

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
Кафедра геномики и биоинформатики

Генетический полиморфизм популяций и филогения видов родства *Polygonum
aviculare* (Polygonaceae)

Руководитель

И. Е. Ямских

подпись, дата

инициалы, фамилия

Студент ББ20-06М

Р. Т. Садыков

номер группы

подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Видовое разнообразие рода <i>Polygonum</i> и проблемы систематики	5
1.2 Морфолого-генетические исследования представителей рода <i>Polygonum</i>	7
1.3 Лекарственное значение видов р. <i>Polygonum</i>	10
1.4 ISSR-PCR метод генетического анализа популяций	12
1.5 Молекулярные маркеры растений.....	14
ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	19
2.1 Характеристика района исследования	19
2.2. Объекты исследований	22
2.3 Методика исследований	24
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	28
3.1. Анализ генетического полиморфизма популяций горцев с использованием ISSR-маркеров	Ошибка! Закладка не определена.
3.2. Оценка генетической дифференциации популяций близкородственных видов р. <i>Polygonum</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.3. Филогенетический анализ спорышей с использованием молекулярных маркеров	Ошибка! Закладка не определена.
3. 4. Обсуждение результатов	Ошибка! Закладка не определена.
Выводы	28
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	30

ВВЕДЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации видов растений, в том числе и редких, лекарственных, имеющих важное биосферное значение, является одной из важнейших задач популяционной биологии. Только на основании точных сведений о генетической структуре популяций растений, уровне их генетической изменчивости и характере ее распределения в пределах ареалов видов может быть оценен генетический потенциал видов и разработан для каждого из них комплекс мероприятий, направленных на максимальное сохранение генетического разнообразия в процессе их использования и воспроизводства.

Виды рода *Polygonum* – широко распространенные растения (Ворошилов, 1954). Благодаря особенностям биологии – самоопылению, межвидовой гибридизации, фенологической и экологической пластичности - этот род достиг чрезвычайного полиморфизма и статуса сложной в таксономическом отношении группы (Юрцева, 2006). Трудностям в определении способствует и присущая роду *Polygonum* гетерокарпия, проявляющаяся в формировании разнотипных плодов (Тупицына, 2012).

Обитание в непосредственной близости от человека долгое время не стимулировало необходимого подхода к диагностике видов рода, которая в настоящее время, хотя и выполняется с привлечением молекулярных методов исследования, для достоверного определения нуждается в комплексе морфологических диагностических признаков, трудно выявляемых, учитывая мелкие размеры растений (Цвелев, 1996).

Виды рода *Polygonum* – одни из ценнейших лекарственных и пищевых растений. Эти растения производят целый ряд химических компонентов, обладающих различными фармакологическими эффектами:

противоопухолевым, антимикробным, противоокислительным, анальгетическим и др. (Bing-Bing Shen, 2018).

Изучение экологии, морфологической и генетической изменчивости может позволить получить сведения о популяционных характеристиках в различных местообитаниях, изменениях его ареала, эколого-биологических особенностях этого рода.

Цель работы: Изучение генетического полиморфизма популяций и филогении видов родства *Polygonum aviculare* (Polygonaceae)

Задачи:

1. Провести анализ генетической изменчивости популяций видов р. *Polygonum*.
2. Оценить степень дивергенции близкородственных видов рода *Polygonum* с использованием ISSR-маркеров.
3. Изучить филогенетическое сходство видов р. *Polygonum* с помощью хлоропластных маркеров.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Видовое разнообразие рода *Polygonum* и проблемы систематики

Семейство *Polygonaceae* Juss. включает 30–35 родов и около 1000 видов, обитающих почти по всему Земному шару, но преимущественно в северных умеренных областях. Его представители широко распространены на территории южной части Красноярского края и являются компонентами разных растительных сообществ, некоторые постоянно сопутствуют человеку. Чаще всего это однолетние или многолетние травы, реже – кустарники, деревья или лианы (Тупицына, 2011).

Характерная черта семейства – наличие сросшихся прилистников – раструбов. Мелкие цветки гречишных в верхушечных соцветиях обычно обоеполые, имеют трехчленный, реже двух- или пятичленный план строения. Простой околоцветник состоит из 3-6 зеленых, белых или красных долей, остающихся и часто видоизменяющихся при плодах. Тычинки в числе 6-9 расположены в 2 круга, причем во внутреннем круге они часто исчезают, а в наружном их число удваивается. Оболочка пыльцевых зерен обычно трехбороздно-поровая. Гинецей обычно из 3, реже из 2-4 плодолистиков со свободными или более или менее сросшимися столбиками. Завязь верхняя, одногнездная, с одним ортотропным базальным семязачатком, сидящем на более или менее ясно выраженной ножке, соответствующей редуцированной центральной колонке. Такой тип строения завязи является отличительной чертой семейства. Плод ореховидный с числом граней, соответствующим числу плодолистиков. Семена с согнутым или прямым зародышем, окруженным обильным эндоспермом (Жизнь растений, 1980).

Трудности определения объема и границ видов спорышей и их идентификации связаны с разными причинами. Одна из них – высокая

фенотипическая пластичность признаков, зависящая от различий в условиях питания, увлажнения и степени вытаптывания. Следующая причина – разнообразие эколого-климатических условий в пределах обширных ареалов видов, которые привели к формированию многочисленных рас, обладающих морфологическим своеобразием. И наконец, еще одной причиной, затрудняющей идентификацию спорышей, является межвидовая гибридизация. Многие представители рода *Polygonum* обладают мелкими, но стойкими отличиями в строении цветков и плодов, которые сохраняются в культуре и передаются из поколения в поколение (Ворошилов, 1954), что дает основание считать их самостоятельными видами. Но иногда при совместном произрастании различия между видами стираются, и можно встретить в популяциях, в которых присутствуют растения с промежуточными значениями или мозаичной комбинацией признаков (Юрцева, 2003).

Род *Polygonum* представлен несколькими секциями. Их объединяет глубокое сходство в строении побеговых систем, соцветий, листьев, цветков, плодов, единый палинотип *Avicularia*. Группа среднеазиатских видов, сформировавших отдельную кладу, морфологически и генетически гетерогенна и нуждается в дальнейшем изучении. В роде *Polygonum* выделены 4 секции: *Polygonum*, *Pseudomollia*, *Tephis* и *Duravia*.

Секция *Polygonum* включает в себя около 50 видов однолетних и многолетних трав, редко полукустарничков с тонкими двулопастными или двураздельными раструбами, пятираздельным околоцветником и 8 тычинками, распространенных в умеренных областях Северного полушария. Исследуемые нами виды относятся к данной секции.

Секция *Pseudomollia*, описанная на основе *P. molliiforme* Boiss. из Северного Ирана, включает в себя также эндемик Памиро-Алая *P. bornmuelleri* Litv. Оба вида отличаются нитевидными стеблями с пазушными укороченными побегами и белыми яйцевидными цельными или щетинисто-разорванными

раструбами, одиночными пятичленными цветками и сплюснутыми блестящими орешками.

Секция *Tephis* Meisn. включает в себя 2 кустарничковых вида из Африки. Типовой вид *P. undulatum* (L.) Berg. имеет тетрамерный околоцветник и димерный гинецей.

Секция *Duravia* S. Watson, эндемичная для Северной Америки, насчитывает 20 видов. Типовой вид *P. californicum* Meisn. имеет пленчатый околоплодник, одиночные цветки в пазухах, листья без сочленения (Юрцева, 2010).

1.2 Морфолого-генетические исследования представителей рода

Polygonum

Семейство *Polygonaceae* во флоре южной части Красноярского края, включает 54 вида, относящихся к 13 родам и 4 трибам из подсемейства *Polygonoideae* (Тупицына, 2012). Изученные нами виды относятся к трибе *Polygoneae*.

P. arenastrum Voreau. - спорыш обыкновенный. Однолетнее растение до 40 см высотой, стебель у основания ветвистый, с восходящими или лежащими ветвями. Листовые пластинки более менее одинаковые по размеру, эллиптические, продолговатые, обратноланцетные 0,8-3,0 см длиной и 0,4-2,0 см шириной, тупые, снизу с хорошо заметными боковыми жилками. Раструбы в основании буроватые, вверху серебристые, расколотые. Пучки цветков в пазухах обычных листьев. Околоцветник при плодах 2,4-3 мм длиной, с белыми краями долей, рассечен на 1/2 своей длины. Плод 2,2-2,6 мм длиной, матовый, продольно-морщинистый, с одной из граней более узкой, обычно выступает из околоцветника. Произрастает у дорог, в населенных пунктах (Тупицына, 1992).

P. aviculare Lindm. – спорыш птичий. Однолетнее, гладкое с распластанным по почве или прямостоячим, часто ветвистым от основания стеблем, 10-60 см длиной. Раструбы гладкие, пленчатые, с 6-8 жилками,

расколотые вначале на две, а затем на несколько узких и длинных долей. Листья от эллиптической до линейно-ланцетовидной формы, туповатые или короткозаостренные, при основании сужены в пазухах листьев по 2-5. Околоцветник глубоко до 2/3 5-рассеченный, в нижней части зеленый, в верхней – белый или розовый, 2-3 мм длиной. Тычинок 8, с сильно расширенными при основании нитями; пестик с 3-гранной завязью и 3 короткими столбиками. Орешки 3-гранные, с яйцевидными, заостренными, очень мелкозернистыми и тускловатыми плоскостями около 2,5 мм длиной. Встречается у дорог, в населенных пунктах, по берегам водоемов (Комаров, 1936).

P. calcatum Lindm. – спорыш вытаптываемый. Стебель у основания ветвистый, с многочисленными восходящими или лежащими ветвями. Листовые пластинки одинаковые по размеру, эллиптические, тупые. Длина околоцветника 2-2,2 мм. Произрастает по обочинам дорог, окраинам полей, пустырям, у жилищ (Тупицына, 1992).

P. caspicum Kom. – спорыш каспийский. Ветвистое растение 40-60 см длиной, междоузлия открытые 5-25 мм длиной, раструбы широкие, бледнобурые, гребенчато-разорванные; листья продолговатые около 5 мм длиной, снизу с сильно выдающимися перистыми жилками, слегка кожистые, иногда с загнутыми вниз краями, сверху продольно морщинистые. Цветки одиночные или парные, на очень коротких ножках, равные по длине раструбу и вдвое короче листьев, зеленые, узкие, с долями, которые немногим длиннее трубочки и несут розовые оторочки; плоды трехгранные, темно-бурые с мелко бугорчатыми гранями около 2 мм длиной и 1-1.5 мм шириной. Произрастает у дорог, в населенных пунктах, на прибрежных песках и галечниках (Комаров, 1936).

P. sabulosum Worosch. – спорыш песковый. Однолетнее растение до 20 см высотой, стебель у основания ветвистый с лежащими или восходящими ветвями. Листовые пластинки оттопырены от стебля, более-менее одинаковые по размеру, ланцетно-линейные, 0.5-1.8 см длиной и 0.2-0.3 см шириной, острые снизу с

хорошо заметными боковыми жилками. Раструбы короткие, вверху серебристые, заостренные, в основании бурые. Пучки цветков в пазухах обычных листьев. Околоцветник при плодах 1.8-2.2 мм длиной, с белыми или розовыми краями долей, рассечен на $\frac{1}{2}$ своей длины. Плод 1.6-2.0 мм длиной, слабо блестящий, мелкоточечный, с одной из граней более узкой, обычно выступает из околоцветника. Встречается у дорог на выгонах (Тупицына, 1992).

В 2006 году в «Ботаническом журнале» была опубликована статья О. В. Юрцевой «Морфологическая изменчивость и генетический полиморфизм видов рода *Polygonum aviculare* (Polygonaceae)» с результатами морфолого-генетического анализа видов рода *Polygonum* (Юрцева, 2006). Изучение морфологической изменчивости *P. aviculare*, *P. arenastrum* и *P. calcatum* методами одномерного и многомерного анализов показало достаточно хорошую обособленность всех 3 таксонов при промежуточном положении образцов *P. aviculare*. Это дало основание предполагать, что *P. arenastrum* возник в результате гибридизации *P. aviculare* и *P. calcatum*.

Предположение о гибридной природе *P. arenastrum* основано на следующих соображениях. Ареалы этих 3 таксонов практически совпадают — они распространены в полярных и умеренных областях северного полушария. Нередко на небольшой территории в несколько десятков—сотен квадратных метров можно встретить образцы всех таксонов, причем крайние формы связаны переходными, уклоняющимися по разным признакам в сторону то одной, то другой формы. Таксоны обладают довольно сходной экологией, произрастая по нарушенным местам и по газонам, вдоль шоссе и грунтовых дорог. Однако некоторые различия в эколого-ценотической приуроченности прослеживаются даже при нахождении на небольшой территории в городских условиях. Так, *P. aviculare* обычно можно встретить на не вытаптываемом, разреженном газоне, *P. calcatum* — в расщелинах асфальта или между плитами, *P. arenastrum* — на нарушенном вытаптываемом газоне, вдоль тропинок. (Юрцева, 2006).

Для *P. aviculare* характерны следующие признаки: вертикальные или восходящие главные побеги, выраженная гетерофилия, локализация частных соцветий на концах побегов, свободные доли околоцветника составляют $2/3$ — $3/4$ его общей длины, 8 тычинок; почти правильно-3-гранные плоды с полосатобородавчатой поверхностью и немного выступающей из околоцветника верхушкой. Для *P. calcatum* характерно множество отходящих от основания распростертых побегов, гомофилия, свободные доли околоцветника составляют $1/2$ общей длины, 5 тычинок, неравно-3-гранные или почти 2-гранные плоды с гладкой поверхностью, полностью скрытые околоцветником. *P. arenastrum* отличается наибольшей изменчивостью признаков. По общим размерам и параметрам листьев этот вид занимает промежуточное положение между *P. aviculare* и *P. calcatum* (Юрцева, 2003).

Результаты одномерного и многомерного анализов морфологических признаков и фрагментов ДНК, полученных методом RAPD, показали достоверность различий *P. aviculare* и *P. calcatum*. Виды различаются по средним значениям таких признаков, как длина главного побега, длина и ширина листа, длина околоцветника и его долей, длина и ширина плода, длина выступающей верхушки плода и число тычинок. Изучение морфологической изменчивости *P. arenastrum* свидетельствует о его промежуточном положении между *P. aviculare* и *P. calcatum*. По результатам RAPD-анализа *P. arenastrum* имеет фрагменты, общие для него и каждого из перечисленных видов.

Сравнение результатов анализа морфологических признаков и молекулярных данных свидетельствует об определенной независимости признаков фенотипа и генотипа (Юрцева, 2006).

1.3 Лекарственное значение видов р. *Polygonum*

Виды секции *Polygonum* являются ценными лекарственными растениями международного рынка. В аптеках Германии продаются как *Wiedemannscher Tee* или *Nomeriana Tee* и содержит 2-2,5% сахара, следы эфирного масла, танноиды,

смолу и воск. В Австрии высушенная трава *P. aviculare* с цветами продается в аптеках как Herbarpolygoni (Herbacentumnodii, H. sanguinariae, H. sanguinalis и Blutkraut), лекарственное ее действие приписывается танноидам.

В научной медицине настой травы горца птичьего применяется внутрь в качестве средства, способствующего отхождению конкрементов при мочекаменной болезни. Употребляется при воспалении слизистой оболочки желудка и кишечника, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, при заболеваниях печени, в комплексном лечении туберкулеза, малярии, при маточных и геморроидальных кровотечениях, наружно - при различных кожных заболеваниях, а также для лечения ран, язв и ушибов. Трава входит в состав сбора для приготовления микстуры по прописи М.Н. Здренко, применяемой в качестве симптоматического средства при злокачественных опухолях (Лекарственные растения, 1991).

В работе Bing-Bing Shen с соавторами (2018) показано, что полидатын, выделенный из *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc и *P. aviculare* L., проявляет положительный эффект против ожирения у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, и положительно влияет на липидные профили у гиперлипидемических кроликов. Кроме того, это соединение оказывает ингибирующее действие на вирус Коксаки В4, положительно действует на заживление ран у крыс, является ингибитором фермента бактериальной ДНК-праймазы (Bing-Bing, 2018).

Hediat с соавторами (2010) изучали фитохимические составляющие, присутствующие в растительном экстракте *P. aviculare*. В состав экстракта входили: дубильные вещества, сапонины, алкалоиды, флавоноиды и сесквитерпены. Наибольшую активность продемонстрировали хлороформные экстракты стебля против *Proteus mirabilis* (вызывает заболевания мочеполовой системы), а наименьшую эффективность - ацетоновые экстракты против *Staphylococcus aureus* (диапазон заболеваний простирается от кожных, мягких тканей, респираторных, костных, суставных и эндоваскулярных до раневых

инфекций). Экстракты листьев проявляют более низкую активность по сравнению с экстрактами стеблей. Хлороформные экстракты обладают очень хорошей антимикробной активностью в отношении всех исследуемых в работе бактерий и хорошей активностью в отношении всех протестированных грибов, за исключением *Candida albicans* (вызывает кандидоз). Результаты влияния температуры и pH на антимикробную активность хлороформных экстрактов показали, что различные температурные диапазоны 4, 30, 60 и 100°C не влияют на антимикробную активность. Активность слегка повышается при кислотном pH. При щелочном pH активность растительных экстрактов снижалась (Hediat, 2010).

Park с соавторами (2018) проводили гистологический анализ тканей головного мозга и печени мышей, чтобы оценить влияние экстракта *P. aviculare*. У мышей, испытывавших стресс, боковые желудочки мозга меньше, чем у нормальных мышей, но обработка мышей экстрактом *P. aviculare* ослабила эффект стресса, так что боковые желудочки мозга были сопоставимы с мышами без стресса. Окрашивание срезов печени у мышей, подвергшихся стрессовой нагрузке, показало чрезмерное воспаление, коллапс гомеостаза и повреждение печени, но лечение экстрактом уменьшило эту патологию. У мышей, испытывавших стресс, также были более высокие концентрации сывороточного ALT и AST, которые являются прототипами маркеров повреждения печени, однако лечение экстрактом *P. aviculare* значительно снижало уровни ALT и AST. Таким образом, лечение экстрактом ослабило повреждения тканей головного мозга и печени, которые были вызваны стрессом (Park, 2018).

Горец птичий является кормовым растением. Из корней делают синюю краску (Комаров, 1936).

1.4 ISSR-PCR метод генетического анализа популяций

В последние десятилетия в связи с введением в генетику растений молекулярных методов исследования появилось представление о молекулярно-

генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у растений. Были составлены хромосомные карты наиболее важных сельскохозяйственных культур с нанесенными на них молекулярными маркерами и генами. Произошло внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования, возникло понятие молекулярной паспортизации сортов. Молекулярные методы позволили существенно расширить фундаментальные исследования в области генетики и эволюции растений (Хлесткина, 2011).

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-четырех произвольных нуклеотидов («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.

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.

В геномах растений 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. Но 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 выявления генетического полиморфизма растительного материала, 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 (Кутлунина, 2017).

1.5 Молекулярные маркеры растений

Для универсализации подходов к видоидентификации живых организмов существуют молекулярно-генетические методы, использующие маркеры, которые представляют из себя короткие стандартные последовательности ДНК.

При выборе оптимального маркера, необходимо удовлетворять следующим качествам:

1. Универсальность: последовательность должна прослеживаться в максимальном количестве растительных таксонов. Это условие необходимо в связи с подбором универсальных праймеров для амплификации фрагмента.

2. Качество сиквенса и степень перекрывания: пригодность локусов для получения перекрывающихся сиквенсов с прямого и обратного праймеров с минимализацией неоднозначностей прочтения нуклеотидов.

3. Способность различать виды: возможность разделить как можно больше видов. Внутривидовой полиморфизм должен быть ниже межвидового, а формы, относящиеся к одному виду кластеризуются отдельно от форм других видов.

Применительно к растениям в настоящее время используются множество различных районов ДНК в качестве маркеров, как ядерные, так и пластидные последовательности.

Ген *matK* хлоропласта имеет длину 1500 п.н., расположен внутри интрона *trnK*, и кодирует белок матуразу К, который участвует в сплайсинге интронов группы II. Ген содержит высокий уровень полиморфизма внутри вида и становится потенциальным кандидатом для изучения систематики и эволюции растений (Chase, 2003).

По данным CBOL Plant Working Group, показатель «универсальности» этого маркера для покрытосеменных растений составляет около 90%, для голосеменных - 83%, и около 10% для споровых растений (Group C.P.W. et al. 2009).

RbcL - ген большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы - наиболее подробно охарактеризованный хлоропластный ген растений. Этот кодирующий участок обладает универсальностью и простотой в амплификации и анализе (Newmaster, 2006). Ген *rbcL* имеет много параметров для филогенетического изучения, поскольку его полная длина составляет примерно

1400 п.н. (Group C.P.W. et al. 2009). Эта последовательность имеет низкий уровень мутаций по сравнению с другими маркерами в хлДНК, поскольку консервативен и имеет высокий уровень сходства между видами (Kellogg, 1997). Тем не менее, в сочетании с другими маркерами является хорошим кандидатом для идентификации видов.

Хлоропластный участок *trnL-trnF* представляет собой переменный фрагмент между генами транспортных РНК лейцина и фенилаланина, включая интрон гена *trnL* (Taberlet et al., 1991). Праймеры, разработанные Taberlet et al. (1991) для амплификации интрона *trnL*, как было показано амплифицируют интрон-мишень у многих покрытосеменных и голосеменных растений.

Межгенный спейсер *trnL-trnF* и интрон *trnL* может использоваться как при внутри- и межвидовых дифференциациях, так и при изучении подсемейственных уровней (Mes et al., 2000). Например, при использовании маркера *trnL-trnF* на видовом уровне выявляются филогенетически значимые делеции (Mes et al. 1994).

Стоит отметить, что эффективность хлоропластного маркера для исследования может зависеть от цели работы и таксономической группы растений. Для повышения разрешающей способности метода многие исследователи рекомендуют комбинировать нескольких маркеров в одном исследовании. Вместе с тем, у хлоропластных маркеров есть общие недостатки:

1. Наследование по материнскому типу недостаточно полно отражает историю вида, особенно, если в ходе его становления имела место межвидовая гибридизация.
2. Затруднённая интерпретация результатов из-за обмена генетического материала между органеллами и ядром.
3. Возможны ошибки при построении филогении в ходе горизонтального переноса хлоропластных генов между видами.

Помимо хлоропластных маркеров, в настоящее время для филогенетических исследований довольно популярно использование

внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов (internal transcribed spacer). Мотив ITS локализуется между структурными генами рибосомальной РНК 18S, 5,8S и 26S.

Маркеры ITS обладают рядом преимуществ перед митохондриальными и хлоропластными маркерами:

1. Универсальность. ITS локализованы в пределах рибосомального кластера в ядерном геноме и присутствуют у всех групп живых организмов.

2. Вариабельность. Последовательности ITS позволяют легко отличать близкородственные организмы. Высокая степень варьирования обусловлена тем, что данные последовательности являются некодирующими, следовательно, могли не подвергаться давлению отбора.

3. Наличие границ. Внутренние транскрибируемые спейсеры фланкированы консервативными участками (генами 18S и 26S рРНК). Это позволяет использовать универсальные праймеры для обнаружения данных мотивов у отдаленных групп организмов (Baldwin et al., 1995).

4. Высокая копияность. Последовательности ITS высоко копияны — до 30000 копий на клетку, и организованы тандемно в виде повторов. Это даёт преимущество для проведения анализа при крайне малых количествах исходного материала, а также на гербарном, палеонтологическом или сильно деградировавшем материале.

5. Длина последовательности. Протяжённость анализируемого участка (ITS1-5.8S-ITS2) удобна для ПЦР-анализа и секвенирования. У покрытосеменных протяженность составляет 500–700 п. н. (Baldwin et al., 1995).

6. Наследование по двум родителям. Это свойство может позволить точнее идентифицировать происхождение видов, особенно при гибридизации.

Помимо перечисленных преимуществ перед хлоропластными маркерами, ядерные обладают также собственными недостатками:

1. Независимость генов. Поскольку копии генов могут быть расположены на разных хромосомах, они могут иметь разную скорость

эволюции независимо друг от друга. Это может приводить к накоплению внутривидового полиморфизма (Burckler et al., 1997; Alvarez et al., 2003, Rapini et al., 2006).

2. Гомоплазия. Последовательности ITS могут быть недостаточно информативными для построения филогенетических деревьев, поскольку характеризуются более высоким уровнем гомоплазии (Шнеер, 2009; Alvarez et al., 2003; Cronn et al., 2002).

В филогенетических исследованиях растений целесообразно комбинировать ядерные и хлоропластные маркеры и строить консенсусные филогенетические деревья.

ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика района исследования

Работа проводилась в различных районах города Красноярска: Железнодорожном (ул. Дорожная, д. 6Б, ул. Куйбышева, д. 32), Октябрьском (ул. Академгородок, д. 25), Центральном (ул. Красной Армии, д. 15, ул. Красной Армии, д. 20).

Город Красноярск расположен в лесостепной зоне. Красноярская лесостепь представляет собой островной участок, находящийся на стыке Восточного Саяна, Западной Сибири и Средне-Сибирского плоскогорья. Общая площадь лесостепи - около 400 тыс. км². Северные и центральные участки лесостепи имеют абсолютные высоты около 400 м, а относительные – 140-150 м. В районе южных и западных участков высоты колеблются в пределах 300-350 м, а относительные превышения – 200 м (Буторина, 1979).

Климатические особенности Красноярска и пригородной зоны определяются его положением в зоне умеренного климата с хорошо выраженной континентальностью. Это объясняется расположением почти в центре Азиатского материка и удаленностью от водных поверхностей. Поэтому данная территория летом сильнее нагревается, а зимой – охлаждается. Наблюдаются значительные годовые колебания температур (до 38 °С), относительно небольшое количество осадков и низкая влажность воздуха.

В течение всего года в Красноярске преобладают циклоны, приходящие с юго-запада (63%). Циклоны этого направления в теплый период года составляют 72%, в холодный период – 57 % (Авдеева, 2007).

Самым холодным месяцем является январь, в это время в горных районах теплее (-17° С). Самым жарким месяцем является июль. В горных районах температура июля на 2-3 °С ниже, чем в степной части (Швер, 1982).

В горной тайге абсолютный максимум температуры составляет 36 °С, а в городе Красноярске – 41 °С. На минимальные значения температуры воздуха в условиях антициклональной погоды также оказывает влияние рельеф местности. Более низкие температуры в пониженных местах, куда стекает холодный воздух с повышенных элементов рельефа. Кроме естественных процессов, большое влияние на климат города оказывают антропогенные факторы, обуславливая микроклиматические различия внутри самого города.

Основными типами почв являются выщелоченные и обыкновенные черноземы, серые лесные и дерново-подзолистые почвы.

Гидрографическая сеть г. Красноярска представлена рекой Енисей и ее главными притоками – р. Базаиха, Кача и Березовка (Рябовол, 2012).

Анализ климатических ресурсов в сочетании с ландшафтными особенностями территории показал, что общая климатическая характеристика района исследований относится к зоне умеренного термического пояса и обладает значительным биологическим потенциалом. При этом она достаточно неоднородна и по показателям обеспеченности территории теплом, влагой и условиям перезимовки ее можно дифференцировать ряд ландшафтно-климатических подрайонов:

1. Средне- и низкогорные ландшафты темно- и светлохвойной тайги и подтайги, охватывающие западные и южные склоны Восточного Саяна, Торгашинского хребта правобережной и частично западной части левобережной части города и его зеленой зоны, испытывают избыточное увлажнение территории. Абсолютные значения минимальных зимних температур опускаются ниже предела зимостойкости весьма морозостойких растений. Степень суровости зимы для растительности по сочетанию температуры и снежного покрова в горно-таежных районах определяется как несуровая и суровая - в подтаежных.

2. Ландшафт лесостепной предгорной равнины, представляющий собой холмистый рельеф водоразделов и равнинный рельеф верхних террас Енисея, расположен в северо-западной части пригородной зоны города. Характеризуется достаточным увлажнением. Вегетационный период данной территории обладает достаточными биологическими ресурсами. Условия перезимовки растений снижаются за счет самой низкой высоты снегового покрова в данном подрайоне и отличаются самым высоким коэффициентом, характеризующим зимние условия, как суровые.

3. Ландшафт степи – расположен в долине Енисея на крутых склонах рек Качи и Бугача, на склонах возвышенностей южной экспозиции, северной части пригородной зоны города. По степени увлажнения подрайон относится к слабо засушливой территории, при этом выпадающие осадки меньше испаряемости. Зимние условия местности находятся на грани между несуровыми и суровыми, в зависимости от сочетания снежных и температурных ресурсов (Панов, 2019).

Флора сосудистых растений г. Красноярска включает 1005 видов, принадлежащих к 412 родам и 103 семействам. Характер естественной растительности в черте города обусловлен положением между лесостепной и горнотаёжной природными зонами и антропогенным воздействием.

Урбанофлора г. Красноярска сформирована элементами бореальных степных и лесных флор Евразии. Ведущее положение во флоре г. Красноярска гемикриптофитов и криптофитов отражает влияние общеклиматических условий умеренной зоны Северного полушария и средообразующих параметров города. Преобладание во флоре города урбанобных видов над урбанофильными в составе аборигенного компонента свидетельствует о хорошей сохранности природного ядра флоры, подчеркивает уязвимость урбанофлоры г. Красноярска (Рябовол, 2007).

2.2. Объекты исследований

Объектом исследований служили популяции 5 видов р. *Polygonum*, произрастающие в различных районах г. Красноярска (табл. 1). Определение видов производилось профессором кафедры биологии, химии и экологии КГПУ им. В.П. Астафьева, доктором биологических наук Тупицыной Н.Н.

Пробная площадь №1 закладывалась вдоль дороги на ул. Красной Армии, д. 15. Общее проективное покрытие составляет 90%. Наибольшее проективное покрытие имеют *Polygonum arenastrum* (80%), *Elytigia repens* (10%) и *Plantago major* (10%). На данном участке изучалась популяция *P. arenastrum* (PAR1).

Пробная площадь №2 закладывалась вдоль дороги на ул. Горького, д. 14. Общее проективное покрытие составляет 65%. Доминируют: *Polygonum arenastrum* (50%), *Elytigia repens* (10%) и *Plantago major* (5%). На данном участке изучалась популяция *P. arenastrum* (PAR2).

Пробная площадь №3 была заложена вдоль тропинки в Академгородке напротив дома 25. Проективное покрытие – 60%. Доминирующие виды: *Polygonum aviculare* (45%), *Plantago major* (10%), *Matricaria matricarioides* (5%). На данном участке изучалась популяция *P. aviculare* (PA1).

Пробная площадка №4 закладывалась на территории гаражно-строительного кооператива, который расположен на ул. Дорожная, д. 6Б. Общее проективное покрытие - 50%. Доминируют: *Polygonum calcatum* (20%), *Polygonum sabulosum* (20%) и *Elytigia repens* (10%). На данном участке изучалась популяции *P. calcatum* (PC1) и *P. sabulosum* (PS1).

Пробная площадь №5 была заложена вдоль дороги на ул. Декабристов, д. 36. Проективное покрытие – 70%. Здесь доминируют *Elytigia repens* (50%), *Matricaria matricarioides* (15%) и *Polygonum caspicum* (5%). На данном участке изучалась популяция *P. caspicum* (PCS1).

Пробная площадь №6 была заложена на территории гаражно-строительного кооператива, который расположен на ул. Куйбышева, д. 85. Проективное покрытие – 80%. В нем доминируют *Elytigia repens* (50%), *Polygonum caspicum* (15%), *Matricaria matricarioides* (10%) и *Plantago major* (5%). На данном участке изучалась популяция *P. caspicum* (PCS2).

Таким образом, в результате описания 6 пробных площадей можно сделать вывод, что виды рода *Polygonum* обитают в нарушенных местообитаниях: во дворах, на тропинках, вдоль дорог. Данные места имеют низкое видовое разнообразие, это объясняется антропогенным воздействием на сообщества, в результате которого происходит сокращение пространств, занятых естественной растительностью. Четких различий местообитаний разных видов обнаружено не было.

Впоследствии, для филогенетического анализа было привлечено дополнительно 4 вида, среди которых был *P. evenkiense* (PE1) представленный одним образцом (табл. 1).

Таблица 1. Исследуемые виды р. *Polygonum*.

Название популяции	Место сбора (адрес)	Название вида	Количество образцов
PAR1	Ул. Красной армии, д. 15 (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum arenastrum</i>	10
PAR2	Ул. Красной армии, д. 15 (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum arenastrum</i>	10
PA1	Ул. Академгородок, д. 25 (Октябрьский р-он)	<i>Polygonum aviculare</i>	10
PC1	Ул. Дорожная, д. 6Б (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum calcatum</i>	10

PS1	Ул. Дорожная, д. 6Б (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum sabulosum</i>	10
PE1	Эвенк. р-н, р. Чуня, устье Ероба	<i>Polygonum evenkiense</i>	1
PCS1	Ул. Декабристов, д. 36 (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum caspicum</i>	1
PCS2	Ул. Куйбышева, д. 85 (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum caspicum</i>	8
PB1	Ул. Академгородок, д. 25 (Октябрьский р-он)	<i>Polygonum boreale</i>	3
PN1	Ул. Куйбышева, д. 85 (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum neglectum</i>	3
PN2	Ул. Академгородок, д. 25 (Октябрьский р-он)	<i>Polygonum neglectum</i>	3
PR1	Ул. Куйбышева, д. 85 (Железнодорожный р-он)	<i>Polygonum rectum</i>	3

2.3 Методика исследований

Исследования проводились в лаборатории молекулярно-генетических методов и биотехнологии СФУ. Выделение ДНК производили из 10 мг сухой растительной ткани с помощью набора Diamond DNA™ (Барнаул).

Протокол выделения ДНК из растений с помощью Diamond DNA™:

1. 5-10 мг сухого растительного материала пометить в ступку, измельчить с помощью пестика, добавить 500 мкл лизис-буфера, перемешать, поместить в 1,5 мл пробирку. Добавить 10 мкл раствора протеиназы.
2. Термостатировать при +56 °С в течение 45 мин.
3. Лизат центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин.
4. Перенести супернатант (450 мкл) в новую пробирку.

5. Добавить 150 мкл сорбента (перед использованием сорбент встряхнуть, т.к. возможно его оседание при хранении).
6. Перевернуть пробирку 4-5 раз, чтобы перемешать лизат с сорбентом, но не встряхивать на Vortex, чтобы не повредить ДНК.
7. Центрифугировать 2 мин., супернатант перенести в новую пробирку (сорбент должен остаться на дне и выбрасывается вместе с пробиркой).
8. Добавить 150 мкл солевого буфера. 2-3 раза перевернуть пробирку.
9. Поместить в морозильную камеру (-16 -20 °С) на 5 мин.
10. Центрифугировать 7 мин при 13000 об/мин (должен выпасть осадок протеинов).
11. Супернатант перенести в новую пробирку. Добавить 250 мкл осаждающего буфера, перемешать перевертывая пробирку (не встряхивать на Vortex).
12. Центрифугировать 7 мин при 13000 об. Буфер слить.
13. Осадок промыть в 600 мкл 70% этанола.
14. Центрифугировать 1 мин при 13000 об. Спирт слить.
15. Осадок просушить (1 мин при +56 °С и 1 мин на воздухе), растворить в 75 мкл воды или TE-буфера.

Для изучения генетической изменчивости использовался ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) метод. На первом этапе исследований осуществлялся подбор праймеров, дающих воспроизводимый полиморфный результат. На втором этапе амплификация проводилась со всеми образцами.

Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, включающей: 10 мкл готовой PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 6 мкл воды, 2 мкл ДНК и 2 мкл праймера. Программа амплификации: 95°С (5 мин) – денатурация белка для активации полимеразы; 13 циклов: 95°С (20 с) – денатурация ДНК, 55°С (45 с, понижение температуры на 0,7 °С в каждом последующем цикле) –

присоединение праймера, 72°C (90 с) – элонгация цепи; 25 циклов: 95°C (20 с) – денатурация ДНК, 44°C (30 с) – присоединение праймера, 72°C (90 с) – элонгация цепи; 72°C (7 мин) – достройка всех цепей.

Разделение продуктов амплификации производилось в 1,8% агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере Bio-RadSub-cell GT при 90V на 3 часа. Гель окрашивали раствором бромистого этидия и фотографировали в проходящем УФ– излучении.

С помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software на фотографии электрофорезного геля для каждого образца отмечалось наличие или отсутствие фрагментов ДНК одной длины. Для генетического анализа составлена бинарная матрица. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Popgene version 1.32 (расчет уровня полиморфизма (P), генного разнообразия Нея (H_e), индекса Шеннона (I_o), показателя подразделенности популяций (G_{st}). Генетические дистанции (D) между популяциями определялись по формуле М. Нея.

Дендрограмма сходства популяций строилась при помощи компьютерной программы TFPGA version 1.3 невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA – unweighted pair-group method using arithmetic average).

Для оценки генетической структуры популяций был использован байесовский подход (MCMC – Markov Chain Monte-Karlo), реализованный в программе STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al., 2000). Использовалось длительное выгорание (burn-in) – 40000 циклов и MCMC – 120000 циклов. Количество возможных кластеров (K) тестировалось от 2 до 12 в двенадцати повторностях. Максимальное количество кластеров оценивалось с помощью ΔK ($\Delta K = \text{mean}(|L'(K)|)/\text{sd}(L(K))$) (Evanno et al., 2005) вычисления которого доступны на софте STRUCTURE HarvesterWeb 0.6.94 (Earlet et al., 2012).

Далее производилось изучение филогенетического сходства видов р. *Polygonum* с помощью хлоропластных маркеров.

Программа Chromas v.2.6.6 использовалась для первичной обработки сиквенсов, после чего последовательности выравнивались в MEGA-X с помощью встроенного алгоритма MUSCLE при стандартных значениях параметра.

Для поиска модели замен, необходимой для дальнейшего построения филогенетических деревьев, использовались программы Jmodeltest-2.1.10 и Partitionfinder-2.1.1., по результатам которых были установлены оптимальные модели: для участка matK GTR+I+G, для trnL-trnF K81UF. Софт IQ-Tree-1.6.12 был использован для построения филогенетических деревьев, FigTree-1.4.3 – для визуализации полученных результатов.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с авторскими правами были изъяты 28-40 страницы.

ВЫВОДЫ

1. Уровень генетического разнообразия в популяциях спорышей варьирует от 4,17% до 35,83% и имеет максимальные показатели для *P. sabulosum* ($P = 35,83\%$; $H_e = 0,1185$; $I_o = 0,1801$). Минимальные значения генетического разнообразия зафиксированы для популяции *P. aviculare* ($P = 4,17\%$; $H_e = 0,0137$; $I_o = 0,0208$). Изученные популяции характеризуются очень высоким уровнем генетической дифференциации ($G_{st}=0,7675$) и достоверно относятся к разным видам.
2. Анализ степени генетической дифференциации популяций близкородственных видов р. *Polygonum* на данном этапе исследований показал разделение на следующие виды: *P. arenastrum*, *P. aviculare*, *P. calcatum*, *P. caspicum*. Популяция *P. sabulosum* генетически близка к виду *P. arenastrum*.
3. Филогенетический анализ с использованием trnL-trnF маркера хлоропластной ДНК показал наличие 5-нуклеотидной делеции и двух трансверсий, позволяющих разделить изучаемую группу горцев на два кластера. В последовательностях гена matK выявлено 4 замены, он является менее информативным для решения вопросов таксономии изучаемой группы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Авдеева, Е. В. Рост и индикаторная роль древесных растений в урбанизированной среде: монография / Е.В. Авдеева. // Красноярск. СибГТУ. - 2007. – 382 с.
2. Буторина, Т. Н. Биоклиматическое районирование Красноярского края / Т. Н. Буторина. – Новосибирск : Наука, 1979. – 231 с.
3. Войлокова, В. Н. Морфологическая изменчивость и генетический полиморфизм *Polygonum arenastrum* (Polygonaceae) в связи с его гибридным происхождением / В. Н. Войлокова // Матер. Междунар. науч. конф., посвящ. 200-летию Казанской ботанической школы. – 2006. – С. 18.
4. Ворошилов, В. Н. К систематике спорышей средней полосы европейской части СССР / В. Н. Ворошилов // Бюл. ГБС. - 1954. – С. 97.
5. Гринкевич, Н. И. Лекарственные растения / Н.И. Гринкевич. – Москва :Высш. шк., 1991. – 94 с.
6. Кутлунина, Н. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учебно-методическое пособие / Н. А. Кутлунина, А. А. Ермошин. – Екатеринбург : Издательство Уральского университета, 2017. – 114 с.
7. Лазарев, А. В. Обзор рода *Polygonum* L. / А. В. Лазарев, С. В. Недопекина // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2009. – Т. 9, №. 11. – С. 66.
8. Панов, А. И. Ландшафтные особенности климата ландшафтных зон Красноярска и его дендрологическая оценка / А. И. Панов, Е. В. Авдеева // сборник статей Всероссийской научно-практической конференции. - 2019. - С. 260-265.
9. Рябовол, С. В. Поясно-зональные элементы урбанофлоры г. Красноярска (средняя Сибирь, Красноярская лесостепь) / С. В. Рябовол, Е. М. Антипова // Вестник КГАУ. – 2012. – №. 3. - С. 75-77.

10. Рябовол, С. В. Флора г. Красноярска (сосудистые растения) :дис. ... канд. биол. наук : 03.00.05 / Рябовол Светлана Валерьевна. – Красноярск, 2007. 383 с.
11. Тахтаджян, А. Л. Жизнь растений: Т.5 / А.Л. Тахтаджян. – Москва :Просвещение, 1980. - 430 с.
12. Тупицына, Н. Н. Дополнение к флоре Красноярского края (*Polygonum* L., *Polygonaceae* Juss.) / Н. Н. Тупицына // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – №. 2. - С. 36-39.
13. Тупицына, Н. Н. Дополнение к флоре Сибири (*Polygonaceae* Juss.) / Н. Н. Тупицына // *Turczaninowia*, – 2011. – Т. 14, № 1. – С. 55-58.
14. Тупицына, Н. Н. Новые данные о спорышах (*Polygonum* L., *Polygonaceae*) северной части Красноярского края / Н. Н. Тупицына, М. Н. Ломоносова // Бюллетень Московского общества испытателей природы. – 2016. Т. 121. – №. 3. - С. 78-79.
15. Тупицына, Н. Н. Спорыши (*Polygonum* L., *Polygonaceae* Juss.) Бурятии / Н. Н. Тупицына, Л. В. Кривобоков // *Turczaninowia*. – 2014. – Т. 17. – №. 2. - С. 87-94.
16. Тупицына, Н. Н. Спорыши (*Polygonum* L., *Polygonaceae* Juss.) Тюменской области / Н. Н. Тупицына, Н. В. Хозяинова, И. В. Кузьмин // *Turczaninowia*. – 2013. – Т. 16. – №. 3. – С. 78-83.
17. Тупицына, Н. Н. Новые данные о спорышах (*polygonum* l., *Polygonaceae*) Эвенкии / Н. Н. Тупицына, Л. В. Кривобоков // Бюллетень Московского общества испытателей природы. – 2017. – Т. 122. – №. 6. – С. 66.
18. Тупицына, Н.Н. Ревизия семейства *Polygonaceae* Juss. во флоре южной части Красноярского края / Н. Н. Тупицына // *Turczaninowia*, – 2012. – Т.15, №2. – С. 44.
19. Флора Сибири: Т.5 / М. Н. Ломоносова [и др.]. – Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1992. – 125 с.
20. Флора СССР: Т.5 / В. Л. Комаров [и др.]. – Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1936. – 614 с.

21. Хлесткина, Е. К. Молекулярные методы анализа структурно функциональной организации генов и геномов высших растений / Е. К. Хлесткина // Вавилов. журн. генет. и селекции. - 2011. - Т. 15, № 4. - С. 757–768.
22. Цвелев, Н. Н. О видах секции *Polygonum* рода *Polygonum* L. в европейской части СССР / Н. Н. Цвелёв // Новости сист. высш. раст. - 1979. – Т. 15. – С. 128.
23. Цвелев, Н.Н. Род *Polygonum sensu lato* (*Polygonaceae*) на Кавказе / Н. Н. Цвелев // Новости сист. высш. раст. - 1989. – Т. 26. – С. 63.
24. Цвелев, Н.Н. Род спорыш – *Polygonum* L. / Н. Н. Цвелев // Флора Восточной Европы. – СПб.: Мир и семья-95. - 1996. – Т. 9. – С. 136.
25. Швер, Ц. А. Климат Красноярска / Ц. А. Швер. - Ленинград: Гидрометеоиздат, 1982. – 229 с.
26. Шнеер В. С. ДНК-штрихкодирование новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. – 2009. – Т. 45. – №. 11. – С. 1436-1448.
27. Эбель А. Л. О распространении видов *Polygonaceae* Juss. в Хакасии // Систематические заметки по материалам Гербария им. ПН Крылова Томского государственного университета. – 2004. – №. 94.
28. Юрцева, О. В. Гетерокарпия у *Polygonum aviculare* L. и близких видов (*Polygonum* subsect. *Polygonum*) / О. В. Юрцева, Н.Д. Яковлева, Т.И.
29. Иванова-Радкевич // Бюлл. МОИП. Отд. биол. – 1999. – Т. 104, №. 2. – С. 13.
30. Юрцева, О. В. Изменчивость видов подсекции *Polygonum* рода *Polygonum* (*Polygonaceae*) в связи с возможной гибридизацией / О. В. Юрцева, Т.Е. Крамина // Ботанический журнал. – 2003. – Т. 88, №. 1. – С. 9-25.
31. Юрцева, О. В. Морфологические и молекулярные данные в пользу гибридизации *Polygonum patulum* и *Polygonum arenastrum* (*Polygonaceae*) / О. В. Юрцева // Ботанический журнал. – 2007. – Т. 92, №. 9. – С. 1320-1331.
32. Юрцева, О. В. Самоопыление у видов родства *Polygonum aviculare* L. (*Polygonum* subsect. *Polygonum*) / О. В. Юрцева, В.Н. Войлокова, А.В. Троицкий, В.К. Боброва // Бюлл. МОИП. – 1998. – Т. 103, №. 5. – С. 61-67.

33. Юрцева, О.В. Морфологическая изменчивость и генетический полиморфизм видов родства *Polygonum aviculare* (Polygonaceae) / О. В Юрцева, В.Н. Войлокова, А.В. Троицкий, В.К. Боброва // Ботанический журнал. - 2006. Т. 91, № 5. - С. 697-716.
34. Álvarez I., Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference /Álvarez I., Wendel J. F.//Molecular phylogenetics and evolution. – 2003. – Vol. 29. – №. 3. – P. 417-434.
35. Baldwin B. G. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny /Baldwin B. G. et al.//Annals of the Missouri botanical garden. – 1995. – P. 247-277.
36. Bing-Bing, S. Analysisofthe Phytochemistry and Bioactivity of the Genus Polygonum of Polygonaceae / S. Bing-Bing, et al.// Digital Chinese Medicine. – 2018. – №1. - P. 19-36.
37. Buckler IV E. S. The evolution of ribosomal DNA divergent paralogues and phylogenetic implications/ Buckler IV E. S., et al.//Genetics. – 1997. – Vol. 145. – №. 3. – P. 821-832.
38. Chase M. W. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in Nicotiana (Solanaceae) / Chase M. W. et al. //Annals of Botany. – 2003. – Vol. 92. – №. 1. – P. 107-127.
39. Earl D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / Earl D. A., Von Holdt B. M. //Conservation genetics resources. – 2012. – Vol. 4. – №. 2. – P. 359-361.
40. Evanno G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / Evanno G., Regnaut S., Goudet J. //Molecular ecology. – 2005. – Vol. 14. – №. 8. – P. 2611-2620.
41. Granica, S. Quantitative and qualitative investigations of pharmacopoeial plant material Polygони Avicularisherba by uhplc-cad and uhplc-esi-ms methods / S. Granica / Phytochemical Analysis. – 2015. - Vol. 26, № 5. - P. 374-382.

42. Group C. P. W. A DNA barcode for land plants / Group C. P. W. et al. //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106. – №. 31. – P. 12794-12797.
43. Wei G. W. Growth and reproductive responses of *Polygonum hydropiper* populations to elevational difference associated with flooding / Wei G. W. et al. //Global Ecology and Conservation. – 2020. – Vol. 23. – P. e01156.
44. Hediat, M. H. Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt / M. H. Hediat, N. Marraiki // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2010. - №17. - P. 57–63.
45. Luo, X. *Polygonum Aviculare* L. extract and quercetin attenuate contraction in airway smooth muscle / X. Luo, H. Xu, Q. Zhao, Q. Wang, Y. She et al. / Scientific Reports. - 2018. - Vol. 8, № 1. - P. 3114.
46. Kellogg E. A. The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies / Kellogg E. A., Juliano N. D. //American journal of botany. – 1997. – Vol. 84. – №. 3. – P. 413-428.
47. Mes T. H. M. Hairpins involving both inverted and direct repeats are associated with homoplasious indels in non-coding chloroplast DNA of *Taraxacum* (Lactuceae: Asteraceae) / Mes T. H. M. et al. //Genome. – 2000. – Vol. 43. – №. 4. – P. 634-641.
48. Mes T. H. M. *Sedum surculosum* and *S. jaccardianum* (Crassulaceae) share a unique 70 bp deletion in the chloroplast DNA trnL (UAA)-trnF (GAA) intergenic spacer / Mes T. H. M., Hart H. //Plant Systematics and Evolution. – 1994. – Vol. 193. – №. 1. – P. 213-221.
49. Mosaferi, S. Genetic diversity and morphological variability in *Polygonum Aviculare* S. L. (Polygonaceae) of Iran / S. Mosaferi, M. Sheidai, M. Keshavarzi, Z. Noormohammad // Phytotaxa. - 2015. - Vol. 233, № 2. - P. 166-178.
50. Murray A. F. *Polygonum odoratum* essential oil inhibits the activity of mushroom derived tyrosinase / Murray A. F. et al //Heliyon. – 2019. – Vol. 5. – №. 11. – P. e02817.

51. Newmaster S. G. DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach / Newmaster S. G., Fazekas A. J., Ragupathy S. //Botany. – 2006. – Vol. 84. – №. 3. – P. 335-341.
52. Nugroho, A. Simultaneous quantification and peroxynitrite-scavenging activities of flavonoids in Polygonum Aviculare L. herb / A. Nugroho, E. Kim, J. Choi, H. Park // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2014. - Vol. 89, - P. 93-98.
53. Park, S. H. Polygonum aviculare L. extract reduces fatigue by inhibiting neuroinflammation in restraint-stressed mice / S. H. Park, S. Jang, E. Son, S. Lee, S. Park, Y. Sung, H. Kim // Phytomedicine. – 2018. – Vol. 42, – P. 180-189.
54. Rapini A. Phylogenetics of the New World Asclepiadeae (Apocynaceae) / Rapini A., Chase M. W., Konno T. U. P. //Taxon. – 2006. – Vol. 55. – №. 1. – P. 119-124.
55. Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. //Genetics. – 2000. – Vol. 155. – №. 2. – P. 945-959.
56. Shevchenko, A. S. Procedures used for isolation of complex biological active constituents from Polygonum / A. S. Shevchenko, R. A. Muzychkina, D.Y. Korul'kin, S. A. Ross / Journal of Chemical Technology and Metallurgy. - 2019. - Vol. 54, № 3. - P. 508-513.
57. Taberlet P. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA / Taberlet P. et al //Plant molecular biology. – 1991. – Vol. 17. – №. 5. – P. 1105-1109.
58. Matesanz S. Genetic diversity and population structure in Polygonum cespitosum: insights to an ongoing plant invasion / Matesanz S. et al. //PloS one. – 2014. – Vol. 9. – №. 4. – P. e93217.
59. Chiu Y. J. Hepatoprotective effect of the ethanol extract of Polygonum orientale on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice / Chiu Y. J. et al. //Journal of food and drug analysis. – 2018. – Vol. 26. – №. 1. – P. 369-379.

60. Cronn R. C. Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes / Cronn R. C. et al. //American journal of botany. – 2002. – Vol. 89. – №. 4. – P. 707-725.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Имени С.С.
подпись инициалы, фамилия
«24» июня
2022г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Генетический полиморфизм популяций и филогения видов родства
Polygonum aviculare (Polygonaceae)

тема

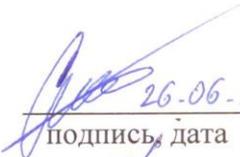
Руководитель

 24.06.22
подпись, дата

должность, ученая степень

И.Е. Ямских

Выпускник

 26.06.22
подпись, дата

Р.Т. Садыков

Рецензент


подпись, дата

должность, ученая степень

И.В. Тихонова

Красноярск 2022