный период. (Чудновская, 2013).

Согласно «Флоре Сибири» (пункты 1-6) (1997) и «Флоре СССР» (пункты 7-9) (1954) между Т. азиатским и Т. обыкновенным имеются следующие отличия:

1) Высота т. азиатского может достигать 80 см, т. обыкновенного - до 100 см.

2) У т. азиатского укороченные олиственные побеги встречаются в пазухах верхних листьев, у т. обыкновенного они могут быть так же и в пазухах средних листьев.

3) Щитки корзинок у т. азиатского сложные и плоские, у Т. обыкновенного – они рыхлые.

4) Язычки краевых цветков у т. азиатского поперечно-овальные, мелкие, 0,7-1,5 мм длиной, 0,9-1,7 мм шириной, с 3 округлыми зубцами, белые или розовые. У т. обыкновенного язычки краевых цветков округло-овальные, почти округлые, на верхушке с 3, реже с 1-2 зубцами, обычно белые, реже розовые или пурпуровые.

5) Семянки у т. обыкновенного значительно больше – 1,8-2 мм длиной, у т. азиатского – 0,7-1,3 мм. длиной, но с отличием – они продольно-морщинистые с белой окантовкой.

6) Есть различия в местобитании видов. Т. азиатскому свойственен рост в лугах, степях, лесных полянах и на опушках, песках и галечниках, у дорог. Т. обыкновенному – в лесах, на лугах, полях, вдоль дорог и в огородах.

7) Стебель т. обыкновенного более менее опушен мягкими длинными белыми волосками, т. азиатский имеет серый от спутанных белых волосков стебель.

8) Листья у т. обыкновенного дважды-трижды перисторассеченные, у т. азиатского – дважды перисторассеченные.

9) Обертки т. обыкновенного эллиптически-яйцевидная, 4-6 мм дл, обертки т. азиатского – бокальчатые.

Achillea shaulo обозначен Н. В. Степановым (2016), как отдельная таксономическая единица. Растение до 40-50 см высотой, от светло-зеленого до серо-зеленого цвета с длинными опушенными волосками. Прикорневые листья до 30 см длиной, стеблевые до 3,5 – 4 см длиной, 5 – 0,7 см шириной, 2 – перисторассеченные. От *A. millefolium* его отличает весьма своеобразные мелкие плотные листья, компактные и довольно высокие соцветия (диаметром 3 – 5 см). Помимо этого, отмечается характер листьев и долек последнего порядка - блестящие, более или менее яйцевидной формы, внезапно переходящие в острие и более широкие. Форма долек – линейно-ланцетная до ланцетной, их длина заметно больше; другие отличия – все та же кайма на листочках обертки, сильно выраженный ксероморфизм. Вид назван в честь монографа сибирских тысячелистников Дмитрия Николаевича Шауло.

Achillea kupriyanovii был так же выделен Н. В. Степановым, как отдельный вид (2016). Растение до 40-85 см высотой, от светло-зеленого до серо-зеленого цвета, с длинными опушенными волосками. Прикорневые листья до 35 см длиной, стеблевые до 10 см длиной, 2 – 3 перисто-рассеченные. Лопастей первого порядка широко расставлены, последние лопастей шириной 0,1 – 0,4 мм, узколинейные, плавно переходящие в бороздки. Соцветие представляет собой компактное или сложное соцветие диаметром 3–5 см. Обладает довольно узкими и длинными дольками листьев (менее 0,5 мм шир., линейно-ланцетные или линейные) Вид назван в честь сибирского ботаника – Андрея Николаевича Куприянова.

Achillea inundata – растение до 35-120 см высотой. Стебли, восходящие у основания, тонкобороздчатые, простые или в верхней части ветвящиеся, слабо опушенные мягкими волосками. Прикорневые и нижние стеблевые листья черешковые, 5-45 см дл., 1-8 см шир., удлинненно-продолговатые, трижды перисторассеченные, сегменты яйцевидные или продолговатые, 0.5-4.5 см дл. с треугольными или ланцетными конечными дольками. Нерассеченная часть листа 1-1.2 мм шир. Средние и верхние листья сидячие, с ушками, удлинненно-продолговатые, реже почти эллиптические, дважды перисторассеченные на

широкие обратнойцевидные или продолговато-обратнойцевидные сегменты; нерассеченная часть листа 1.5-4 мм шир. Корзинки в широких (8-25 см), раскидистых сложных щитках. Обертка эллиптически-яйцевидная, 4-6 мм дл. Язычки краевых цветков белые, реже розовые, округло-эллиптические или округлые. Семянки продолговато-ширококлинovidные (Шауло, 1997).

Achillea schmakovii – многолетнее травянистое растение с ползучим корневищем. Стебли 34-45 см высотой, прямостоячие, немногочисленные, зеленые, тонкоопушенные. Прикорневые и нижние стеблевые листья черешчатые, ланцетные или линейно-ланцетные, 6-16 см длиной, 2-3-перисторассеченные; конечные дольки ланцетные или удлинено-яйцевидные, на верхушке с остроконечием. Средние и верхние листья сидячие, продолговато-яйцевидные, 3-жды перисторассеченные, 4 -6 см длиной и до 2 см шириной; конечные дольки ланцетные, на верхушке с остроконечием, слабо волосистые. Стержень 1,0 – 1,2 мм шириной с промежуточными цельными укороченными сегментиками. Корзинки многочисленные, в густом щитковидном соцветии, обратно-яйцевидные 4-5 мм длиной, 3 – 4 мм шириной. Наружные листочки обертки яйцевидные, внутренние удлинено-яйцевидные, по краю с широкой темно-черной расщепленной каймой. Язычковые цветки с почти округлым язычком 3 – 4 мм длиной на верхушке с выемкой. Семянки 2,5 – 3,5 мм длиной (Шмаков, 1995).

Сравнительный анализ морфологических признаков видов приведен в таблице 1, а принадлежность поясню-зональной группе – в таблице 2.

Таблица 1 – Сравнение видов р. *Achillea* по морфологическим признакам

Названия видов	Высота стебля	Длина и степень рассечения стеблевых листьев	Соцветия	Листочки обертки
<i>Achillea millefolium</i> L.	до 100 см	1,6-16 см длиной, 2-3-перисторассеченные	рыхлые, неравновысокие, сложные щитки	эллиптически-яйцевидные, 4-6 мм длиной
<i>Achillea asiatica</i> Serg.	до 80 см	4-20 см длиной, 3-перисторассеченные	сложные плоские многоцветковые щитки	бокальчатые

<i>Achillea inundata</i> Kondr.	до 120 см	5-45 см длиной, 3-перисторассеченные	широкие (8-25 см), раскидистые сложные щитки	эллиптически-яйцевидные, 4-6 мм длиной
<i>Achillea schmakovii</i> Kupr.	до 45 см	6-16 см, 2-3-перисторассеченные	многочисленные корзинки (4-5 мм длиной), в густом щитковидном соцветии	яйцевидные, внутренние удлинненно-яйцевидные, по краю с широкой темно-черной расщепленной каймой
<i>Achillea kuprijanovii</i> Stepanov	до 85 см	до 10 см, 2-3-перисторассеченные	компактные, корзинки диаметром 3-5 см	с темно-бурой каймой
<i>Achillea schauloi</i> Stepanov	до 50 см	до 3,5-4 см, 2-перисторассеченные	компактные и довольно высокие соцветия (диаметром 3-5 см)	с темной каймой

Таблица 2 – Поясно-зональное распределение изучаемых видов

Названия видов	Поясно-зональное распределение
<i>Achillea millefolium</i> L.	Светлохвойно-лесной
<i>Achillea asiatica</i> Serg.	Степной
<i>Achillea inundata</i> Kondr.	Луговой
<i>Achillea schmakovii</i> Kupr.	Горный
<i>Achillea kuprijanovii</i> Stepanov	Лесостепной
<i>Achillea schauloi</i> Stepanov	Горностепной

1.3 Изучение генетического полиморфизма популяций тысячелистника на основе ISSR

В настоящее время актуальным является проведение генетических исследований видовой разнообразия и полиморфизма видов и популяций с использованием различных ДНК-маркеров, как наиболее достоверный вариант исследования для отнесения вида к тому или иному таксону (Матвеева, 2011). Так AFLP маркеры используются для изучения генетического полиморфизма тысячелистника и дают высокие показатели количества полиморфных полос (Rahimmalek, 2009). Помимо этого, есть данные, что комбинирование анализа

результатов от разных типов праймеров дает более полную и верную картину для дальнейших выводов (Ebrahimi, 2012; Inotai, 2016; Dainou, 2016). Группа ученых Египта (Badr, 2015) обратила внимание на то, что популяции, произрастающие при более низких температурах и повышенной влажности, обладают более высоким числом общих и полиморфных маркеров ISSR по сравнению с другими популяциями. Так же доказано, что ISSR-ПЦР метод более чувствителен для обнаружения генетического различия между географически близкими популяциями, произрастающими в схожих условиях (Poyaraz, 2016). Нами были использованы мультилокусные молекулярные маркеры ISSR.

Межмикросателлитные последовательности (ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat) – маркеры, которые были разработаны как альтернатива RAPD-анализу. Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам (4–12 единицам повтора) и несущие на одном из концов последовательность из двух-четырёх произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь»). Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты уникальной ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами.

Полученные ПЦР-продукты относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию полосы. Для создания ISSR-маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК (Новиков, 2011).

ISSR-маркеры позволяют одновременно определить изменчивость по группе не связанных между собой локусов, что особенно ценно для сохранения и использования генетических ресурсов. Такая информация дает возможность оценить генетический дрейф, происходящий в экосистемах, а также эффективно проводить мониторинг популяций редких и исчезающих видов растений, находящихся на охраняемых территориях.

Основные преимущества ISSR-метода:

– данный метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации групп растений различного таксономического ранга, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования;

– ISSR-маркеры довольно дешевы в использовании, не требуют предварительных знаний о последовательности ДНК и вместе с тем дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-маркеры (Календарь, 2002).

Следует отметить, что в геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности к этим генам.

Однако для ISSR-маркеров локализация в геноме продуктов амплификации, так же, как и функция, остаются неизвестными, что является существенным недостатком этого метода. ISSR-метод используется для идентификации генетического полиморфизма видов растений с различными целями (классификация, идентификация, паспортизация и т. д.) как в природных популяциях, так и у культурных растений. Помимо оценки биоразнообразия, молекулярные маркеры применяются для исследования происхождения, доместикации видов и их последующей миграции, для географической локализации популяций, имеющих разное генетическое происхождение, получения информации по филогенетическим взаимоотношениям между видами. ISSR-метод в филогенетике подходит главным образом для близкородственных видов.

Исследований, посвященных изучению генетического полиморфизма растений рода *Achillea*, проведено сравнительно мало. В основном данные исследования касаются тысячелистника обыкновенного, ввиду его

распространенности, тысячелистник же азиатский зачастую не включается в список исследованных образцов из-за ограниченности распространения.

Из-за обилия эфирных масел, фенольных соединений и алкалоидов в используемом для анализа сырье тысячелистника, был необходим особый подход при подборе условий для проведения ISSR-ПЦР (Водчиц, 2014). Так, для гербарных образцов длительного срока хранения и для выделения ДНК достаточной для дальнейшей работы концентрации зачастую используется СТАВ метод (Криницына, 2015).

Исследования с использованием ISSR- и SSR-маркеров были проведены тремя группами ученых из Ирана (Gharibi, 2011; Rahimmalek, 2011; Farajpour, 2012). Далее будут представлены сведения из этих работ.

В работе Gharibi с соавторами (2011) для оценки генетического разнообразия нескольких популяций тысячелистника из различных географических регионов Ирана использовались как ISSR метод, так и морфологические маркеры. Четырнадцать праймеров были использованы для амплификации 228 полос, из которых 199 (87,28%) были полиморфными. Кластерный анализ и метод главных компонент показали, что большинство генотипов были сгруппированы по географическим регионам. Минимальное генное разнообразие наблюдалось для северо-западной популяции ($0,021 \pm 0,015$), а наибольшее – для северной ($0,129 \pm 0,08$). Результаты морфологического анализ в большинстве случаев соответствовали результатам, полученным с помощью молекулярного анализа.

В работе Rahimmalek с соавторами (2011) были впервые разработаны SSR-маркеры для генома *A. millefolium*. Были сконструированы три геномные библиотеки тысячелистника, обогащенные микросателлитными мотивами AG, AC и ATG. Всего было получено 30 пар праймеров, из которых 16 были полиморфными в 26 образцах *A. millefolium*. Один образец *A. tenuifolia* также был включен для оценки применимости новых праймеров SSR для других видов. Среднее число аллелей SSR-маркеров составляло 8,5 на локус и изменялось от 2 до 14. Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) варьировала от 0 до

0,96 со средним значением 0,52, а ожидаемая гетерозиготность (H_E) изменялась от 0,07 до 0,49 со средним значением 0,39. Среди праймеров Am142 показал самое высокое содержание полиморфной информации (PIC), а самое низкое значение было получено для праймера Am59 со средним значением 0,33. Три локуса (AmK59, AmK344 и AmK329) значительно отклонялись от закона Харди-Вайнберга, и один локус (Am344) мог иметь нулевые аллели. Кластерный анализ показал распределение образцов *A. millefolium* в соответствии с географическим положением. *A. tenuifolia* полностью отделен от генотипов *A. millefolium*.

В третьей работе Farajrouf с соавторами (2012) проанализировали 37 образцов *Achillea millefolium*, собранных из разных провинций Ирана с использованием ISSR-маркеров. В общей сложности семь праймеров ISSR генерировали 72 амплифицированных фрагмента, большинство из которых были полиморфными. На дендрограмме сходства выявлено шесть групп. Результаты кластеризации показали, что *A. millefolium* subsp. *elpursensis*, эндемичный для Северного Ирана, отделен от других генотипов. Метод главных компонент (PCA) подтвердил результаты кластеризации.

Генетический полиморфизм *A. millefolium*, так же изучен с помощью RAPD и AFLP маркеров (Guo, 2008; Lopez-Vinyallonga, 2015).

1.4 Проведение филогенетического анализа тысячелистника с использованием хлоропластного и ядерного маркеров

Развитие методов молекулярной биологии в этом столетии призвано облегчить оценку генетического родства таксонов (Weiguo, 2005). В настоящее время одними из наиболее популярных последовательностей для филогенетических исследований растений является последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов (ITS internal transcribed spacer). Мотив ITS локализуется между структурными генами рибосомальной РНК 18S, 5,8S и 28S. Рибосомальные гены представляют собой

единый кластер ядерных генов, организованный в виде тандемно расположенных повторов. Каждый кластер рибосомальных генов состоит из транскрибируемой области (гены 18S, 5.8S и 28S рРНК), внутренних транскрибируемых спейсеров, расположенных по обе стороны от 5.8S рРНК, эти спейсеры называются: ITS1 и ITS2, и фланкирующих внешних транскрибируемых спейсеров — (ETS1 и ETS2) (Матвеева, 2011).

Предполагается, что ITS, как любые некодирующие последовательности, эволюционировали с высокой скоростью. Следовательно, они могут сильно отличаться даже у близкородственных организмов, поэтому их используют для филогенетических и биогеографических исследований (Baldwin, 1995; Alvarez, 2003). ITS широко используются в качестве филогенетического маркера для классификации растений на разных таксономических уровнях: родовом, видовом и подвидовом (Feliner, 2007). Также есть данные, что ITS могут быть использованы и на более высоком уровне систематического анализа (Schultz, 2006).

Межгенная спейсерная область trnL-F хлоропластной ДНК в виде некодирующих последовательностей имеет больше вариаций и более высокую скорость мутаций, чем кодирующая область. Также очевидно, что некодирующая область играет роль в регуляции экспрессии генов, на которую может влиять среда или ниши среды обитания, что находит отражение в изменчивости фенотипических признаков (Fitmawatii, 2017, Shaw, 2005).

TrnL-F хлоропластного генома наземных растений состоит из генов транспортной РНК trnL_{uua} и trnF_{gaa}, расположенных в тандеме и разделенных некодирующими спейсерами. Консервативная природа генов trnL и trnF сделала возможным создание универсальных праймеров для растений (Tarbelet, 1991), таким образом, область trnL-F стала одним из наиболее широко используемых маркеров хлоропластов для филогенетического анализа растений (Borsch, 2003; Hamilton, 2003; Pirie, 2007). Ген trnL является частью trnL-F области генома хлоропласта, который расщепляется интроном группы I, межгенным спейсером и экзонами trnF и подвергается совместной транскрипции (Bakker et al. 2000).

Вторичные структуры внутри trnL важны, потому что функция тРНК, для которой кодируется ген trnL, связана с ней и функцией интрона внутри него (Pirie, 2007).

Так называемый регион "trnL-F" все чаще используются для филогенетической реконструкции на уровне видов (Wikstrom et al., 1999). Участок trnL был первым участком группы I, описанным в ДНК хлоропластов (Bonnard et al. 1984). У растений участок trnL обычно показывает сохранение последовательности в областях, фланкирующих оба экзона trnL, тогда как центральная часть сильно варьируема. Внутри межгенного спейсера не было обнаружено никаких вторичных структурных элементов, которые могли бы служить точками срачивания, что указывает на то, что trnL и trnF, вероятно, являются совместно транскрибируемыми (Bonnard et al. 1984).

Исследования последовательностей ДНК nrITS и пластидного trnL-F выявили филогенетические связи: паттерны дифференцировки *Achillea* s.l. во времени и пространстве (Guo et al., 2005). Той же группой ученых проведена филогенетическая реконструкция по 69 видам *Achillea* sensu lato на основе nrITS и trnL-F последовательностей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материал исследования

Объект исследования явились 16 популяций р. *Achillea* (*A. millefolium* – 4 популяции, *A. asiatica* – 6 популяций, *A. kuprijanovii* – 2 популяции, *A. schmakovii* – 2 популяции, *A. inundata* – 1 популяция, *A. schauloi* – 1 популяция). Первая часть сбора фактического материала проводилась в июле-августе 2017 года, на территории Красноярского края и республики Хакасии (Рисунок 2). Вторая часть - в августе 2019 года на территории природного парка Ергаки (Рисунок 3).



Рисунок 2 – Пункты сбора материала для исследования в 2017 году.



Рисунок 3 – Пункты сбора материала для исследования в 2019 году.

Собран материал для изучения внутри- и межпопуляционной изменчивости видов и выявления наиболее значимых таксономических признаков из 14 популяций. Для этого на каждой пробной площади отбиралось случайным образом по 30 экземпляров тысячелистника.

Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма ДНК были собраны прикорневые листья с 10-15 случайно выбранных растений в каждой популяции на расстоянии не менее 10 м друг от друга. Фиксация материала, как правило, осуществлялась в силикагеле.

Для филогенетического анализа было отобрано по одному образцу каждого вида из зафиксированных в силикагеле образцов.

Таблица 3 – Материал для морфологического и генетического анализа

Популяция	Место сбора	Сообщество	Количество образцов для анализа:		
			Морфометрии	Генетического полиморфизма	Филогении

Am1	г. Красноярск, окр. СФУ	березняк разнотравно- осочковый	30	10	1
Am2	Емельяновский район, окр. аэропорта Емельяново, зона экотона	луг разнотравно- злаковый	30	10	-
Am3	Емельяновский район, окр. с. Зелеево, зона экотон	луг крупнотравно- злаковый	30	-	-
Am4	Манский район, окр. пос. Манский	луг разнотравный	30	-	-
Aa1	Емельяновский район, окр. д. Дрокино	суходольный луг злаково- разнотравный	30	10	1
Aa2	Большеулуйский район, окр. с. Большой Улуй	луг разнотравно- злаковый	30	10	-
Aa3	Ширинский район, окр. пос. Колодезный	остепненный луг разнотравно- злаковый	30	-	-
Aa4	Шушенский район, Национальный парк «Шушенский бор», долина р. Таловки	обочина лесной дороги	30	-	-
Aa5	Краснотуранский район, окр. с. Краснотуранск	остепненный луг	-	10	-
Aa6	Ермаковский район, п. Танзыбей, урочище Скок	луг крупнотравно- злаковый	30	-	-
Ai	Природный парк Ергаки, долина р. Малый Кебеж	луг крупнотравно- злаковый	30	15	1
Ak1	Ермаковский район, Усинская котловина	остепненный луг	-	10	-
Ak2	Природный парк Ергаки, долина р. Ореш	луг крупнотравно- злаковый	30	15	1
Asha	Природный парк Ергаки, долина р. Иосефовка	обочина лесной дороги	30	15	1
Ashm1	Природный парк Ергаки, долина р. Тушканчик	луг разнотравно- злаковый	30	-	-
Ashm2	Природный парк	обочина лесной	30	15	1

	Ергаки, смотровая площадка	дороги			
--	----------------------------	--------	--	--	--

* Am – *Achillea millefolium*, Aa – *Achillea asiatica*, Ak – *Achillea kuprijanovii*, Ai – *Achillea inundata*, Asha - *Achillea schauloi*, Ashm - *Achillea schmakovii*

2.2 Методы анализа морфометрических данных

Для морфологического анализа было проведено измерение следующих параметров генеративных и вегетативных органов растений: высота растения (x1); высота общего соцветия (x2); средняя длина междоузлия (x3); количество листьев (x4); ширина рахиса с крылом (x5); лист срединной формации: длина (x6) и ширина (x7) доли первого порядка, длина (x8) и ширина (x9) доли второго порядка, расстояние между долями первого и второго порядков (x10); лист верховой формации: длина (x11) и ширина (x12) доли первого порядка, длина (x13) и ширина (x14) доли второго порядка, расстояние между долями листа верховой формации (x15); количество соцветий (x16); диаметр корзинки (x17); количество трубчатых цветков (x18); длина трубчатых цветков (x19); длина язычковых цветков (x20), соотношение длины и ширины доли первого порядка листа срединной формации (x21).

Большая часть оцениваемых нами морфометрических признаков приводится в качестве диагностических для определения видов во "Флоре СССР" (Комаров, 1954) "Флоре Красноярского края" (Копынева, 1980), "Флоре Сибири" (Шауло, 1997).

Статистический анализ данных по морфологии и построение графиков выполнялись в программе R 3.6.3 (R Core Team, 2013). Пакет tidyverse (Wickham, 2017) был использован для импорта, упорядочивания, преобразования и визуализации данных. Помимо этого, был использован пакет readxl (Wickham, 2019) для импорта данных формата xlsx.

На первом этапе был проведен тест на нормальность (критерий Шапиро-Уилка) при помощи базового пакета stats, а также с использованием пакетов tidyr (Wickham, 2017) и magrittr (Bache, 2014) для структурирования

последовательностей операций с данными слева направо, минимизации потребности в локальных переменных, упрощения добавления шагов в любом месте последовательности операций. После этого были построены Q-Q графики распределения при помощи пакета qqplot2 (Wickham, 2011). Далее был проведен выборочный тест (критерий Краскела – Уоллеса), представляющий собой непараметрическую альтернативу одномерному дисперсионному анализу и используемый для сравнения трех и более выборок (Kruskal, 1952). После был проведен непараметрический попарный тест (критерий Уилкоксона), используемый для проверки различий между двумя выборками парных или независимых измерений по уровню какого-либо количественного признака, измеренного в непрерывной или в порядковой шкале (Wilcoxon, 1992).

Описательная статистика включала в себя следующие показатели: max – максимальное значение параметра, min – минимальное значение параметра, mean – среднее значение параметра, sd – стандартное отклонение среднего, se – стандартная ошибка среднего, cv – коэффициент вариации (рассчитан по формуле $cv = sd/mean * 100$). Для получения значений описательной статистики был задействован пакет rstatix (Kassambara, 2020).

Коэффициент вариации использовался в качестве меры внутрипопуляционной изменчивости, а его оценка проведена с помощью эмпирической шкалы уровней изменчивости С.А. Мамаева (1972), имеющей следующие градации:

$C < 7\%$ - очень низкий уровень изменчивости;

$C - 8-12\%$ - низкий уровень изменчивости;

$C - 13-20\%$ - средний уровень;

$C - 21-40\%$ - высокий уровень;

$C > 40\%$ - очень высокий уровень изменчивости.

Далее был использован метод главных компонент (Wald, 1987), метод k-средних (MacQueen, 1967), иерархическая кластеризация с использованием Евклидова расстояния при помощи базового пакета stats. Для визуализации результатов многомерно анализа был использован пакет factoextra (Kassambara,

2017), для построения дендрограммы использовался пакет ggdendro (de Vries, 2016), а для окраски пакет RColorBrewer (Neuwirth, 2014).

Импорт полученных результатов в формате xlsx был выполнен при помощи пакета XLConnect (Java, 2020).

2.3 Методы анализа молекулярно-генетических данных

Анализ генетического полиморфизма популяций тысячелистников проводился в лаборатории биотехнологии и молекулярно-генетических исследований СФУ. В анализе использовались 10 популяций. Из каждой популяции было выбрано от 10 до 15 растений, заведомо не являющихся клонами. ДНК выделяли из свежесушеных листьев. Сушку проводили в силикагеле. Перед выделением ДНК растительную ткань измельчали в фарфоровых ступках. Выделение проводили с помощью стандартного СТАВ метода (Doyle and Doyle, 1987), состоящего из ряда этапов. Далее представлен протокол выделения ДНК СТАВ методом (Doyle and Doyle, 1987).

Предварительная подготовка к выделению ДНК. Измельченные листья тысячелистника помещали в стерильные пробирки Эппендорф 1,5 мл и подписывали на крышке, согласно номеру популяции. Для каждой популяции подготавливали 4 стерильных 1,5 мл пробирки, подписывали и ставили в ряд друг над другом в подставку для пробирок. Подготавливали СТАВ буфер, очистительный раствор, изопропанол, 70%-ный раствор этанола.

Работали в боксе после стерилизации его жестким ультрафиолетом в течение 10 мин. Пробирки, пипетки, палочки, наконечники и другую посуду на время стерилизации также помещали в бокс. Образцы ни в коем случае не должны подвергаться воздействию УФ-лучей, поскольку вся ДНК в этом случае будет разрушена. Далее выделение шло согласно следующим пунктам:

1. К образцу добавить 1000 мкл буфера СТАВ, встряхнуть на Вортексе и термостатировать 2 часа при 60 °С.

2. Образцы встряхнуть на Вортексе, прокрутить на центрифуге при 15000 об./мин 20 мин при 15 °С. Отобрать 600–700 мкл супернатанта в чистую пробирку (для отбора каждого образца использовать новую насадку для пипетки), добавить равное количество хлороформа (для осаждения белков), перемешать на Вортексе 30 с, прокрутить на центрифуге при 15000 об./мин 20 мин при температуре 4 °С. Пробирку с остатками растертого материала и использованные насадки для пипеток утилизировать. Повторить дважды.

3. Отобрать 500 мкл супернатанта (верхняя часть жидкости) в чистую пробирку (для отбора каждого образца использовать новую насадку для пипетки), добавить 700 мкл изопропанола, взболтать на Вортексе, дать 10 мин постоять и прокрутить на центрифуге при 15000 об./мин а течение 20 мин при температуре 4 °С. Пробирку с хлороформом и использованные насадки для пипеток утилизировать. Повторить дважды.

4. Отобрать надосадочную жидкость с помощью насоса и колбы ловушки практически до сухого осадка. В осадке содержится ДНК и полисахариды.

5. Осадок отмыть от остатков буфера, изопропанола и хлороформа 3 раза 70%-ным этанолом (по весу) по 1 000 мкл 1 раз и по 500 мкл 2 раза с встряхиванием каждый раз на Вортексе, центрифугировать при 4°С по 10 мин и сушить до утра в боксе лежа.

6. Если запах спирта из пробирки улетучился и нет видимых капель влаги, считаем образец сухим и растворяем его в 50 мкл деионизированной воды при 40 °С 40 мин на шейкере при 1 000 об./мин при периодическом встряхивании на Вортексе (2–3 раза). Растворенную ДНК хранить в морозильной камере при –20 °С (Орешкова, Ямских, 2018).

Дальнейший анализ полиморфизма выделенной ДНК растений проводили с помощью ISSR метода (Inter-Simple Sequence Repeats – межмикросателлитные повторы последовательностей), который анализирует анонимный полиморфизм ДНК.

ISSR-PCR проводили в 20 мкл смеси (6 мкл ddist H₂O; 10 мкл смеси БиоМастерHS-Taq ПЦР-Color 2x, 2 мкл ДНК; 2 мкл 10 мМ праймера) на амплификаторе C1000 Thermal Cycler Bio Rad с использованием реактивов производства ООО «БиолабМикс» (г.Новосибирск) и ЗАО «Евроген» (г.Москва). Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C – 5 мин, 95°C – 20 сек, 13 циклов, с понижением температуры на 0,7 °C каждый цикл: 55°C – 45 сек, 72°C – 90 сек; 25 циклов: 95°C – 20 сек , 44°C – 30 сек, 72°C – 90 сек, завершающая стадия: 72°C – 7 мин, охлаждение при 4°C.

Разделение продуктов амплификации производилось в агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при 120V. После электрофореза гель окрашивали раствором бромид этидия и фотографировали в проходящем УФ-излучении.

На первом этапе исследований осуществляли подбор праймеров, которые дают достаточное количество фрагментов ДНК на объекте изучения (табл.1). Для этого мы использовали ДНК от 2 образцов, относящихся к разным видам и популяциям. На следующем этапе проводили амплификацию всех образцов ДНК с выбранными прайм ерами и разделяли амплифицированные фрагменты ДНК с помощью электрофореза. Окрашенные этидиумбромидом электрофорезные гели визуализировали в ультрафиолетовых лучах и документировали. Для более надежных результатов использовали несколько праймеров. На основе присутствия или отсутствия фрагментов одинаковой длины была составлена матрица для фенетического анализ. При помощи программы Quantity One для каждого образца отмечалось наличие или отсутствие фрагментов ДНК одинаковой длины на фотографии электрофорезного геля (здесь подразумевается, что фрагменты, имеющие одинаковое количество нуклеотидов, гомологичны), наличие отмечалось цифрой «1», отсутствие цифрой «0».

Таблица 4 – Характеристика ISSR праймеров, использованных для амплификации

Название праймера	Последовательность
17898A	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-AC-3'(14)
17898B	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GT-3'(14)
17899A	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-AG-3' (14)
17899B	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GG-3'(14)
HB12	5'-CAC-CAC-CAC-GC-3'(11)
HB14	5'-CTC-CTC-CTC-GC-3'(11)

Статистическую обработку результатов анализа проводили с помощью программы Popgene version1.32 (Yeh, 1999) (расчет уровня полиморфизма (P), генного разнообразия Нея (Ne), индекса Шеннона (I), общего (na) и эффективного (ne) числа аллелей), доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций (Gst). Генетические дистанции (D) между популяциями определяли по формуле М.Нея (Nei, 1978).

Уровень подразделенности популяций оценивали по градации Райта (Wright, 1978). Значение показателя Gst, варьирующее от 0 до 0,05, соответствовало низкому уровню, 0,05-0,15 – среднему уровню, 0,15–0,25 – высокому уровню и выше 0,25 – очень высокому уровню дифференциации популяций.

Дендрограмму сходства строили при помощи компьютерной программы TFPGA version 1.3 (Miller, 1997) невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA- unweighted pair-group method using arithmetic average). Генетическое расстояние между популяциями рассчитывали по формуле Нея с соавторами (Nei et al., 1978).

Для филогенетического анализа было отобрано по одному образцу для каждого из изучаемых видов рода *Achillea* (Am1-4, Aa1-5, Ak2-2, Asha-2, Ashm1-2, Ai-2). Образцы были амплифицированы с двумя парами праймеров

(forward и reverse) – хлоропластной межгенной спейсерной областью trnL-F и межгенным спейсером ядерной ДНК ITS в лаборатории лесной геномики СФУ. Для секвенирования использовали набор реактивов BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, MD, USA). Определение нуклеотидных последовательностей Forward цепей ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, MD, USA) (г. Новосибирск).

Таблица 5 – Характеристика праймеров для филогенетического анализа.

Название праймера	Последовательность
TrnL-F forward	5'-GGTTC AAGTCCCTCTATCCC-3'
TrnL-F reverse	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3'

Для полученных после секвенирования образцов было проведено выравнивание с помощью программы MEGA (Tamura, 2007), алгоритм выравнивания ClustalW (Thompson, 2003). Для образцов ITS4 в качестве аутгруппы был отобран вид *Columnnea asteroloma* семейства Gesneriaceae (Smith, 2017), для образцов амплифицированных с праймерами trnL-F– вид *Tanacetum vulgare* семейства Asteraceae (Zhao, 2010). Для построения консенсусного дерева (общего по двум участкам) – *Prunus salicina* семейства Rosaceae (Zhang, 2017).

Подбор эволюционной модели замен был осуществлен с помощью программы Jmodeltest-2.1.10 (Posada, 2008). Для выбора модели использовался критерий BIC (Bayesian information criterion) (Schwarz, 1978), выбирается модель с наименьшим значением BIC. Файлы с выравниванием были переформатированы в формат nexus с помощью онлайн-конвертера LIRMM (LIRMM, 2021). Построение филогенетического дерева было осуществлено при

помощи программы MrBayes-3.2.5 (Ronquist, 2012). Визуализация дерева была осуществлена при помощи программы FigTree-1.4.4 (Rambaut, 2018).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Морфологическая изменчивость популяций видов р. *Achillea*

В ходе исследований модификационной изменчивости выявлено, что большинство признаков для изученных популяций имеют высокий и очень высокий уровень изменчивости, согласно шкале С. А. Мамаева (1972). К таким признакам относятся: ширина доли первого порядка листа срединной формации (x7, коэффициент вариации варьирует от 25,4 до 49,5%), длина (x8, $C_v = 25,4 - 54,8\%$) и ширина (x9, $C_v = 21,6 - 52,2\%$) доли второго порядка листа срединной формации, ширина доли первого порядка (x12, $C_v = 30,6 - 49,8\%$) и длина доли второго порядка (x13, $C_v = 29,1 - 42,7\%$) листа верховой формации. Высоким уровнем изменчивости обладают два признака: длина доли первого порядка листа срединной (x6, $C_v = 22,9 - 36,6\%$) и верховой (x11, $C_v = 23,5 - 30,1\%$) формаций.

Высоким и средним уровнем изменчивости характеризуются следующие признаки: длина междоузлия (x3, $C_v = 16,9\% - 33,8\%$), количество трубчатых цветков (x18, $C_v = 13,4 - 38,8\%$) форма листа срединной формации (x21, $C_v = 20,8 - 35,1\%$). Очень высоким, высоким и средним уровнем изменчивости обладают признаки: высота общего соцветия (x2, $C_v = 18,9 - 67,0\%$), расстояние между долями листа срединной (x10, $C_v = 17,1 - 51,1\%$) и верховой (x15, $C_v = 18,2 - 53,2\%$) формаций, ширина доли второго порядка листа верховой формации (x14, $C_v = 16,5 - 42,5\%$), количество соцветий (x16, $C_v = 18,1 - 58,2\%$).

Высоким, средним и низким уровнем изменчивости обладают следующие признаки: высота растения (x1, $C_v = 10,8 - 28,3\%$), ширина рахиса с крылом (x5, $C_v = 10,7 - 31,1\%$), диаметр корзинки (x17, $C_v = 8,9 - 38,1\%$). От очень низкого до среднего уровня изменчивости варьируют количество листьев (x4, $C_v = 7,3 - 18,6\%$) и длина трубчатых цветков (x19, $C_v = 4,3 - 18,5\%$), а низким и

Изъято 17 страниц

3.2 Генетический полиморфизм популяций видов р.*Achillea* на основе ISSR-маркеров

Анализ генетического разнообразия популяций тысячелистников проводился с помощью ISSR-PCR метода. Объектом исследований служили 2 популяции *Achillea millefolium* (Am1, Am2), 3 - *A. asiatica* (Aa1, Aa2, Aa5), 2 – *A. kuprijanovii* (Ak1, Ak2), 2 – *A. schmakovii* (Ashm1, Ashm2) и по одной популяции для *A. inundata* (Ai), *A. shaulo* (Asha). В анализе использовалось 6 праймеров, обладающих высоким уровнем полиморфизма и дающих воспроизводимый результат.

ISSR-PCR анализом выявлено 96 фрагментов ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 100% (таблица 9). Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера (таблица 9), варьировало от 13 (17898А и 17898В) до 21 (НВ14). Число полиморфных фрагментов в суммарной выборке изменялось от 8 до 21.

Максимальный уровень полиморфизма ДНК зафиксирован при использовании всех шести праймеров (по 100%). Уровень общего внутривидового генетического разнообразия варьирует от 64,58 до 92,71 (таблица 9).

Наибольшее количество полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК (P=92,71%) наблюдается для популяции *Achillea asiatica*, произрастающей в окрестностях деревни Дрокино Емельяновского района (суходольный луг злаково-разнотравный). Также высокий процент полиморфизма характерен для популяций Asha и Ak2, произрастающих в долинах рек Ореш и Иосефовка Природного парка Ергаки (P=91,67%). Минимальные значения данного показателя (P=64,58%) зафиксированы для популяции Ak1, произрастающей в Усинской котловине Ермаковского района (остепненный луг).

Таблица 9 – Характеристика фрагментов ДНК, амплифицированных ISSR-PCR методом

ISSR-праймер	Последовательность (5'→3')	Число (процент) полиморфных фрагментов ДНК										Общее число фрагментов
		Am1	Am3	Aa1	Aa2	Aa5	Ak1	Ai	Ashm2	Asha	Ak2	Полиморфных
HB12	(CAC) ₃ GC	15 (88,23%)	15 (88,23%)	13 (76,47%)	17 (100%)	15 (88,23%)	13 (76,47%)	14 (82,35%)	16 (94,18%)	17 (100%)	15 (88,23%)	17 (100%)
HB14	(CT) ₈ GC	19 (90,47%)	19 (90,47%)	18 (85,71%)	18 (85,71%)	20 (95,23%)	17 (80,95%)	20 (95,23%)	19 (90,47%)	20 (95,23%)	19 (90,47%)	21 (100%)
17898A	(CA) ₆ AC	12 (92,30%)	12 (92,30%)	10 (76,92%)	9 (69,23%)	10 (76,92%)	9 (69,23%)	10 (76,92%)	10 (76,92%)	13 (100%)	11 (84,61%)	13 (100%)
17898B	(CA) ₆ GT	12 (92,30%)	12 (92,30%)	8 (61,54%)	9 (69,23%)	8 (61,54%)	10 (76,92%)	11 (84,61%)	13 (100%)	11 (84,61%)	12 (92,30%)	13 (100%)
17899A	(CA) ₆ AG	16 (94,12%)	16 (94,12%)	12 (70,59%)	13 (76,47%)	15 (88,23%)	16 (94,12%)	16 (94,12%)	16 (94,12%)	15 (88,23%)	16 (94,12%)	17 (100%)
17899B	(CA) ₆ GG	13 (86,66%)	13 (86,66%)	14 (93,32%)	14 (93,33%)	13 (86,66%)	13 (86,66%)	14 (93,32%)	14 (93,32%)	13 (86,66%)	15 (100%)	15 (100%)
Всего		74 (77,08%)	83 (86,46%)	89 (92,71%)	80 (83,33%)	80 (83,33%)	62 (64,58%)	87 (90,62%)	87 (90,62%)	88 (91,67%)	88 (91,67%)	96 (100%)

Генное разнообразие Нея в суммарной выборке составило 0,4294 (табл. 13). Информационный индекс Шеннона равен 0,6157. Максимальные значения данные показатели имеют в популяции Аа1 (д. Дрокино, $H_e=0,3729$, $I=0,5429$) и Ак2 (Природный парк Ергаки, $H_e=0,3718$, $I=0,5398$). Также высоки значения генного разнообразия и индекса Шеннона в популяциях Аі ($H_e=0,3570$, $I=0,5208$) и Аша ($H_e=0,3576$, $I=0,5226$), произрастающих в Природном парке Ергаки. Минимальные значения отмечены для популяции Аа5 (г.Краснотуранск, $H_e=0,2568$, $I=0,3748$). Популяции Am1, Am3, Аа2, Ак1 и Ashm2 характеризуются средними значениями данных показателей.

Коэффициент подразделенности популяций (G_{st}) составляет 0,2576. Следовательно, на долю межпопуляционного разнообразия приходится 25,76%, а изученные популяции демонстрируют очень высокую степень дифференциации.

Генетические дистанции М.Нея (1978) минимальны между популяциями Аі и Ак2 (0,0711), Аі и Аша (0,0777), Аі и Ashm2 (0,0787) и Ashm2 и Аша (0,0784), произрастающими в Природном парке Ергаки (табл.14). Следовательно, генетическое сходство обусловлено географической близостью произрастания популяций. Также высокую степень сходства демонстрируют популяции, относящиеся к одному виду: Am1 и Am3 (0,1853), Аа1 и Аа2 (0,1613), Аа1 и Аа5 (0,1479), Аа2 и Аа5 (0,0976). Из популяций, относящихся к одному виду, наименьшую степень сходства демонстрируют популяции Ак1 и Ак2 (0,2350), удаленные друг от друга географически. Также наименьшей степенью сходства обладают следующие популяции: Am1 и Аа2 (0,2808), Аі и Am1 (0,2799), Ак1 и Аша (0,2648), Аа2 и Ак1 (0,2562), Am1 и Ashm2 (0,2537) и Ак1 и Ashm2 (0,2500).

Таблица 10 – Показатели генетического разнообразия популяций тысячелистников на основе данных ISSR -PCR анализа

Показатель	Am1	Am3	Aa1	Aa2	Aa5	Ak1	Ai	Ashm2	Asha	Ak2	Все П
H _e	0,3050 (0,1841)	0,3083 (0,1847)	0,3729 (0,1476)	0,2568 (0,2117)	0,3209 (0,1749)	0,2748 (0,1894)	0,3570 (1635)	0,3428 (0,1695)	0,3576 (0,1603)	0,3718 (0,1543)	0,4294 (0,0949)
I	0,4514 (0,2509)	0,4553 (0,2514)	0,5429 (0,1956)	0,3748 (0,2980)	0,4743 (0,2365)	0,4097 (0,2636)	0,5208 (0,2173)	0,5029 (0,2253)	0,5226 (0,2122)	0,5398 (0,2057)	0,6157 (0,1146)

Таблица 11 – Генетические дистанции Нея между популяциями тысячелистников на основе ISSR-PCR

П	Am1	Am3	Aa1	Aa2	Aa5	Ak1	Ai	Ashm2	Asha
Am1	****								
Am3	0.1853	****							
Aa1	0.2006	0.0981	****						
Aa2	0.2808	0.2028	0.1613	****					
Aa5	0.2033	0.1821	0.1479	0.0976	****				
Ak1	0.1887	0.2336	0.2200	0.2562	0.2032	****			
Ai	0.2799	0.1887	0.1549	0.1800	0.1604	0.2430	****		
Ashm2	0.2537	0.1959	0.1464	0.2315	0.1984	0.2500	0.0787	****	
Asha	0.2068	0.1821	0.1676	0.2194	0.1550	0.2648	0.0777	0.0784	****
Ak2	0.2402	0.2099	0.1667	0.2223	0.1901	0.2350	0.0711	0.0967	0.0968

На рисунке 12 представлена дендрограмма сходства популяций, с использованием дистанции Нея (1978). По результатам построения популяции разделились на два кластера. Первый кластер представляют собой две популяции вида *A. asiatica* (Aa1 и Aa4, коэффициент бутстрепа 99,51%). Вторым кластером представлен остальными восемью популяциями и всеми шестью изученными видами.

Во втором кластере наблюдается деление на два субкластера (коэффициент бутстрепа 78,10%). Первый субкластер представлен популяциями Aa5 и Ak1 (коэффициент бутстрепа 37,15%, объединение мало достоверно). Вторым поделен еще на два хорошо поддерживаемых субкластера. Первый из них представляют популяции *A. millefolium* (Am1 и Am3, коэффициент бутстрепа 96,90%). Во втором же оказались популяции четырех видов, объединенные регионом произрастания (Природный парк Ергаки). Данный субкластер обладает высокой степенью поддержки (коэффициент бутстрепа 99,71%), что говорит о единстве генофонда данных популяций.

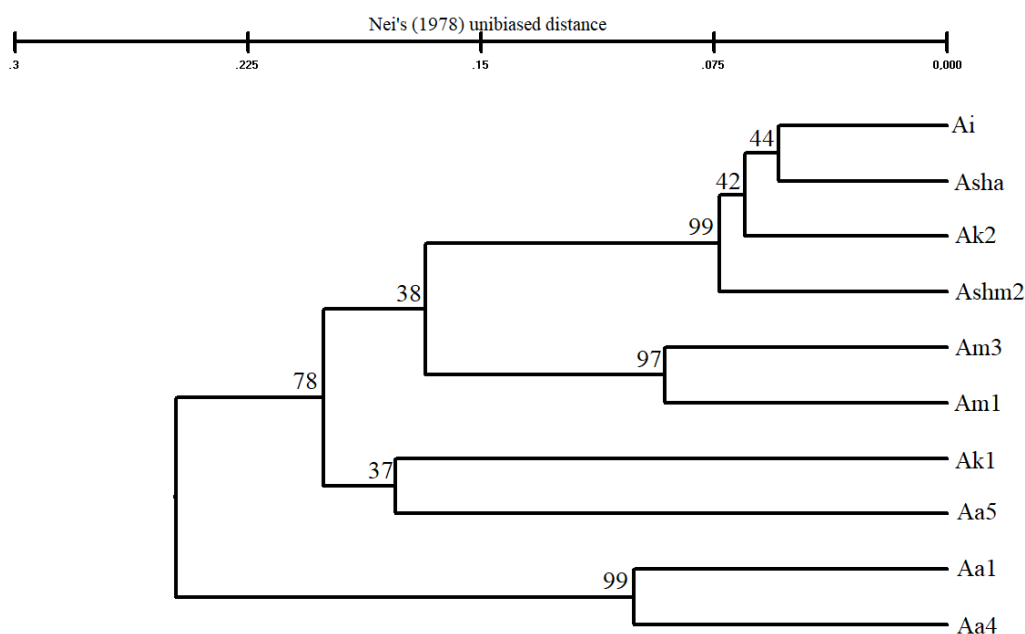


Рисунок 16 – Дендрограмма сходства популяций на основе данных ISSR-PCR анализа.

Таким образом, проведенный анализ генетической изменчивости популяций на основе ISSR-PCR анализа, показал, что высокий уровень внутривидовой изменчивости, рассчитанный с помощью различных показателей (P , H_e , I), характерен для популяций Aa1, Ak2, Ai и Asha. Относительно низкие показатели генетической вариабельности отмечены для Aa5. Генофонды всех изученных популяций характеризуются удовлетворительным состоянием и могут самостоятельно воспроизводиться.

Большая часть генетической изменчивости изученных популяций (74,24%) приходится на долю внутривидового разнообразия, а 25,76% является межвидовой, т.е. изученные популяции характеризуются высоким уровнем дифференциации, однако характерным для внутривидового уровня.

3.3 Филогенетический анализ р. *Achillea* с использованием маркеров ITS и trnL-F.

В ходе проведения филогенетического анализа было секвенировано по 1 образцу каждого из изученных видов (*A. millefolium*, *A. asiatica*, *A. kuprijanovii*, *A. schmakovii*, *A. inundata*, *A. schauloi*). Полученные после секвенирования последовательности были выравнены с аутгруппой (*Calendula officinalis*) при помощи алгоритма Clustal W. Для обоих полученных файлов с выравниванием были выбраны модели для построения филогенетических деревьев. Для образцов секвенированных с участка trnL-F, была выбрана модель F81+G (Felsenstein, 1981), для образцов секвенированных с участка ITS – TPM2 (Posada, 2008). Для построения филогенетического дерева с помощью MrBayes-3.2.5 были заданы следующие параметры, согласно с выбранной моделью. При запуске для образцов ITS анализ был остановлен при достижении значения среднего стандартного отклонения 0,027912, для trnL-F – 0,046932. (таблица 12).

Таблица 12 – Параметры для построения филогенетических деревьев

Участок	ITS	trnL-F
	Jmodeltest-2.1.10	
Филогенетическая модель	TPM2	F81+G
-lnL	3705.55128	2092.71935
BIC	7498.356832	4280.054748
	MrBayes-3.2.5	
Sets the number of substitution types (Nst)	mixed	1
Rates	Equal	Gamma
Ploidy	Diploid	Diploid
Number of generation	15000	15000
Sample frequency	100	100
Average standard deviation of split frequencies	0.027912	0.046932

Полученные филогенетические деревья были визуализированы при помощи программы FigTree.

Филогенетическое дерево для участка ITS избранных образцов показало следующее их расхождение. Наиболее близки друг к другу оказались виды *A. millefolium* и *A. schmakovii* (мера поддержки – 1), к данным двум видам близок вид *A. asiatica* (мера поддержки – 1). *A. kuprijanovii* и *A. schauloi* удалены от них (мера поддержки – 0.9035 и 0.8640, соответственно). Самым отдаленным от остальных оказался вид *A. inundata* (мера поддержки – 1).

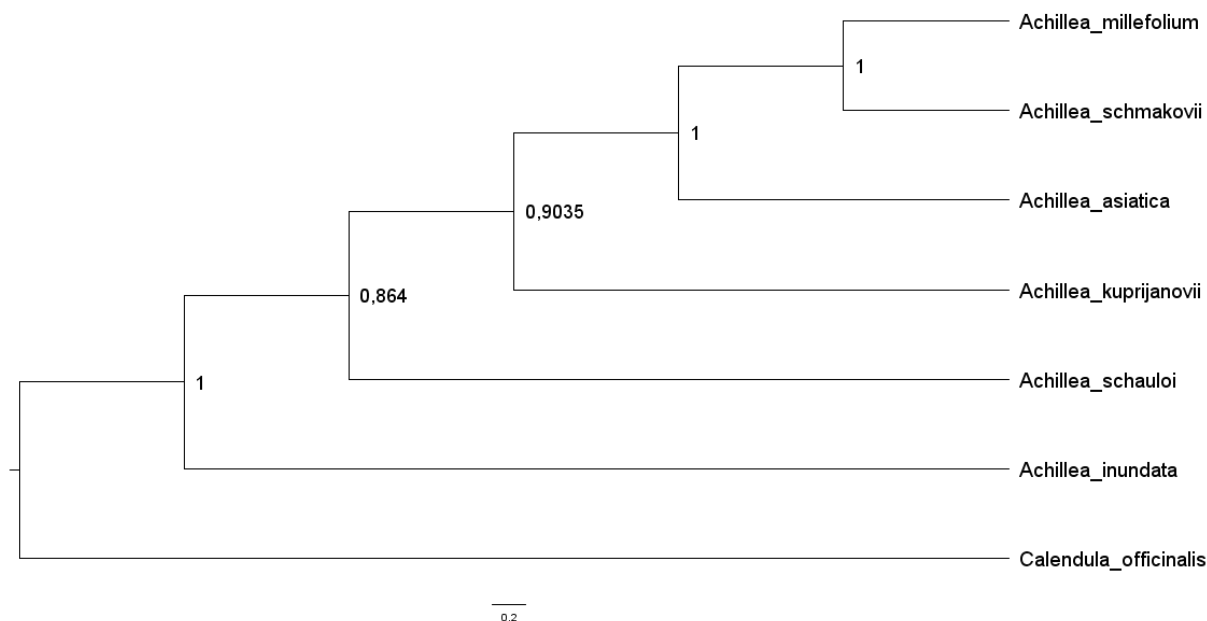


Рисунок 17 – Филогенетическое дерево для образцов ITS.

Филогенетическое дерево для участка trnL-F изучаемых образцов показало следующее их расхождение. Так в одну кладу вошли виды *A. asiatica* и *A. millefolium* (мера поддержки – 0.9137), наиболее близок к ним *A. inundata* (мера поддержки – 0.854). Вторую кладу образовали виды *A. schmakovii* и *A. schauloi* (мера поддержки – 0.8673), а также *A. kuprijanovii* (мера поддержки – 0.8628).

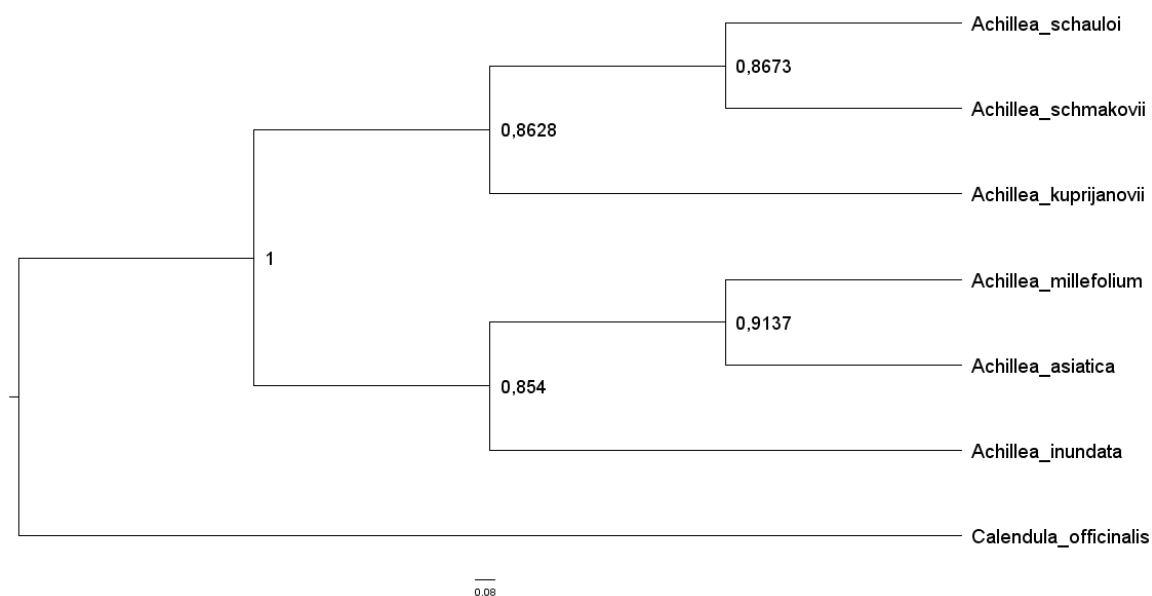


Рисунок 18 – Филогенетическое дерево для образцов trnL-F.

Таким образом проведенный филогенетический анализ показал различия в расположении видов на дереве при анализе различных участков ДНК. Это может свидетельствовать о независимой эволюции участков ядерной и хлоропластной ДНК. Достоверное объединение на двух деревьях показали виды *A. asiatica* и *A. millefolium*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований было показано, что виды рода *Achillea*, в зависимости от примененного типа анализа, в той или иной мере расходились друг с другом.

Так, выявлено, что популяции *A. asiatica*, *A. kuprijanovii*, *A. inundata*, *A. schauloi*, *A. schmakovii* объединяются в одну группу по большинству видов статистического анализа морфологических данных. Четкую обособленность от других видов тысячелитника демонстрируют популяции *A. millefolium*, произрастающие в г. Красноярске (березняк разнотравно-осочковый) и в окрестностях с. Зелеево (луг крупнотравно-злаковый). Для особей данных популяций характерны меньшие показатели следующих признаков, по сравнению с другими популяциями того же вида: x2 (высота общего соцветия), x5 (ширина рахиса с крылом), x7 (ширина доли первого порядка листа срединной формации), x8 (длина доли второго порядка листа срединной формации), x11 (длина доли первого порядка листа верховой формации), x15 (расстояние между долями листа верховой формации), x16 (количество соцветий).

Существует мнение, что «таксоны» рода *Achillea* являются внутривидовыми единицами, только находящимися на пути к полному обособлению, т. е. полувидами (Борский, 2014). Как отмечает Н. В. Степанов (2016), *A. kuprijanovii* и *A. schauloi* близки к разновидностям очень распространенного в Сибири *A. asiatica*. А А. Н. Куприянов (1998) считает, что *A. schmakovii* действительно близка к *A. millefolium*, по параметрам долек листьев, что подтверждается проведенным нами морфометрическим анализом.

По данным популяционного молекулярно-генетического анализа с использованием маркеров ISSR выявлено разделение изученных популяций по географическому принципу. Так, популяции, образцы которых были собраны в Природном парке Ергаки, оказались наиболее близки друг к другу (коэффициент бутстрепа 99%). Далее по парам объединились популяции вида

A. millefolium, произрастающие вблизи г. Красноярска. Следующую пару составили популяции видов *A. asiatica* и *A. kuprijanovii*, образцы которых были собраны в географически близких Краснотуранском и Ермаковском районах. Эта закономерность подтверждается и другими исследователями (Ehrendorfer, 2005; Guo, 2005, 2012).

Филогенетический анализ показал различия в расположении видов при анализе различных участков ДНК. Это может свидетельствовать о независимой эволюции участков ядерной и хлоропластной ДНК. Достоверное объединение на двух деревьях показали виды *A. asiatica* и *A. millefolium*. Исследования, проведенные Yan-Ping Guo (2012), также демонстрируют противоречивые результаты между деревьями, построенными по последовательностям ядерных и пластидных межгенных спейсеров. Автор считает, что причиной данной несовместимости деревьев могла быть вторичная гибридизация, препятствующая определению точного филогенеза изученных видов.

Следует отметить, что молекулярно-генетических исследований видов рода *Achillea* проведено крайне мало. Однако все авторы (Ehrendorfer, 2005; Guo, 2012) сходятся на том, что виды рода *Achillea* обладают высокой изменчивостью. Полученные нами данный момент результаты не позволяют сделать выводы о таксономической самостоятельности видов р.*Achillea*. Требуется дальнейшие исследования этой сложной группы, поиск и отработка методов, позволяющих выявить особи гибридогенного происхождения.

ВЫВОДЫ

1. Анализ морфологических данных показал, что близкородственные виды р. *Achillea* представляют смешанную и слабо дифференцируемую группу, что может быть следствием гибридизации. Методами главных компонент, K-means и кластерным анализом установлено обособленное положение популяций *A. millefolium*. Диагностическими признаками являются длина стебля (x1), ширина рахиса с крылом (x5), параметры листа срединной формации (x6 – x10), количество соцветий (x16).
2. Высокий уровень генетического полиморфизма характерен для популяций тысячелистников азиатского, Куприянова, пойменного, Шауло (Aa1, Ak2, Ai, Asha). Изученные популяции характеризуются высоким уровнем внутривидовой генетической дифференциации ($G_{st}=0,2576$) и разделяются, преимущественно, по географическому принципу.
3. Филогенетический анализ, проведенный с использованием ITS и trnL-F маркеров показал различия в местоположении отдельных видов. Это может свидетельствовать о независимой эволюции участков ядерной и хлоропластной ДНК. Достоверное объединение на двух деревьях показали виды *A. asiatica* и *A. millefolium*.
4. Полученные нами данный момент результаты не позволяют сделать выводы о таксономической самостоятельности видов р. *Achillea*. Требуются дальнейшие исследования этой сложной группы, поиск и отработка методов, позволяющих выявить особи гибридного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипова Е.М. Флора северных лесостепей Средней Сибири : автореф. дис. ... д-р биол. наук : 03.00.05 / Е.М. Антипова. – Томск, 2008. – 35 с.
2. Антипова, Е.М. Флора внутриконтинентальных островных лесостепей средней Сибири: монография / Е.М.Антипова // Краснояр. Гос. Пед. Ун-т им. В.П.Астафьева. – Красноярск, 2012. – 662 с.
3. Афанасьев, К. С. Флора СССР. М. Л. Т. 24 / К. С. Афанасьев : Издательство Академии наук СССР, 1957 – 262 с.
4. Борский, М.Н. Морфологический полиморфизм *Achillea millefolium* S.L. в Самарской области / М.Н.Борский // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2014. – № 1. – С. 29–42
5. Растительные ресурсы России / Буданцев, А.Л., Беленовская, Л.М., Бобылева, Н.С., Данчул, Т.Ю., Битюкова, Н.В., Шагова, Л.И., Петрова, Н.В. – Санкт-Петербург-Москва : Общество с ограниченной ответственностью Товарищество научных изданий КМК. – 2011. – 630 с.
6. Водчиц Н. В. Подбор условий проведения ISSR-ПЦР для сортовой голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum*) / Н. В. Водчиц, Е. О. Юрченко, А. А. Волотович // ПолесГУ. – Пинск. 2014. – С. 3–7.
7. Комаров, В. Л. Флора СССР т. 26 : энциклопедия / В. Л. Комаров – Ленинград: Издательство Академии наук СССР. – 1961. – 919с.
8. Кондратюк Е. М. Род *Achillea* L. / Е. М. Кондратюк // Флора УРСР [Т. 11] : АН УРСР. – Киев. – 1962. – С. 235–265.
9. Копынева, Г.А. Род *Achillea* L. – тысячелистник / Г. А. Копынева // Флора Красноярского края. Томск. – 1980. – №.10. – С. 28–29.

10. Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – №. 4. – С. 279–296.
11. Калинкина Г. И. Химический состав эфирных масел некоторых видов тысячелистника флоры Сибири / Г. И. Калинкина, А. Д. Дембицкий, Т. П. Березовская// Химия растительного сырья. – 2000. – №3. – С.13–18.
12. Клоков М. В., Критская Л. И. род *Achillea* L / М. В. Клоков, Л. И. Критская // Тысячелистники : Наукова думка. – Киев, – 1985. – С. 198–202.
13. Криницына А. А., Простой и быстрый метод выделения ДНК из гербарных образцов долгого срока хранения / А.А. Криницына и др// Биохимия. – Москва. 2015. – т.80 вып.11. – 1698–1706 с.
14. Куприянов А. Н. К систематике рода *Achillea* L. Южной Сибири / А. Н. Куприянов // Ботанические исследования Сибири и Казахстана. Вып. 1. – 1998 - С. 18–26.
15. Матвеева Т. В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т. В. Матвеева // Генетика популяций и эволюция. – 2011. – Т .9. №1. – С. 32–43.
16. Немерешина, О.Н. Анатомо-морфологические изменения тысячелистника обыкновенного в техногенной зоне / О.Н. Немерешина, Н.Ф.Федерович, А.В.Филиппова // Известия ОГАУ. – 2014. – С. 158–161.
17. Новиков П. С. Подбор ISSR-праймеров для фрагментного анализа ДНК сосны обыкновенной / П. С. Новиков // Научному прогрессу – творчество молодых : сб. материалов междунар. молодеж. научн.

конф. поестеств.-науч. и техн. дисциплинам, 15–16 апр. 2011 г. : в 3 ч.
Йошкар-Ола : Марийский гос. техн. ун-т, 2011. Ч. 3. С. 35–36.

18. Орлова Н. И. Конспект флоры Вологодской области / Н. И. Орлова // Труды Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей. – 1993. – Т. 77. № 3. – 262 с.
19. Положий А. В., Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири / А. В. Положий, Э. Д. Крапивкина – Томск : Том. гос. ун-т им. В. В. Куйбышева. – 1985. – 159 с.
20. Сергиевская, Л. П. Об *Achillea setacea* Walst.et Kit. в Сибири / Л. П. Сергиевская // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова при Томском гос. ун-те. – 1946. – №1. – С. 5–7.
21. Скворцов В. Э. Иллюстрированное руководство для ботанической практики и экспериментов в Средней России / В. Э. Скворцов. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, – 2004. – 387 с.
22. Скрипчинская Е.А. Изучение ресурсов лекарственных растений на ландшафтной основе (на примере тысячелистника обыкновенного) / Е.А. Скрипчинская. // Проблемы экологической безопасности и сохранения природно-ресурсного потенциала: матер. науч.-практич. конф. Ставрополь. – 2004 г. – 2004. – С. 76–79.
23. Слатинская О.В. Морфологическая изменчивость и оценка урожайности популяции *Achillea millefolium* L. *Sensulato* в окрестностях г.Красноярска / О.В. Слатинская, И.Е. Ямских // Материалы сборника Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока: Чтение памяти Л.М. Черепнина и материалы Шестой Всероссийской конференции с международным участием, посвященные 110-летию со дня рождения Л.М. Черепнина и 80-летию Гербария им. Л.М. Черепнина (KRAS) / отв. ред. Е.М. Антипова;

ред.кол.; Краснояр. гос. ун-т им. В.П. Астафьева. – Красноярск. 2016. – 334 с.

24. Степанов, Н.В. Разнообразие тысячелистников (род *Achillea* L. – Asteraceae) в приенисейских Саянах / Н.В. Степанов // Вестник КрасГАУ. – 2016. – №6. – С. 31–38.
25. Чудновская, Г.В. Тысячелистник азиатский (*Achillea asiatica* Serg.) в Восточном Забайкалье / Г.В. Чудновская // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – С. 28–31.
26. Шауло, Д. Н. Род *Achillea* L. – тысячелистник / Д. Н. Шауло // Флора Сибири. Под ред. И.М. Красноборова. Новосибирск. - 1997. – Т. 13. – С. 65–70.
27. Шмаков А. И. Флора и растительность Алтая: Труды Южно-Сибирского ботанического сада / Шмаков А. И. // Барнаул: Изд-во АГУ, 1995. – 193 с. 14 илл.
28. Álvarez I., Wendel J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference / I. Álvarez, J. F. Wendel // Molecular phylogenetics and evolution. – 2003. – Т. 29. – №. 3. – С. 417–434.
29. Bache S. M., Wickham H. magrittr: a forward-pipe operator for R / S. M. Bache, H. Wickham // R package version. – 2014. – Т. 1. – №. 1.
30. Badr, A., El-Shazly, H.H., Ahmed, H.I.S., Hamouda, M., El-Khateeb, E., Sakr, M., Genetic diversity of *Achillea fragrantissima* in Egypt inferred from phenotypic variations and ISSR markers associated with traits of plant size and seed yield / A. Badr, H. H. El-Shazly, H.I.S. Ahmed, M. Hamouda, E. El-Khateeb, M. Sakr // Plant Genetic Resources. – 2017. – Т. 15. – №. 3. – С. 239.
31. Bağda E. Investigation of the genetic structure of some Anatolian *Achillea* L. (Anthemideae, Asteraceae) populations using the ISSR markers / E.

Bağda //Trakya University Journal of Natural Sciences. – 2018. – T. 19. – №. 1. – C. 1-10.

32. Bakker, F.T., Culham, A., Gomez-Martinez*, R., Carvalho, J., Compton, J., Dawtrey, R., Gibby, M. Patterns of nucleotide substitution in angiosperm cpDNA trnL (UAA)–trnF (GAA) regions / F.T. Bakker, A. Culham, R. Gomez-Martinez, J. Carvalho, J. Compton, R. Dawtrey, M. Gibby, //Molecular Biology and Evolution. – 2000. – T. 17. – №. 8. – C. 1146–1155
33. Baldwin B. G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny / B. G. Baldwin, M.J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, M. J. Donoghue //Annals of the Missouri botanical garden. – 1995. – C. 247–277.
34. Bonnard G., Michel F., Weil J.H., Steinmetz A. Nucleotide sequence of the split tRNA UAA Leu gene from *Vicia faba* chloroplasts: evidence for structural homologies of the chloroplast tRNA Leu intron with the intron from the autosplicable *Tetrahymena* ribosomal RNA precursor / G. Bonnard, F. Michel, J. H. Weil, A. Steinmetz //Molecular and General Genetics MGG. – 1984. – T. 194. – №. 1. – C. 330–336.
35. Borsch, T., Hilu, K.W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C., Barthlott, W. Noncoding plastid trnT- trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms / T. Borsch, K. W. Hilu, D. Quandt, V. Wilde, C. Neinhuis, W. Barthlott, W. //Journal of evolutionary biology. – 2003. – T. 16. – №. 4. – C. 558–576.
36. Dainou K., Blanc-Jolivet, C., Degen, B., Kimani, P., Ndiade-Bourobou, D., Donkpegan, A.S.L., Tosso, F., Kaymak, E., Bourland, N., Doucet, J.-L., Hardy, O.J. Revealing hidden species diversity in closely related species

- using nuclear SNPs, SSRs and DNA sequences – a case study in the tree genus *Milicia* / K. Dainou, C. Blanc-Jolivet, B. Degen, P. Kimani, D. Ndiade-Bourobou, A.S.L. Donkpegan, F. Tosso, E. Kaymak, N. Bourland, J. L. Doucet, O. J. Hardy. // *BMC Evolutionary Biology*. – 2016. – T. 16. – №. 1. – C. 1-15.
37. de Vries A., Ripley B. D. *ggdendro: Create Dendrograms and Tree Diagrams Using 'ggplot2'* / A. de Vries, B. D. Ripley // *R package version 0.1-20*. – 2016.
38. Doyle, J.J., Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle , J.L. Doyle // *Phytochemical Bulletin*. – 1987. – T. 19. – №. 1. – C. 11-15.
39. Ebrahimi M. Inter- and intra-specific genetic diversity of Iranian yarrow species *Achillea santolina* and *Achillea tenuifolia* based on ISSR and RAPD markers / M. Ebrahimi // *Genetic and Molecular Research*. – 2012. – T. 11. – №. 3. – C. 2855–2861.
40. Ehrendorfer F., Guo Y. P. Multidisciplinary studies on *Achillea sensu lato* (Compositae-Anthemideae): new data on systematics and phylogeography / F. Ehrendorfer, Y. P. Guo // *Willdenowia*. – 2006. – T. 1. – №. 36. – C. 69-87.
41. Farajpour, M., Ebrahimi, M., Amiri, R., Golzari, R., Sanjari, S. Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* accessions from Iran using ISSR marker / M. Farajpour, M. Ebrahimi, R. Amiri, R. Golzari, S. Sanjari // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2012. – T. 43. – C. 73–79.
42. Feliner G. N., Rosselló J. A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants / G. N. Feliner, J. A. Rosselló // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2007. – T. 44. – №. 2. – C. 911–919.

43. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach / J. Felsenstein //Journal of molecular evolution. – 1981. – T. 17. – №. 6. – C. 368-376.
44. Fitmawati F., Fauziah, R., Hayati, I., Sofiyanti, N., Inoue, E., Matra, D.D. Phylogenetic analysis of Mangifera from central region of Sumatra using trnL-F intergenic spacer / F. Fitmawati, R. Fauziah, I. Hayati, N. Sofiyanti, E. Inoue, D. D. Matra //Biodiversitas Journal of Biological Diversity. – 2017. – T. 18. – №. 3. – C. 1035-1040.
45. Gharibi S., Rahimmalek, M., Mirlohi, A., Majidi, M.M., Tabatabaei, B. E. S. Assesmentog genetic diversity in Achilleamillefolium subsp. Millefolium and Achilleamillefolium subsp. Elbursensis using morphological and ISSR markers / S. Gharibi, M. Rahimmalek, M. M. Majidi, B. E. S. Tabatabaei // Journal of Medical Plants Research. 2011. – T. 5 –№. 11. – C. 2413–2423.
46. Guichoux E., Current trends in microsatellite genotyping. / E. Guichoux // Mol Ecol Resour. 2011 – T. 11. – №. 4. – C. 591–611.
47. Guo Y. P., Saukel, J., Mittermayr, R., Ehrendorfer, F. AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of Achillea (Asteraceae- Anthemideae) / Y. P. Guo, J. Saukel, R. Mittermayr, F. Ehrendorfer. //New Phytologist. – 2005. – T. 166. – №. 1. – C. 273–290.
48. Guo Y. P., Saukel J., Ehrendorfer F. AFLP trees versus scatterplots: evolution and phylogeography of the polyploid complex Achillea millefolium agg. (Asteraceae) //Taxon. – 2008. – T. 57. – №. 1. – C. 153-169.
49. Guo Y. P. Wang, S.-Z., Vogl, C., Ehrendorfer, F. Nuclear and plastid haplotypes suggest rapid diploid and polyploid speciation in the N Hemisphere Achillea millefolium complex (Asteraceae) / Y. P. Guo, S. Z.

- Wang, C. Vogl, F. Ehrendorfer // BMC evolutionary biology. – 2012. – T. 12. – №. 1. – C. 1–18.
50. Hamilton M. B., Braverman J. M., Soria-Hernanz D. F. Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae / M. B. Hamilton, J. M. Braverman, D. F. Soria-Hernanz // Molecular biology and evolution. – 2003. – T. 20. – №. 10. – C. 1710-1721.
51. Inotai K., György, Z., Kindlovits, S., Várady, G., Zámборинé Németh, É. Evaluation of yarrow (*Achillea*) accessions by phytochemical and molecular genetic tools / K. Inotai, Z. György, S. Kindlovits, G. Várady, E. Zámборинé Németh // Journal of applied botany and food quality, 2016. – T. 89. – C. 105–112.
52. Java S. R., Studer M. Studer M. M. Package 'XLConnect' / S. R. Java, M. Studer, M. M. Studer – 2020.
53. Jukes T. H. Cantor, C. R. Evolution of protein molecules / T. H. Jukes, C. R. Cantor // Mammalian protein metabolism. – 1969. – T. 3. – C. 21-132.
54. Kassambara, A., Mundt, F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses / A. Kassambara, F. Mundt //R package version. – 2017. – T. 1. – №. 5. – C. 337-354.
55. Kassambara A. Rstatix: pipe-friendly framework for basic statistical tests / A. Kassambara //R package version 0.6. 0. – 2020.
56. Kruskal W. H., Wallis W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis / W. H. Kruskal, W. A. Wallis // Journal of the American statistical Association. – 1952. – T. 47. – №. 260. – C. 583-621.
57. LIRMM [Электронный ресурс] : MAB: Méthodes et algorithmes pour la bio informatique // Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de

Microélectronique de Montpellier – Режим доступа: <http://www.lirmm.fr/>
(дата обращения 14.03.2021).

58. López-Vinyallonga S., Soriano, I., Susanna, A., Montserra, J.M., Roquet, C., Garcia-Jacas, N. The polyploid series of the *Achillea millefolium* aggregate in the Iberian Peninsula investigated using microsatellites / S. López-Vinyallonga, I. Soriano, A. Susanna, Montserra, J.M., Roquet, C., Garcia-Jacas, N. //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 6. – С. e0129861.
59. MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations / J. MacQueen // Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability. – 1967. – Т. 1. – №. 14. – С. 281-297.
60. Mansour A, Ismail, H.M., Ramadan, M.F., Gyulai, G. Variations in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars grown under heat stress / A. Mansour, H. M. Ismail, M. F. Ramadan, G. Gyulai //Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. – 2009. – Т. 4. – №. 2. – С. 118-127.
61. Miller M. P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data / M. P. Miller //Computer software distributed by the author. – 1997.
62. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals / M. Nei //Genetics. – 1978. – Т. 89. – №. 3. – С. 583-590.
63. Neuwirth E., Neuwirth M. E. Package 'RColorBrewer' / E. Neuwirth, M. E. Neuwirth // ColorBrewer Palettes. – 2014.
64. Paterson I. D., Downie D. A., Hill M. P. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South

- Africa and its relevance to biological control / I. D. Paterson, D. A. Downie, M. P. Hill // *Biological Control*. – 2009. – T. 48. – №. 1. – C. 84-91.
65. Pirie M. D. Vargas, M.P.B., Botermans, M., Bakker, F.T., Chatrou, L.W. Ancient paralogy in the cpDNA trnL- F region in Annonaceae: implications for plant molecular systematics / M. D. Pirie, M.P.B. Vargas, M. Botermans, F.T. Bakker, L.W. Chatrou // *American Journal of Botany*. – 2007. – T. 94. – №. 6. – C. 1003-1016.
66. Posada, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging / D. Posada // *Molecular Biology Evolution*. – 2008. T. 25. №. 6. – C. 1253–1256.
67. Poyaraz I. Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques / I. Poyaraz // *Comptes Rendus Biologies*. – June 2016. – T. 339, – №. 5-6. – C. 171-178.
68. R. Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R. Core Team // Vienna, Austria, 2013.
69. Rahimmalek M., Sayed Tabatabaei, B.E., Arzani, A., Etemadi, N. Assesment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP) / M. Rahimmalek, B. E. Sayed Tabatabaei, A. Arzani, N. Etemadi // *Biochemical systematic and ecology*, 2009. – 37. – C. 354–361
70. Rahimmalek. M. Development and characterization of microsatellite markers for genomic analysis of yarrow (*Achillea millefolium* L.) /M. Rahimmalek, B.E.S. Tabatabaei, M. Khorrami // *Genes&Genomics*. – 2011.
71. Rambaut A. FigTree v1. 4.2, a graphical viewer of phylogenetic trees / A. Rambaut / A. Rambaut // Java. 1.4. 2. – 2018.
72. Ronquist F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a

- large model space / F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, J. P. Huelsenbeck, // *Systematic biology*. – 2012. – T. 61. – №. 3. – C. 539–542.
73. Saukel J., Anchev, M., Guo, Y.P., Vitkova, A., Nedelcheva, A., Goranova, V., Konakchiev, A., Lambrou, M., Nejati, S., Rauchensteiner, F. Comments on the biosystematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) in Bulgaria / J. Saukel, M. Anchev, Y. P. Guo, A. Vitkova, A. Nedelcheva, V. Goranova, A. Konakchiev, M. Lambrou, S. Nejati, F. Rauchensteiner // *Phytologia Balcanica*. – 2003. – T. 9. – №. 3. – C. 361–400.
74. Schultz J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P.N., Dandekar, T., Wolf, M. The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses / J. Schultz, T. Müller, M. Achtziger, P. N. Seibel, T. Dandekar, M. Wolf // *Nucleic acids research*. – 2006. – T. 34. – №. 2. – C. 704–707.
75. Schwarz G. Estimating the dimension of a model / G. Schwarz // *Annals of statistics*. – 1978. – T. 6. – №. 2. – C. 461–464.
76. Shaw J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., Small, R.L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis / J. Shaw, E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling, R. L. Small // *American journal of botany*. – 2005. – T. 92. – №. 1. – C. 142–166.
77. Smith J. F., Clark, J.L., Amaya-Márquez, M., Marín-Gómez, O.H. Resolving incongruence: species of hybrid origin in *Columnnea* (Gesneriaceae) / J. F. Smith, J. L. Clark, M. Amaya-Márquez, O. H. Marín-Gómez // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2017. – T. 106. – C. 228–240.

78. Taberlet P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA / P. Taberlet, L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet // *Plant molecular biology*. – 1991. – Т. 17. – №. 5. – С. 1105–1109.
79. Tamura K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // *Molecular biology and evolution*. – 2007. – Т. 24. – №. 8. – С. 1596–1599.
80. The Plant List [Электронный ресурс] : *Achillea* // The taxonomic hierarchy. – Режим доступа: <http://www.theplantlist.org>
81. Weiguo Z., Yile, P., Zhifang, Z., Shihai, J., Xuexia, M., Yongping, H. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and trnL-F sequences / Z. Weiguo, P. Yile, Z. Zhifang, J. Shihai, M. Xuexia, H. Yongping // *African Journal of Biotechnology*. – 2005. – Т. 4. – №. 6. – С. 563–569.
82. Weiss-Schneeweiss H., Emadzade, K., Jang, T.-S., Schneeweiss, G.M. Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants / H. Weiss-Schneeweiss, K. Emadzade, T. S. Jang, G.M. Schneeweiss // *Cytogenetic and genome research*. – 2013. – Т. 140. – №. 2-4. – С. 137–150.
83. Wickham H. *ggplot2* / H. Wickham // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. – 2011. – Т. 3. – №. 2. – С. 180–185.
84. Wickham H., Bryan J. *readxl: Read excel files* / H. Wickham, J. Bryan // *R package version*. – 2019. – Т. 1. – №. 1.
85. Wickham H., Wickham M. H. Package ‘tidyr’ / H. Wickham, M. H. Wickham // *Easily Tidy Data with 'spread' and 'gather ()' Functions*. – 2017.

86. Wickham, H. tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse' / H. Wickham // R package version 1. – 2017.
87. Wikström N., Kenrick P., Chase M. Epiphytism and terrestrialization in tropical Huperzia (Lycopodiaceae) / N. Wikström, P. Kenrick, M. Chase // Plant Systematics and Evolution. – 1999. – T. 218. – №. 3. – C. 221–243.
88. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods / F. Wilcoxon // Breakthroughs in statistics. – Springer, New York, – 1992. – C. 196-202.
89. Williams S. E., Albert V. A., Chase M. W. Relationships of Droseraceae: a cladistic analysis of rbcL sequence and morphological data / S. E. Williams, V. A. Albert, M. W. Chase // American Journal of Botany. – 1994. – T. 81. – №. 8. – C. 1027–1037.
90. Wold S., Esbensen K., Geladi P. Principal component analysis / S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi // Chemometrics and intelligent laboratory systems. – 1987. – T. 2. – №. 1-3. – C. 37–52.
91. Wright S. Evolution and the genetics of population Vol. 4. / S. Wright – Chicago : University of Chicago press, 1978. – 580 c.
92. Yeh F. C., Yang, R.C., Boyle, T. POPGENE, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis / F. C. Yeh, R.C. Yang, T. Boyle // Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. – 1999. C. 1–29.
93. Zhang Q. P., Wei, X., Liu, W., Dong, W., Liu, N., Zhang, YuPing, Xu, M., Liu, S., Zhang, YuJun, Ma, X. Phylogenetic relationship in the plants of subgenus Prunophora (Rosaceae) inferred from the chloroplast DNA region, trnL-F / Q. P. Zhang, X. Wei, W. Liu, W. Dong, N. Liu, Zhang, YuPing, M. Xu, S. Liu, Zhang, YuJun, X. Ma // Journal of Fruit Science. – 2017. – T. 34. – №. 10. – C. 1249–1257.

94. Zhao H. B., Chen, F.-D., Chen, S.-M., Wu, G.-S., Guo, W.-M. Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast trn LFI sequences / H. B. Zhao, F.-D. Chen, S.-M. Chen, G.-S. Wu, W.-M. Guo // *Plant systematics and evolution*. – 2010. – T. 284. – №. 3. – C. 153–169.

Приложение А – Среднепопуляционные значения признаков *Achillea millefolium*
в различных популяциях

Признаки		Am1	Am2	Am3	Am4
признаки	высота растения (x1), см	70,05± 10,69	73,66± 11,70	74,52± 13,59	78,12± 14,78
	высота общего соцветия (x2), см	6,70± 2,86	13,94± 9,33	5,88± 2,94	14,71± 7,25
	средняя длина междоузлия (x3), см	4,95± 1,04	8,10± 2,06	7,84± 1,63	8,49± 1,43
	количество листьев (x4), см	7,15 ± 0,67	6,44± 0,71	7,94± 0,93	5,84± 0,73
	ширина рахиса с крылом (x5), см	0,28± 0,06	0,33± 0,10	0,30± 0,06	0,34± 0,07
Лист срединной формации	длина доли первого порядка (x6), см	6,74± 1,64	10,28± 3,41	7,85± 1,92	8,40± 2,59
	ширина доли первого порядка (x7), см	1,04 ± 0,51	2,03± 0,59	1,53± 0,62	2,19± 0,62
	длина доли второго порядка (x8), см	0,49± 0,27	1,09± 0,33	0,77± 0,28	1,54± 0,71
	ширина доли второго порядка (x9), см	0,19± 0,05	0,44± 0,17	0,30± 0,12	0,34± 0,18
	расстояние между долями (x10), см	0,18± 0,05	0,43± 0,12	0,27± 0,10	0,32± 0,11
	отношение длины листа срединной формации к ширине (x21)	10,00± 1,61	5,14± 1,31	5,44± 1,57	3,88± 0,96
формации	длина доли первого порядка (x11), см	2,55± 0,76	4,13± 1,13	2,73± 0,75	3,69± 1,00
	ширина доли первого порядка (x12), см	0,51± 0,16	1,26± 0,38	0,73± 0,26	1,07± 0,37
	длина доли второго порядка (x13), см	0,23± 0,07	0,65± 0,21	0,36± 0,13	0,51± 0,20
	ширина доли второго порядка (x14), см	0,11± 0,03	0,25± 0,08	0,18± 0,06	0,16± 0,07
	расстояние между долями (x15), см	0,01± 0,03	0,28± 0,08	0,14± 0,06	0,19± 0,07
Генеративные признаки	количество соцветий (x16), шт	124,35 ± 57,22	156,08 ± 67,22	137,21 ± 69,85	154,00 ± 55,06
	диаметр корзинки (x17), см	0,25± 0,03	0,32± 0,12	0,25± 0,04	0,31± 0,05
	количество трубчатых цветков (x18), шт	9,38 ± 2,64	9,24± 2,90	9,15± 2,69	13,42± 2,64
	длина трубчатых цветков (x19), см	0,40± 0,04	0,34± 0,05	0,39± 0,06	0,42± 0,05
	длина язычковых цветков (x20), см	0,48 ± 0,03	0,47± 0,05	0,47± 0,05	0,53± 0,04

Приложение Б – Среднепопуляционные значения признаков *Achillea asiatica* в различных популяциях

Признаки		Aa1	Aa2	Aa3	Aa4	Aa5
Общие вегетативные признаки	высота растения (x1), см	32,13± 7,57	46,59± 13,08	52,87± 8,94	61,66± 17,44	57,61± 6,27
	высота общего соцветия (x2), см	4,58± 1,79	5,65± 3,39	5,42± 2,82	4,43± 2,53	4,53± 1,16
	средняя длина междоузлия (x3), см	3,70± 0,94	6,06± 1,99	4,80± 1,62	6,50± 1,84	5,08± 1,06
	количество листьев (x4), см	6,64± 0,88	6,43± 1,19	7,77± 0,84	7,50± 1,02	5,50± 0,51
	ширина рахиса с крылом (x5), см	0,24± 0,05	0,22± 0,06	0,27± 0,07	0,22± 0,05	0,25± 0,03
Лист срединной формации	длина доли первого порядка (x6), см	4,15± 0,95	6,84± 2,51	5,82± 1,68	6,50± 1,76	7,29± 2,09
	ширина доли первого порядка (x7), см	0,64± 0,19	1,03± 0,36	0,90± 0,31	1,19± 0,52	1,10± 0,34
	длина доли второго порядка (x8), см	0,31± 0,09	0,61± 0,25	0,44± 0,15	0,59± 0,26	0,54± 0,16
	ширина доли второго порядка (x9), см	0,13± 0,03	0,19± 0,08	0,16± 0,05	0,25± 0,08	0,29± 0,06
	расстояние между долями (x10), см	0,16± 0,04	0,24± 0,10	0,16± 0,05	0,22± 0,07	0,28± 0,06
	отношение длины листа срединной формации к ширине (x21)	6,78± 1,74	6,85± 1,67	6,82± 1,81	6,17± 2,25	6,78± 1,41
Лист верховой формации	длина доли первого порядка (x11), см	1,70± 0,42	2,84± 0,85	2,24± 0,55	2,28± 0,55	3,29± 0,77
	ширина доли первого порядка (x12), см	0,41± 0,13	0,61± 0,30	0,44± 0,17	0,46± 0,16	0,70± 0,23
	длина доли второго порядка (x13), см	0,19± 0,06	0,39± 0,16	0,22± 0,09	0,23± 0,08	0,34± 0,11
	ширина доли второго порядка (x14), см	0,08± 0,03	0,13± 0,06	0,09± 0,02	0,12± 0,03	0,18± 0,05
	расстояние между долями (x15), см	0,08± 0,03	0,15± 0,08	0,08± 0,03	0,10± 0,03	0,21± 0,05
Генеративные признаки	количество соцветий (x16), шт	106,44 ± 41,66	75,16± 43,80	103,51± 57,32	58,79± 25,84	78,90± 14,31
	диаметр корзинки (x17), см	0,25± 0,02	0,29± 0,07	0,25± 0,03	0,28± 0,05	0,29± 0,05
	количество трубчатых цветков (x18), шт	9,95± 3,86	11,40± 3,99	10,45± 2,46	11,94± 3,01	11,96± 2,35
	длина трубчатых цветков (x19), см	0,35± 0,06	0,37± 0,05	0,39± 0,03	0,41± 0,04	0,33± 0,02
	длина язычковых цветков (x20), шт	0,47± 0,04	0,47± 0,04	0,47± 0,04	0,49± 0,03	0,43± 0,03


Приложение В – Среднепопуляционные значения признаков *Achillea shaulo*, *Achillea kuprijanovii*, *Achillea schmakovi*, *Achillea inundata* в различных популяциях

Признаки		Ak2	Ai	Ashm1	Ashm2	Asha
Общие вегетативные признаки	высота растения (x1), см	56,68± 11,63	82,55± 11,06	57,47± 9,85	55,75± 13,27	49,93± 8,15
	высота общего соцветия (x2), см	6,49± 2,37	4,32± 0,82	6,51± 2,22	3,73± 0,88	2,53± 0,66
	средняя длина междоузлия (x3), см	4,57± 0,90	4,02± 0,75	4,96± 1,20	3,94± 0,84	3,46± 0,71
	количество листьев (x4), см	7,63± 0,55	6,83± 1,34	7,20± 0,66	5,76± 1,00	6,96± 0,99
	ширина рахиса с крылом (x5), см	0,26± 0,04	0,28± 0,05	0,31± 0,06	0,25± 0,05	0,19± 0,03
Лист срединной формации	длина доли первого порядка (x6), см	5,36± 1,58	6,74± 1,58	7,27± 1,76	6,16± 1,97	4,56± 1,32
	ширина доли первого порядка (x7), см	0,74± 0,25	1,26± 0,33	1,18± 0,30	1,03± 0,27	0,57± 0,20
	длина доли второго порядка (x8), см	0,43± 0,27	0,63± 0,16	0,60± 0,16	0,81± 1,25	0,28± 0,10
	ширина доли второго порядка (x9), см	0,24± 0,08	0,22± 0,07	0,27± 0,09	0,19± 0,06	0,12± 0,04
	расстояние между долями (x10), см	0,31± 0,16	0,26± 0,08	0,29± 0,05	0,23± 0,07	0,14± 0,11
	отношение длины листа срединной формации к ширине (x21)	7,83± 2,75	5,51± 1,27	6,36± 1,70	6,22± 1,97	8,55± 2,73
Лист верховой формации	длина доли первого порядка (x11), см	3,29± 0,99	3,63± 0,92	3,68± 1,09	2,85± 0,82	2,07± 0,52
	ширина доли первого порядка (x12), см	0,68± 0,22	0,79± 0,27	0,87± 0,28	0,66± 0,23	0,37± 0,16
	длина доли второго порядка (x13), см	0,34± 0,10	0,39± 0,11	0,43± 0,16	0,34± 0,12	0,18± 0,08
	ширина доли второго порядка (x14), см	0,19± 0,05	0,17± 0,03	0,22± 0,04	0,15± 0,05	0,10± 0,04
	расстояние между долями (x15), см	0,22± 0,06	0,19± 0,04	0,25± 0,04	0,15± 0,06	0,09± 0,03
Генеративные признаки	количество соцветий (x16), шт	98,33± 34,63	92,33± 20,99	92,20± 33,65	89,70± 25,93	66,36± 23,86
	диаметр корзинки (x17), см	0,43± 0,05	0,28± 0,04	0,28± 0,03	0,26± 0,04	0,26± 0,04
	количество трубчатых цветков (x18), шт	16,93± 2,27	13,96± 2,20	14,30± 2,20	14,30± 2,20	16,93± 2,27
	длина трубчатых цветков (x19), см	0,38± 0,02	0,33± 0,01	0,33± 0,02	0,33± 0,02	0,38± 0,02
	длина язычковых цветков (x20), шт	0,45± 0,03	0,42± 0,02	0,43± 0,02	0,43± 0,02	0,45± 0,03

Федеральное государственное автономное образовательное
Учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


И.Е. Ямских
подпись Инициалы, фамилия

« 25 » июля 20 21 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Морфолого-генетический анализ популяций видов рода *Achillea* L.
(Asteraceae) в Южной Сибири

Направление подготовки 04.06.01 – Биология

Профиль 06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный

руководитель:


подпись, дата

профессор, д.б.н.
должность

Ямских И.Е.
фамилия, инициалы

Студент:


подпись, дата

ББ19-06М
номер группы

Стоянова Э.Е..
фамилия, инициалы

Красноярск 2021