

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

И.Е. Ямских

\_\_\_\_\_

подпись

\_\_\_\_\_

инициалы,  
фамилия

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Анализ генетической изменчивости сибирских популяций *Galium odoratum*  
(Rubiaceae)

06.04.01 «Биология»

06.04.01.06 «Геномика и биоинформатика»

Руководитель

зав. кафедрой, д.б.н.

И.Е. Ямских

\_\_\_\_\_

подпись,  
дата

\_\_\_\_\_

должность, ученая  
степень

\_\_\_\_\_

инициалы,  
фамилия

Выпускник

Д.Е. Барина

\_\_\_\_\_

подпись,  
дата

\_\_\_\_\_

инициалы,  
фамилия

Рецензент

с.н.с., к.б.н.

И.В. Тихонова

\_\_\_\_\_

подпись,  
дата

\_\_\_\_\_

должность, ученая  
степень

\_\_\_\_\_

инициалы,  
фамилия

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Анализ генетической изменчивости сибирских популяций *Galium odoratum* (Rubiaceae)» содержит 52 страницы текстового документа, 60 использованных источников, 12 рисунков и 9 таблиц.

Ключевые слова: *GALIUM ODORATUM*, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, ISSR-PCR, ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.

Объекты исследования – 4 популяции *Galium odoratum*, произрастающие в черневых лесах Западного Саяна (Go1, Go2), Горной Шории (Go3) и северо-восточного Алтая (Go4).

Цель работы - изучение генетического полиморфизма популяции и филогенетических связей *Galium odoratum* в горах Южной Сибири.

В ходе работы были проведен анализ генетической изменчивости популяций подмаренника душистого с помощью ISSR-PCR анализа, а также филогенетический анализ с использованием ядерного (Internal Transcribed Spacer) и пластидных (ген *maturase K*, межгенный спейсер *atpB-rbcL*) маркеров. Уровень генетического разнообразия в популяциях *Galium odoratum* невысок и варьирует от 14,63-до 36,59%. Максимальный уровень изменчивости характерен для алтайской популяции Go4, минимальный – для западносаянской низкогорной Go1. Генетически близки друг другу алтайская Go4 и кузедеевская Go3 популяции. На филогенетических деревьях отмечается объединение образцов из изученных популяций в один кластер. При анализе дерева, построенного на основе анализа ITS-регионов, отмечается отделение образца из алтайской популяции в кластер с *Cruciata glabra*.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Третичные неморальные реликты во флоре Сибири .....	6
1.2. Ботаническая характеристика и применение <i>Galium</i> <i>odoratum</i> .....	12
1.3. Молекулярно-генетические исследования растений .....	17
1.4. Молекулярно-генетические исследования видов р. <i>Galium</i> .	20
ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	23
2.1. Характеристика районов исследований .....	23
2.2. Объекты исследований .....	26
2.3. Методы генетических исследований.....	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	36
3.1. Оценка генетического полиморфизма популяций <i>Galium</i> <i>odoratum</i> с использованием ISSR-маркеров.....	36
3.2. Филогенетический анализ видов р. <i>Galium</i> Ошибка! Закладка не определена.	
ВЫВОДЫ.....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	39

## ВВЕДЕНИЕ

Флора юга Сибири очень богата и разнообразна и включает высокий процент эндемичных и реликтовых видов. Видообособленность некоторых видов высших сосудистых растений указывает на то, что эти виды, застали и пережили ледниковый период. На реликтовость этих видов указывает дизъюнктивный ареал (Смирнова, 1987).

По данным А.В. Положий и Э. Д. Крапивкиной (1985) на территории Сибири произрастало около 57 реликтов, в настоящее время насчитывается больше 100 видов с проявляющимися признаками реликтовости.

Считается, что реликты во флоре юга Сибири сохранились еще в момент оледенения, которое закончилось, примерно 11 тыс. лет назад в эпоху плейстоцена. Поэтому такие растения представляют огромный интерес для изучения филогенетики, эволюции, истории происхождения флоры. Исследуемый нами вид - *Galium odoratum* (L.) Scop. - относится к числу неморальных третичных реликтов, которые сохранились в черневой тайге в горах Южной Сибири. Подмаренник душистый занесен в «Красную книгу Красноярского края» (2022). Характеризуется дизъюнктивным ареалом. Содержит биологически активные вещества и используется в народной медицине. Из семян подмаренника готовят напиток, а корни растения содержат красящие вещества.

*Galium odoratum*, на сегодняшний момент, остается малоизученным видом, особенно его сибирские популяции. Впервые определены нуклеотидные последовательности пластидных участков генома исследуемого вида. Изучение генетической изменчивости популяций и филогении подмаренника позволит получить данные об их состоянии, сведения о родственных связях и путях филогенеза.

**Цель работы:** изучение генетического полиморфизма популяции и филогенетических связей *Galium odoratum* в горах Южной Сибири.

### **Задачи:**

1. Провести анализ генетической изменчивости популяции *Galium odoratum* с помощью ISSR-PCR анализа.
2. Изучить степень генетического сходства популяций подмаренника душистого из различных частей ареала.
3. Провести филогенетический анализ подмаренников с использованием ядерных и пластидных маркеров.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Третичные неморальные реликты во флоре Сибири

Реликты третичных широколиственных лесов привлекли внимание ботаников после того, как П.Н. Крылов открыл и описал в предгорьях Кузнецкого Алатау «Кузедеевский липовый остров». Реликтовые растения являются необходимым и ценным материалом для исследования происхождения флоры и растительности Сибири (Положий, Крапивкина, 1985).

Термин «реликт» ввел немецкий антрополог и географ Оскар Пешель в 1875 году, однако четкого определения этому термину не было дано вплоть до нынешних дней. А.Е. Еленевский и В.И. Радыгина (2002) указывают, что реликт – одно из ключевых понятий в фитогеографии, но ни одно понятие не трактовалось в столь различном смысле в многочисленных работах по флоре, геоботанике, ландшафтоведению, фито-физической географии. Реликт является живым свидетелем прошлых эпох и позволяет изучать историю эволюции растительного мира. Он также может служить важным показателем при оценке состояния окружающей среды и ее изменений в течение длительного времени.

М.В. Казакова и В.Н. Тихомиров (1984) пишут, что реликт - это остаток древней флоры, произрастающий на определенной территории и имеющий тенденцию к исчезновению при изменении условий окружающей среды. Ареал реликта, как правило, представляет собой остаток от более обширного ареала в прошлых геологических периодах, он был сформирован при других условиях, отличающихся от современных. В некоторых случаях реликты характеризуются дизъюнктивным ареалом. Бывает так, что один и тот же вид, находясь в одной части ареала, может прогрессировать, а в другой части - быть реликтовым (Казакова, Тихомиров, 1984).

В своей работе В.И. Радыгина (2002) отождествляет понятие реликт с видом с реликтовым ареалом и определяет их как исторический компонент флоры. Реликты находятся в дисгармонии с современным условиям, что выражается в различных аспектах. Для определения времени, когда вид вошел во флору, необходимо использовать комплекс данных систематики, ареалогии, палинологии, исторической географии, палеоклиматологии (Еленевский, Радыгина, 2002).

С. Schroter (1913, 1934) выделяет следующие признаки реликтового ареала:

- 1) ограниченность пространства;
- 2) малая численность вида;
- 3) ареал в процессе сокращения;
- 4) естественно-исторические причины дизъюнкции.

С. Schroter отмечает, что в пределах своего ареала реликтовый вид находится в определенной дисгармонии с естественными условиями произрастания. Если ареал дизъюнктивный и вид в нем находится в гармонии с окружающей средой, то такой вид к реликтовому отнести нельзя (Schröter, 1934, 1913).

Классификация реликтов производится по их возрасту (климатические), отражению определенных эдафических условий (эдафические или геоморфологические), принадлежности к растительным формациям (формационные).

Время вхождения вида в состав флоры определяет возраст реликта. При этом время происхождения реликтового вида не принимается во внимание при установлении возраста реликта. Возраст реликта необходимо понимать, как в географическом, так и в систематическом отношениях.

По возрасту и происхождению реликтовые виды могут быть подразделены на:

- 1) дотретичные;

- 2) третичные (в том числе: а) тропического и субтропического, б) умеренного, в) альпийского и арктического типа);
- 3) ледниковые;
- 4) межледниковые;
- 5) послеледниковые.

Понятие «третичный реликт» употребляется в контексте времени вхождения реликтов во флору. В геологической науке «третичный реликт» - это устаревшее название временного интервала геологической истории планеты, который охватывает промежуток времени от вымирания динозавров ( $\approx 65$  млн. лет назад) до начала последнего ледникового периода ( $\approx 1,8$  млн. лет назад). Третичный период включает в себя палеоген, неоген и часть антропогена. Нередко возникают сложности при доказательстве возраста и происхождения реликта. Например, является ли реликт действительно третичным, пережил ли он плейстоценовые оледенения или появился вторично в более благоприятном для него «климатическом» времени (Положий, 1985).

Климатические реликты несут сведения о тех геологических периодах, когда эти реликты имели более обширные ареалы. Реликты, обитающие в теплые периоды и в умеренных широтах Северного полушария, сохранились до нашего времени в своеобразных убежищах. К таким видам относится, например, каштан в Западном Закавказье (Вульф, 1941). Очень многие реликтовые виды встречаются в горах, не затронутых покровным оледенением.

Эдафические реликты свидетельствуют об изменении береговой линии моря, солености песка, а также, о смене песков и грунта на более тяжелый механический состав.

Так же выделяют формационные реликты, которые отражают смену растительных формаций на конкретной местности. Например, увеличение



количества дубрав, которые включают в свой состав ель. Формационный возраст реликтов может измеряться сотнями лет.

Эдафические, климатические и формационные реликты трудно различать, т.к. только совокупность абиотических факторов может являться причиной реликтовости. Климатические изменения всегда связаны с трансформацией почвенного и растительного состава (Козырева, 2005).

Многие авторы стараются использовать новые подходы в изучении популяций реликтов. Я.П. Дидух (1988) разделил реликты на четыре группы по их активности: процветающую, угасающую, реликтовую и экспансивную. В качестве критерия активности автор использовал широту эколого-ценотической амплитуды, встречаемости, проективного покрытия.

По мнению авторов (Юрцев, 1987; Дидух, 1988), реликтовый вид является географическим термином и связан с историческим расселением. Термин независим от систематической изоляции, который должен относиться к остаткам древнего рода. Для подобных изолированных видов применяется термин «рестанцы». Таким видом является *Ginkgo biloba* L., который также, является реликтовым. Чтобы определить время вхождения реликта в состав флоры используют палеоботанические данные. Кроме того, проводится сравнительный анализ ареала вида в целом и приближенных ареалов викарных видов. В дополнение к этому, выделяют и анализируют географические элементы изучаемой флоры для того, чтобы определить место реликтовых видов. В итоге сопоставляют совокупность всех полученных результатов и восстанавливают исторический процесс развития изучаемой флоры (Казакова, 2017).

При флорогенетическом анализе неморальных реликтов черневой тайги Южной Сибири было выделено три генетические группы:

1. Древне-средиземноморские реликты (*Cruciata krylovii* (L.) Opiz., *Brunnera sibirica* Stev. и др.) – не имеют флорогенетических связей в

современной флоре Сибири. Близкородственные виды произрастают в области древнего Средиземноморья.

2. Атлантические реликты (*Asarum europaea* L., *Galium odoratum*, *Stachys sylvatica* L.) – имеют европейский центр происхождения. Близкие виды этой группы встречаются в современной флоре Сибири или Дальнего Востока и не образуют широких разрывов ареалов.

3. Пацифические реликты (*Anemone baicalensis* Turcz. Ex Ledeb., *Waldsteinia ternata* (Stephan) Fritsch и др.) – имеют азиатский центр образования. В работе М.М. Ильина отмечено, что западной границей распространения видов данной группы (кроме *Osmorhiza amurensis*) является р. Енисей (Ильин, 1938, 1941).

Отличительной чертой современной лесной зоны Сибири является отсутствие подзоны широколиственных лесов, характерной для Европейской части и Дальнего Востока (Дорофеев, 1963; Положий, Крапивкина 1985). В третичное время широколиственные леса произрастали на территории Сибири. Однако, вследствие похолодания, иссушения климата и последующего оледенения, древесные широколиственные породы исчезли из состава древостоя, а их травянистые влаголюбивые и теплолюбивые спутники смогли сохраниться в черневых лесах гор Южной Сибири, где для них создались наиболее благоприятные условия (Гуреева, 2001).

Современный ареал черневой тайги имеет разобщенный характер. Отдаленная его западная часть располагается на Юго-Западном Алтае на отрогах Холзунского и Тигирецкого хребтов. Далее черневая тайга распространяется на Северо-Восточную часть Алтая (бассейн Телецкого озера), соединяясь через бассейн реки Лебедь с черневой тайгой Горной Шории, Салаира и западными склонами Кузнецкого Алатау. Черневые леса распространены на северных склонах Западного Саяна и в низкогорьях юго-западной части Восточного Саяна. Восточная граница черневой тайги

зафиксирована на северном склоне Хамар-Дабана (Куминова, Положий, Крапивкина, 1985). Общая площадь черневой тайги составляет 2511 км<sup>2</sup>.

Отмечаются следующие признаки черневой тайги: доминирование пихты, осины, иногда кедра, а также наличие в подлеске рябины, черемухи и калины. Характерно наличие крупнотравья, папоротников, неморальных реликтов и отсутствие типичных бореальных мхов (Ревердатто, 1924; Куминова, 1950, 1960, 1971а, 1971б, 1973; Гудошников, 1978; Огуреева, 1983; Лацинский, Ревякина, 1991).

Черневая тайга характеризуется хорошо развитым травяным покровом, крупными деревьями, высокой продуктивностью, высоким классом бонитета. Сезонная ритмичность развития травяного покрова черневой тайги очень схожа с широколиственными лесами (Назимова, 1967).

Основными условиями, определяющими существование черневых лесов гор Южной Сибири, является сочетание следующих факторов:

- Высокая влажность воздуха, значительное количество осадков (от 800-1500 мм в год). Вклад во влажность также вносит многочисленное таяние ледников и снежников;
- Высокая среднегодовая температура воздуха;
- Снежный покров высотой 100 - 200 см;
- Слабое промерзание почвы.

Тепло, достаточное количество влаги и благоприятные почвенные условия способствовали сохранению третичных реликтов в черневой тайге (Крылов, 1957; Назимова, 1967, Гудошников, 1979, 1986; Лубягина, 1981; Положий, Крапивкина, 1985).

По мнению С.В. Гудошникова, происхождение черневой тайги стоит рассматривать совместно с происхождением темнохвойной тайги, поскольку пихта сибирская является эдификатором этих формаций (Гудошников, 1978). Однако А.И. Толмачев, отмечал, что связь между темнохвойными и черневыми лесами ограничена. Объяснял он это тем, что развитие

темнохвойных и широколиственных лесов шло относительно независимо друг от друга. С приходом похолодания теплолюбивая неморальная флора ушла на юг, а темнохвойная тайга переместилась на нижние уровни гор, а затем и на равнины, постепенно вытесняя широколиственные леса (Толмачев, 1954).

П.И. Дорофеев (1963) считал, что такие растения, как пихта, ель, сосна и лиственница сыграли значительную роль в формировании древостоев в горах Южной Сибири, постепенно замещая широколиственные породы. Пихта в данном случае выступила как эдификатор. Влияние пихты на окружающую среду выражалось в изменении климата почвенного слоя, которое предотвращало резкие колебания температуры и повышение влажности (Гудошников, 1986, Горчаковский, 1954; Назимова, 1967; Пешкова, 1985).

Черневая тайга – уникальный феномен флоры Сибири, но усиленная эксплуатация может привести к ее деградации и потере биоразнообразия. Необходимо принимать меры по сохранению площадей черневой тайги в различных районах Южной Сибири, поскольку именно охрана местообитаний является важным фактором сохранения уникального комплекса неморальных реликтов (Ильин, 1938; 1941, Баранов, 1959).

## **1.2. Ботаническая характеристика и применение *Galium odoratum***

Подмаренник (лат. *Gálium*) – род многолетних, двулетних и однолетних травянистых растений, имеющих форму полुकустарничков. Относятся к семейству Мареновые (лат. *Rubiaceae*). Распространены по всему миру, охватывая регионы с умеренным и холодным климатом. Общее число видов насчитывается от 400 до 650. (Брем, 2004)

Характеристика представителей данного рода представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика рода *Galium*

Органы и их части	Характеристика
Цветки	Обоеполые, иногда однополые, без лопастей чашечки, 4-членные (реже 3-х членные).
Венчик	Колесовидный со сросшимися лопастями при основании или на 1/3 длины.
Андроцей, гинецей	Нити прикреплены к верхнему или нижнему краю сросшейся части венчика между лопастями. Столбиков 2 свободных или 6 сросшихся.
Плоды	Голые или опушенные. Двойчатые, кожистые, распадающиеся при созревании. Встречаются также гладкие или морщинистые.
Соцветие	Полузонттик, метелка. Иногда редуцируются до одиночных цветков.
Листья	В мутовках по 4-14, верхние парные или одиночные, встречаются прицветники.

В р. *Galium* встречаются сходные внешне виды, но принадлежащие к различным секциям (Линчевский, 1958; Тутаюк, 1980). Также много полиморфных, широко распространённых видов. Нередко встречаются молодые виды, которые сложно определить ввиду их слабой географической дифференциации.

Древние виды данного рода весьма постоянны в морфологическом отношении даже в пределах разорванного ареала. Они не дают новых рас там, где можно было бы их ожидать. Нередко наблюдается гибридизация между видами как близкими, так и из разных секций (Губанов, 1976; 2004).

*Galium odoratum* – многолетнее травянистое растение. Распространен в черневых, темнохвойных, липовых и смешанных лесах. Обширный участок ареала охватывает почти всю Европу, северо-западную часть Средиземноморья, Азию, Иран, Китай, Дальний восток, Японию, Северную Америку (является заносным). Спорадично распространен в горах Южной Сибири (Липшиц, 1977) (рис. 1).

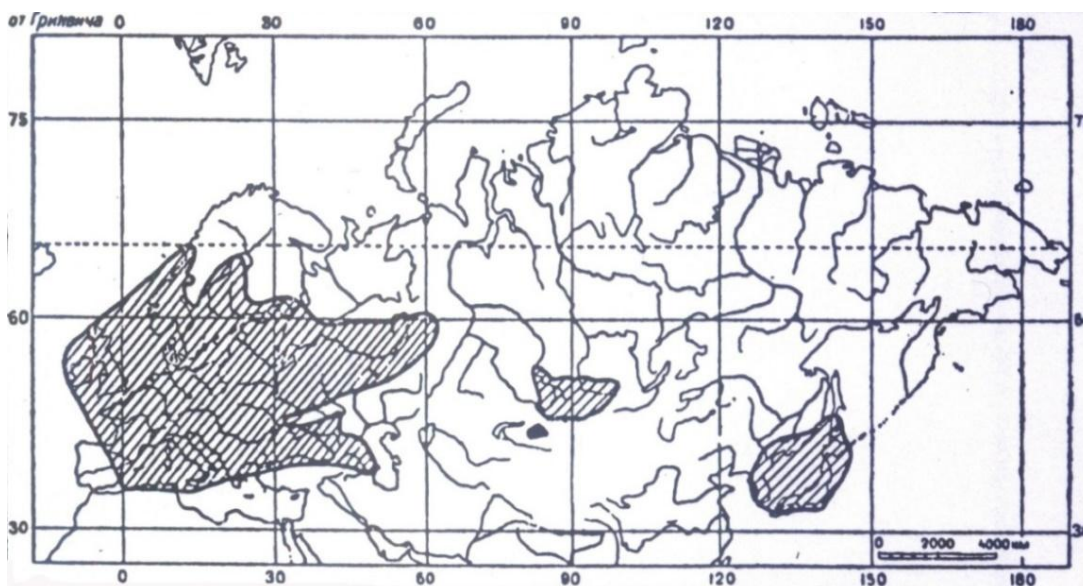


Рисунок 1 – Ареал *Galium odoratum* (Положий, Крапивкина, 1985)

Подмаренник душистый достаточно часто встречается в сообществах на юге Красноярского края, в горах Восточного и Западного Саяна, на Алтае и в Горной Шории.

*G. odoratum* предпочтительно обитает в тени на влажных почвах в широколиственных и хвойных лесах. Повсеместно встречается в черневой тайге. Часто наблюдается появление вида во вторичных осиновых лесах и в высокотравье. В Западном Саяне произрастает в травяном покрове кедровых и пихтовых лесов (Гудошников, 1978).

Ниже в таблице 2 перечислены ботанические характеристики *G. odoratum*.

Таблица 2 – Ботаническое описание *Galium odoratum*

Органы и их части	Характеристика
Корневище	Тонкое, ползучее, разветвленное.
Стебли	Гладкие, простые, 4-гранные, высотой от 10 до 60 см.
Листья	Остроконечные, обратно-ланцетовидные, собранные по 6-10 шт. в мутовках.
Цветки	Соцветие верхушечное из нескольких полузонтиков. Цветки мелкие, белые, немногочисленные, 4-членные. Имеют характерный приятный запах.
Плоды	Шаровидные, покрытые волосками, диаметр 3-4 мм.
Андроцей, гинецей	Тычинки расположены на коротких нитях, пыльники выставляются из зева цветка. Столбик двураздельный, скрытый в трубке венчика.



Рисунок 2 – Внешний вид подмаренника душистого

Цветет растение в апреле-мае, плодоносит в июле-сентябре. Листья растения зеленые всю зиму, отмирают после таяния снега. Семена прорастают в конце весеннего периода или в начале лета. Форма семядолей

проростков овально-ланцетные. Из пазушных почек семядолей развиваются побеги второго порядка, примерно, через три-четыре года начинают отрастать горизонтальные побеги-столоны с чешуевидными листиками. Вертикальные побеги развиваются при выходе почки на поверхность. Из почек горизонтального участка в следующем году появляются вертикальные и горизонтальные побеги (Степанов, 2016).

В горах Южной Сибири найдено и описано 16 видов подмаренника. Один из которых *Galium odoratum*. Поясно-зональная группа – неморальная. Экологическая группа — мезофит. Биоморфа — криптофит. Для вида в целом число хромосом 44, однако в обозначенном регионе отсутствуют данные по виду *G. odoratum*. По степени редкости – обилён в районах произрастания. Встречается в черневых, таежных и подтаежных сообществах (Степанов, 2016).

Название *Galium*, возможно, имеет греческое происхождение. В трактовке Плиния Старшего означало «закваска, сыворотка», так как при добавлении подмаренника в молоко – оно скисает. Подмаренник собирается в фазе цветения, сушится в тени и хранится в сухом прохладном месте. В растениях данного рода найден ряд биологически активных веществ: иридоиды (асперулозид, секогалеозид), флавоноиды (апигенин, глюкопиранозид апигенина, гиперозид, цинарозид, изорутин, лютеолин и др.), кумарины, сапонины, эфирное масло, алкалоиды (хинин, эметин, кофеин).

Из семян подмаренника готовят напиток, напоминающий кофе. Корни растения содержат красящие вещества из группы антрахинонов: пурпурин, рубэритрин, ализарин (Станков, Ковалевский, 1952).

Подмаренник широко используется в народной медицине в виде настойки, как спазмолитическое, седативное, анальгезирующее средство при заболеваниях сердца, печени, подагре, гастритах, пневмонии. Выжатый сок можно использовать при болезнях почек, сыпях на коже, нарывах, экземе,



псориазе. Помимо этого, растение можно принимать внутрь для лечения водянки (Анненков, 1878).

Все виды р. *Galium* имеют свойство коагулировать кровь. Применяется для ванночек от усталости и снятия напряжения. Чаще всего используется в виде настойки листьев растения или цветков в кипятке (Телятьев, 1976).

При исследованиях свойств подмаренника его отвар давали крысам. Он вызывал торможение подкорковой и стволовой структур головного мозга. Эти исследования были направлены для клинических испытаний для лечения эпилепсии с судорожным проявлением. Исследования на крысах показали следующее: введение настойки подмаренника в печень крыс приводило к повышению концентрации гликогена в мышцах и в печени, а также содержание глюкозы в крови приходило в норму. Было отмечено, что у животных уменьшалась выраженность лейкоцитоза, который развивался на фоне опухолей. Подмаренник активно используют в народной медицине при лечении онкологии (Лавренов, 2003; Яковлев, 2015).

### **1.3. Молекулярно-генетические исследования растений**

Молекулярные исследования растений стали использовать сравнительно недавно. Сравнивая геномы различных таксонов можно получить информацию об их эволюционных отношениях. Изменение ДНК происходит в результате спонтанных мутаций, которые могут не проявляться в фенотипе, но это может стать причиной расхождения таксонов.

Главным объектом исследований в молекулярной систематике является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Геном локализован по большей части в 3-х клеточных органеллах: основная часть - заключена в ядре, наименьшая - в митохондриях и пластидах.

Одним из наиболее распространенных методов молекулярной биологии является секвенирование ДНК. Секвенирование используется для поиска

мутаций, являющихся причиной расхождения видов, и может нести информацию об изменениях в последовательности генов, которые могут быть связаны с различными фенотипическими признаками.

Другой важный метод молекулярной биологии – полимеразная цепная реакция (ПЦР). Она позволяет увеличивать количество ДНК в образце и детектировать наличие конкретной последовательности ДНК. ПЦР широко применяется в медицине, криминалистике, биологии, сельском хозяйстве и других областях. На ПЦР основаны многие современные методы анализа генетической изменчивости видов.

ПЦР-метод является очень чувствительным и может обнаружить незначительное количество ДНК-фрагментов в образце. Он позволяет получать многократное количество копий ДНК за короткое время и с высокой точностью. Однако, метод также имеет свои недостатки. Например, он может дать ложноположительный результат, если в образце присутствуют контаминации или другие смежные ДНК-фрагменты. Также, при копировании могут возникнуть ошибки в последовательности нуклеотидов, что может привести к неточным результатам и искажению данных. Тем не менее, ПЦР-метод играет значительную роль в современной биологии и медицине. Он позволяет обнаруживать и анализировать последовательности, которые ранее были недоступны для изучения, что открывает новые возможности в решении таксономических вопросов у растений. Кроме того, ПЦР-метод используется в палеоботанике для идентификации древних остатков растений. Также при помощи метода ПЦР можно проводить различные модификации. Например, при обратной транскрипции вместо ДНК используется РНК, что позволяет анализировать экспрессию генов. Также можно использовать различные виды ДНК-полимераз, что увеличивает их точность и специфичность. Метод ПЦР продолжает развиваться, появляются новые технологии для более эффективного и точного проведения экспериментов (Александров, 2005).

Электрофорез является качественным и количественным методом анализа ДНК. Метод простой, он определяет приблизительную концентрацию ДНК в пробе. В основе метода лежит сравнение выделяемой ДНК со стандартами ДНК маркера молекулярной массы, его разведения и концентрации, которая указана на лейбле от производителя. После окрашивания геля этидиумбромидом идет сравнение свечения полос ДНК, если, например, шмер выше или ниже основной полосы, то это может говорить о деградации или не очень качественной очистке ДНК (Куцев, 2009). Кроме бромистого этидия, можно использовать и другие флуоресцирующие красители, например, SYBR Green, который менее токсичен, чем бромистый этидий.

Электрофорез позволяет разделить ДНК-фрагменты по размеру и провести их анализ или очистку для последующих исследований. Также, могут использоваться маркеры, содержащие флуоресцентные или радиоактивные метки для более точной визуализации и измерения.

Основные методы, при помощи которых можно оценить генетическую изменчивость популяций: RFLP, RAPD, ISSR, AFLP, DAF, SCAR, CAPS и метод микросателлитов. Методы отличаются между собой по воспроизводимым результатам, трудоемкости, стоимости и проявляемой природе полиморфизма. В основу данных методов положены разные принципы, например, гибридизации (RFLP) или полимеразной цепной реакции (RAPD, AFLP, ISSR). Другие методы выявляют уникальные участки ДНК (SCAR, CAPS) или участки ДНК, встречающиеся многократно в геноме (микросателлиты). Определенные признаки могут быть проанализированы по фенетическому методу анализа (Фризен, 2007).

Молекулярно-генетические исследования растений широко применяются в различных областях биологии и сельского хозяйства. Они помогают установить родственные связи между различными видами

растений, определить генотипическую изменчивость популяций, выявить гены, ответственные за различные фенотипические признаки, и многое другое. В сельском хозяйстве молекулярные методы используются для создания новых сортов растений, устойчивых к болезням и вредителям, а также для оценки качества и безопасности продуктов питания.

#### **1.4. Молекулярно-генетические исследования видов р. *Galium***

Молекулярно-генетические исследования *Galium odoratum* и близкородственных видов проводились, в основном, зарубежными авторами. Это оправдано, т.к. большая часть ареала изучаемого вида находится в Европейской части.

В работе Khalik et al., (2014) был проведен генетический и филогенетический анализы 24 видов р. *Galium* с использованием межмикросателлитных повторов (ISSR), и случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD). Было отобрано четыре праймера ISSR и RAPD – они сгенерировали 250 полиморфных амплифицированных фрагментов. Результаты этого исследования показали, что уровень генетической изменчивости *Galium* относительно высок. Результаты по маркерам RAPD выявили более высокий уровень полиморфизма (158 полос), чем ISSR (92 полосы). Кластеризация генотипов внутри групп не была одинаковой при сравнении дендрограмм, полученных с помощью RAPD и ISSR. Дендрограмма на основе UPGMA показала тесную связь представителей секции *Leiogalium* с *G. verum* и *G. humifusum* (секция *Galium*) и *G. angustifolium* (секция *Lophogalium*). Однако основной скоординированный анализ показал незначительные отличия от дендрограмм на основе UPGMA. Более апоморфные группы *Galium* образуют секцию *Leiogalium*, включающую многолетние виды *Galium*, *Lophogalium*, *Jubogalium*, *Hylaea* и

*Leptogalium*, а также однолетник *Kolgyda*. Остальные таксоны *Galium* монофилетичны (Abdel, 2014).

В других исследованиях, использующих технологию AFLP, был разработан наследуемый по материнской линии ДНК-маркер хлоропластов и выявлено 7 гаплотипов *G. odoratum* с разными пространственными паттернами (Ziegenhagen, 2003).

В работе Natali et al. (1995) приведены результаты филогенетического анализа 39 видов Rubieae и 15 таксонов, относящихся к 12 другим трибам семейства Rubiaceae, с использованием последовательности ДНК межгенного участка *atpB-rbcL* хлоропластов. Внутри Rubieae выделили пять клад, а пара представленных родов, таких, как *Galium* и *Asperula*, отделились, поэтому, можно сделать вывод о том, что они имеют полифилетическое происхождение (Natali, 1995).

Филогенетическая реконструкция сем. Rubiaceae с использованием межгенного спейсера *atpB-rbcL* приведена также в работе Ehrendorfer et al. (1994). Было проведено сравнение представителей семи родов из пяти триб Rubiaceae. Полученная в результате кладограмма RAUP очень хорошо соответствует диаграмме, основанной на данных о сайтах рестрикции хлДНК. Два разных молекулярных анализа подтверждают друг друга и вносят вклад в улучшенную систематическую организацию большого семейства, например, в отношении помещения трибы Hedyotideae в подсемейство Rubioideae, более близкого к Rubieae, чем к Psychotrieae (Ehrendorfer, 1994).

Manen и Natali (1994) проведены секвенирование, сборка и аннотация хлоропластного генома *Galium spurium*. Анализ генома проводили следующим образом: 33 хлоропластных генома, наиболее близких к *G. spurium*, были получены из GenBank, 58 генов общих белков во всех геномах были подвергнуты скринингу, а затем каждый ген был выровнен индивидуально с помощью MAFFT v7.313. Затем каждый ген был обработан

с использованием Gblocks 0.9b и соединен встык в суперген для каждого вида с использованием всех генов. Выявлено, что структура хлоропластного генома *G. spurium* представляет собой кольцевую молекулу длиной 153 481 п.н. с большой однокопийной (LSC) областью 84 334 п.н., маленькой однокопийной (SSC) областью 17 057 п.н. и парой инвертированных повторов.

Геном содержал 127 генов, в том числе 82 гена, кодирующих белок, 37 генов транспортной РНК и 8 генов рибосомной РНК, из которых 18 дуплицировались в IR-областях. Филогенетический анализ показал, что *G. spurium* тесно связан с *G. aparine* со 100% подтверждением.

Многочисленные флористические исследования в нескольких европейских странах показывают, что некоторые виды сосудистых растений могут указывать на древние происхождение лесных массивов. К таким видам, в частности, относится *Galium odoratum*, имеющий, преимущественно, вегетативное происхождение и представленный в сообществах серией клонов. Основной целью работы было получить знания о видоспецифичных способах расселения подмаренника душистого и потоках генов в естественных условиях. В работе были применены генетические AFLP-маркеры в качестве косвенного метода для определения распространения семян и клонального распространения *G. odoratum*.

## ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Характеристика районов исследований

Горы Южной Сибири составляют особую физико-географическую область, включающую в себя Салаирско-Кузнецкое нагорье, хребты Алтая, Восточный и Западный Саяны, а также Тувинское нагорье. Леса этого района относят к бореальному комплексу южносибирско-монгольских лесных формаций (Поликарпов и др., 1986).

Западный Саян является системой узких плоских и островерхих хребтов, которые разделены густой речной сетью, принадлежащей бассейну Енисея. Центральная часть Западного Саяна резко обрывается к северу Минусинской котловиной, а у подножья южных склонов располагается Тувинская котловина. Усинская котловина находится между Мирским и Куртушибинским хребтом, Турано-Уюкская котловина располагается у подножья южного склона хребта Куртушибинский (Назимова, 1975). Главный хребет Западного Саяна в западной части имеет характерный альпийский рельеф. Изрезанность рельефа с высотами 2800-3000 м предполагает обилие микроклиматов. Вероятно, по этой причине в данной местности сохранились участки с реликтами третичного периода.

Резкий континентальный климат с продолжительной зимой и коротким, не жарким летом, обусловлен удаленностью от океанов. Но из-за протяженности с юго-запада на северо-восток Западного Саяна арктические и атлантические потоки воздушных масс приостанавливаются, что приводит к сильной циклонической активности на севере горной системы (Пешкова, 1985).

Температура также переменчива, зависит от высоты над уровнем моря и может опускаться на 1°C на каждые 150 м подъема. Январские температуры могут достигать от – 20 до – 25 °С. В конце мая начинается

активное таяние снега из-за повышения среднесуточной температуры, в основном весь снег сходит в июне.

Количество летних осадков переменчиво и составляет 400-500 мм в год, на северных склонах порядка 100-200 мм, южные склоны находятся в «дождевой тени» и в межгорных котловинах количество осадков составляет от 300 до 500 мм. Июль и август являются самыми дождливыми месяцами (Пешкова, 1985).

Лесостепной пояс занимает низины и нижние части склонов, на высоте до 800 м над уровнем моря. Он представлен лиственными деревьями и кустарниками, а также различными видами травянистых растений. Лесной пояс расположен на высоте от 800 до 1800 м и включает в себя смешанные и хвойные леса. На самых высоких участках Западного Саяна располагается тундровый пояс, где растительность представлена лишайниками, мхами, кустарниками и редкими травянистыми растениями.

Общая картина почвенного и растительного покрова в Западном Саяне определяется климатическими условиями, высотой и экспозицией склонов. На северном макросклоне Западного Саяна широко распространены черневые леса, в состав которых входят большие площади пихтовых и кедровых лесов, в травянистом ярусе которых широко представлена флора неморального комплекса (Шауло, 2006).

К Северо-Восточному Алтаю относят бассейн Телецкого озера, Средней и Верхней Бии с притоками. В этой местности преобладают лесные и таежные ландшафты. Высоты района увеличиваются с севера на юг и юго-запад. Предгорные лесостепные равнины, переходящие в горно-лесные пояса, располагаются в среднегорье и низкогорье. Рельеф холмистый. Расчлененные участки чередуются с заболоченной местностью крупных рек. Питание рек смешанное, но в основном снеговое (Равкин, 1973).



Климат в регионе континентальный, весна начинается в первых числах апреля с преобладанием облачной и дождливой погоды в теплый период. Количество осадков в летние месяцы достигает 230-380 мм при годовой сумме 800-830 мм. Средняя температура в теплый месяц составляет 16-18,5°C.

Развита неширокая полоса лесостепи, которая переходит в мелколиственные леса на темно-серых оподзоленных почвах. Выше леса сменяются черневой тайгой, а еще выше располагается темнохвойная тайга, характеризующаяся «бурыми» дерново-слабоподзолистыми почвами. Луга развиты слабо, небольшие участки лугового и ерникового редколесья переходят в кустарниковые и каменистые тундры гольцового пояса. (Черепнин, 1957)

Горная Шория в литературе рассматривается, как южная часть Кузнецкого Алатау. Она располагается на междуречье Кондома-Мрассу, с севера на юг вытянута на 150-170 км, а с запада на восток на 90-100 км. Климат Горной Шории определяется рельефом. Ввиду того, что горные поднятия Кузнецкого Алатау располагаются почти в меридиональном направлении, они служат мощным конденсатором влаги, поэтому там преобладают летние осадки (Положий, Крапивкина, 1985). В Горной Шории выделяют два геоморфологических района: Западно-Шорский и Восточно-Шорский (Вдовин, 1988). В Западно-Шорском районе располагается крупный массив леса, который составляет Кузеевский «липовый остров».

Местность характеризуется среднегорным рельефом и окружена наиболее возвышенными горными массивами Абаканского, Шорского хребта и острогами Кузнецкого Алатау. Климат характеризуется высокой среднегодовой температурой, мощным снеговым покровом, в среднем количество осадков в год составляет 785 мм. Все пространство района занято черневой тайгой и характеризуется господством подзолистых и дерново-подзолистых почв (Трофимов, Таранов, 1968).

Кузедеевский липовый остров в Горной Шории является единственным крупным массивом широколиственного леса в Сибири.

На территории Горной Шории произрастает порядка 37 видов третичных неморальных реликтов, входящих в состав черневой тайги. Черневая тайга Горной Шории характеризуется определенными признаками, а именно: преобладанием пихты и осины в древостое с примесью кедра и березы; развитием подлеска с кустарниками; хорошим развитием высокотравного покрова с присутствием в нем неморальных реликтов и слабо развитым моховым покровом. Для липовых лесов характерна наибольшая концентрация неморальных реликтов.

Благодаря вышеперечисленным признакам, в горах Южной Сибири сформировалась биота, характеризующаяся высоким биологическим разнообразием и своеобразием. Регион богат древесиной, лесными, пищевыми, лекарственными ресурсами. Благоприятный климат способствовал высокой концентрации реликтовых и эндемичных видов растений и животных на данной территории. Многие из них занесены в российскую и региональные «Красные книги» (Степанов, 2016; Красная книга Красноярского края, 2012).

## **2.2. Объекты исследований**

Сбор фактического материала проводился в июле 2009 г., июне 2011 г., июне 2018 г. в пределах черневых лесов Западного Саяна и Северо-Восточного Алтая, Горной Шории. Объектом исследований явились 4 популяции подмаренника душистого. Места сбора материала отмечены на рисунках 3-5.

Геоботаническое описание сообществ проводили по известным методикам (Поляков, 2007). В лесных сообществах при характеристике древостоя определяли преобладающую породу, ее среднюю высоту,

ярусность, сомкнутость крон. Для характеристики травяно-кустарничкового яруса описывалась общая характеристика и видовой состав (Седельников, 1979). Для оценки проективного покрытия на пробных площадях было заложено по 20 площадок размером 1 м x 1 м. Затем рассчитывалось среднее проективное покрытие для каждого вида. Геоботанические описания и материал для анализа предоставлены научным руководителем – Ямских И.Е.

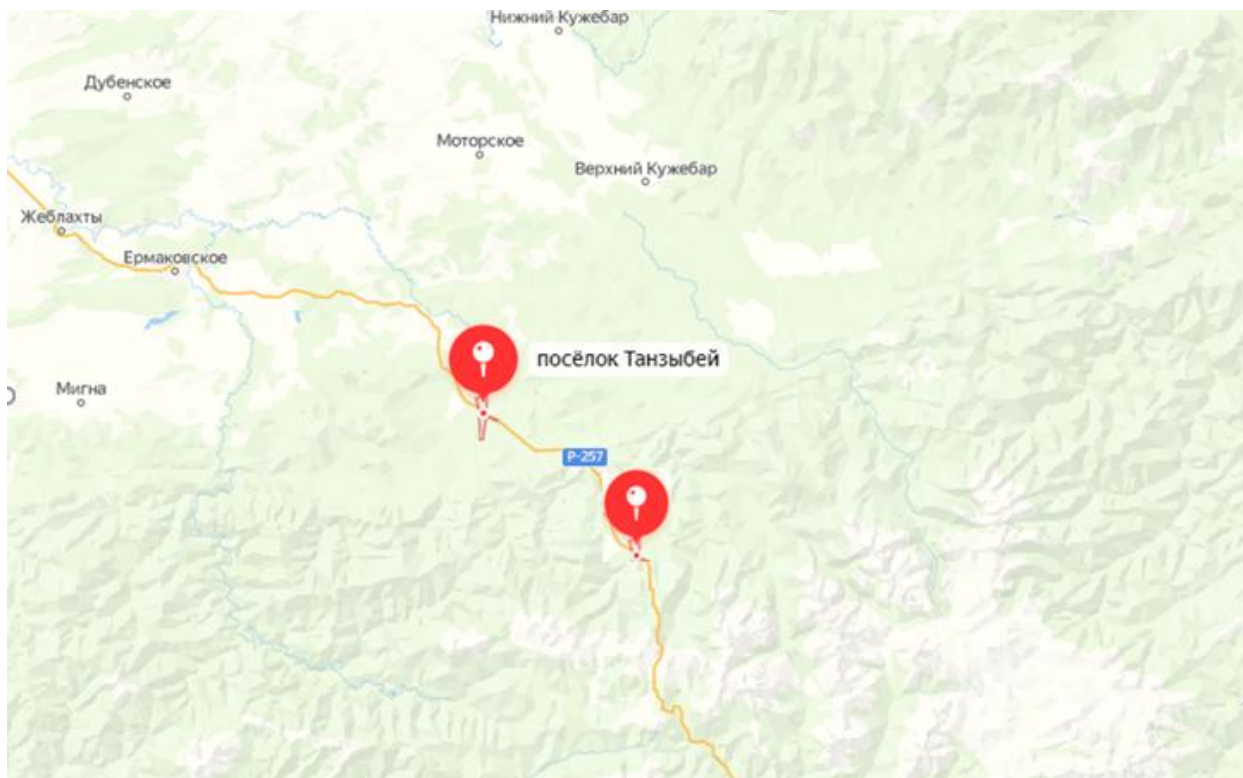


Рисунок 3 – Места сбора саянских популяций *G.odoratum*

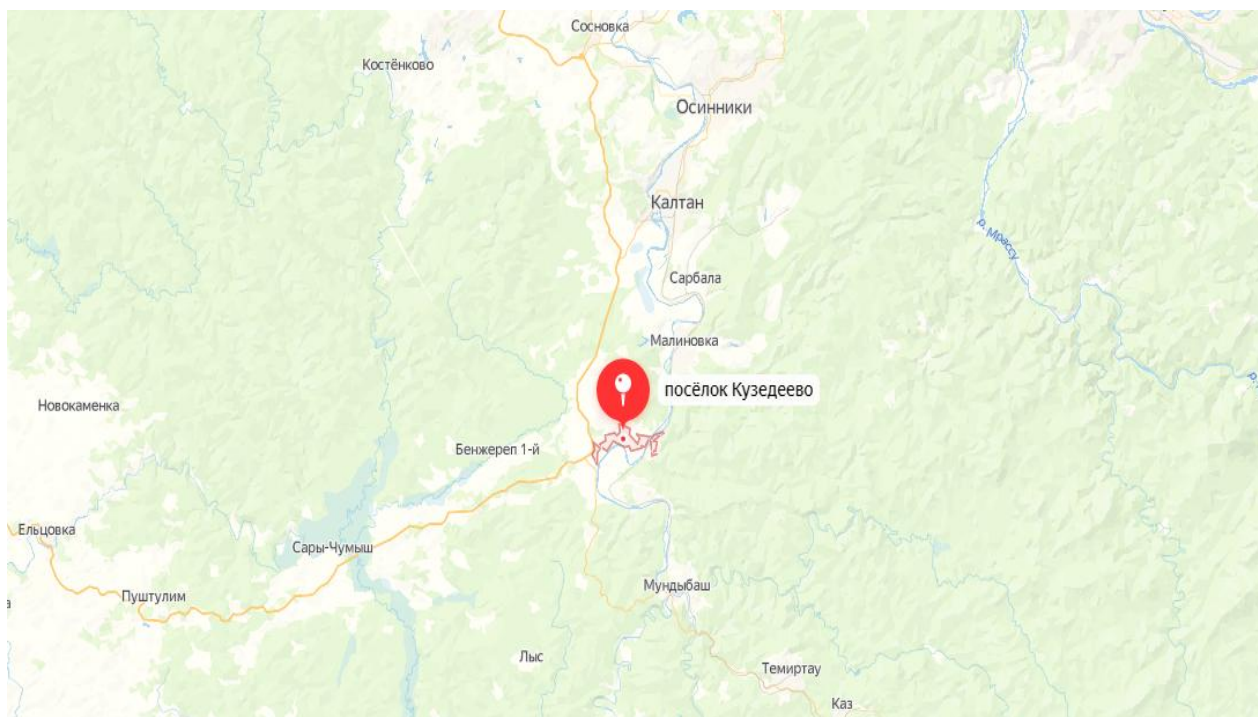


Рисунок 4 – Места сбора кузнецовской популяции *G. odoratum*

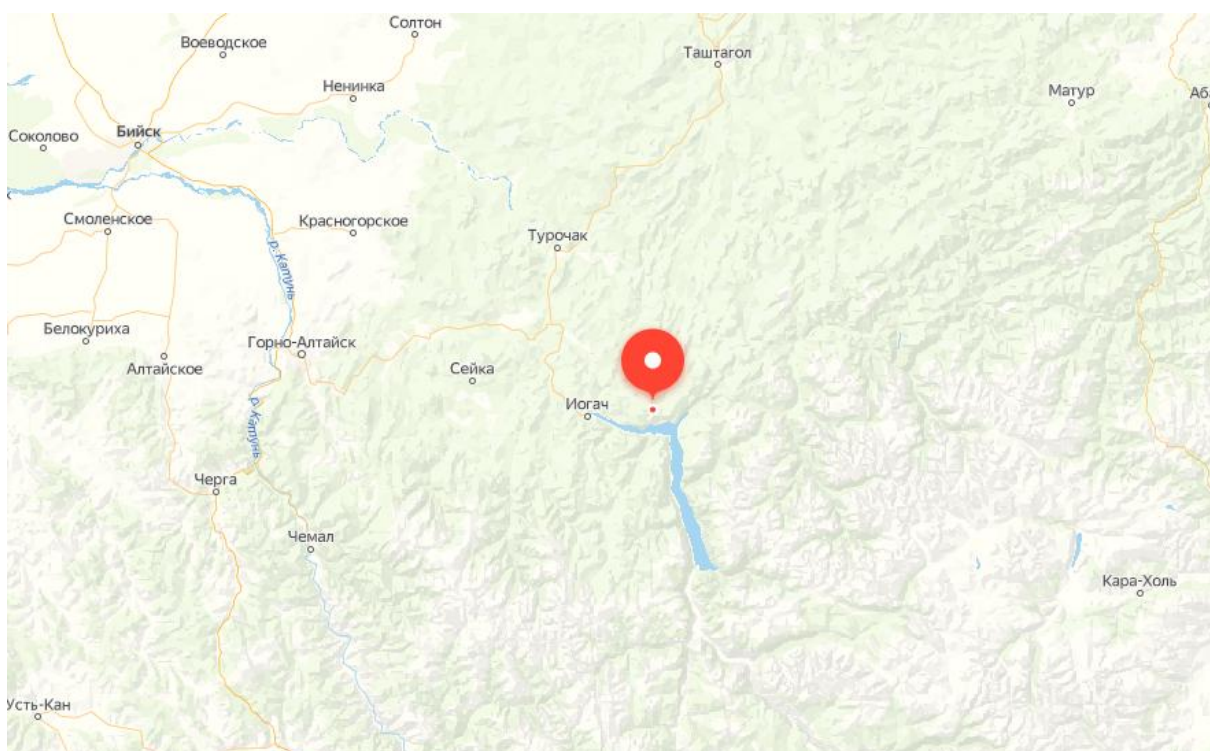


Рисунок 5 – Место сбора алтайской популяции *G. odoratum*

В таблице 3 приведена краткая геоботаническая характеристика местообитаний подмаренника душистого.

Таблица 3 – Геоботаническая характеристика местообитаний *Galium odoratum*

Попу- ляция	Сообщество	Состав древостоя, сомкнутость крон	Доминирующие виды травянистого яруса
<b>Западный Саян</b>			
Go1	Осинник папоротниково-широкотравный (хр. Веховой, низкогорье)	9Ос1Б 0,7	<i>Anemone baicalensis</i> (40%) <i>Matteuccia struthiopteris</i> (30%) <i>Galium odoratum</i> (5%)
Go2	Пихтарник папоротниково-анемоновый (дол.р.Чебижек, высокогорье)	8П2К 0,6-0,7	<i>Anemone baicalensis</i> (50%) <i>Matteuccia struthiopteris</i> (40%) <i>Dryopteris expansa</i> (10%) <i>Galium odoratum</i> (<1%)
<b>Горная Шория</b>			
Go3	Осинник высокотравно-орляковый (Кузедеевский липовый остров)	9Ос1Б+П 0,6	<i>Pteridium pinetorum</i> ssp. <i>sibiricum</i> (60%) <i>Milium effusum</i> (10%) <i>Galium odoratum</i> (10%)
<b>Северо-восточный Алтай</b>			
Go4	Березово-осиново-сосновый лес орляково-разнотравный (сев.побережье оз.Телецкое, подножие г.Торот)	6С2Б2Ос 0,7	<i>Pteridium pinetorum</i> ssp. <i>sibiricum</i> (20%) <i>Aconitum septentrionale</i> (10%) <i>Galium odoratum</i> (<1%)

Первая пробная площадь была заложена в осиннике папоротниково-широкотравном (Западный Саян, хр. Веховой). Состав древостоя 9Ос1Б, сомкнутость крон 0,7. Подрост представлен осиной и пихтой, подлесок – малиной, смородиной черной, спиреей дубровколистной. Общее проективное

покрытие травяно-кустарничкового яруса составило 70%. Доминантами являются: *Anemone baicalensis* (40%), *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (30%), *Pteridium pinetorum* ssp. *sibiricum* (15%), *Brunnera sibirica* (5%). Проективное покрытие подмаренника душистого составляет 5%. На данном участке изучалась популяция Go1.

Вторая пробная площадь находилась в пихтарнике папоротниково-анемоновом (дол. р. Чебижек). Состав древостоя – 8П2К. Сомкнутость крон – 0,6 – 0,7. Средняя высота пихт – 25–30 м. Подлесок представлен черемухой, спиреей, рябиной. Проективное покрытие травянистого яруса составило 90%. Доминантные виды: *Anemone baicalensis* (50%), *Matteuccia struthiopteris* (40%), *Calamagrostis obtusata* (15%), *Dryopteris expansa* (C. Presl) Fraser-Jenk. & Jermy (10%). Подмаренник душистый встречается в ограниченном количестве (менее 1%). Данная популяция *G.odoratum* была названа Go2.

Третья пробная площадь была заложена в Горной Шории, в окр. пос. Кузедеево («Кузедеевский липовый остров») в осиннике с примесью пихты и березы крупнотравно-орляковом. Состав древостоя – 9Ос1Б+П, сомкнутость крон – 0,6. В подлеске произрастают черемуха, рябина, калина. В подросте встречаются осина, пихта. Проективное покрытие травянистого яруса – 90%, в нем преобладают *Pteridium pinetorum* ssp. *sibiricum* (60%), *Milium effusum* L. (10%), *Galium odoratum* (10%), *Aconitum septentrionale* Koelle (5%), *Cirsium helenoides* (L.) Hill (5%). В данном местообитании отмечено максимальное проективное покрытие подмаренника.

Популяция Go4 была собрана у подножия г.Торот на побережье Телецкого озера (Северо-Восточный Алтай) в смешанном лесу (березово-осиново-сосновый лес с орляково-разнотравьем). Состав древостоя – 6С2Б2Ос, сомкнутость крон – 0,7. Подлесок представлен черемухой, ивой козьей, рябиной, таволгой дубровколистной, калиной. В травянистом ярусе доминируют *Pteridium pinetorum* ssp. *sibiricum* (20%), *Aconitum septentrionale*

(10%). *Galium odoratum*, как и другие реликты (*Stachys sylvatica*, *Anemone altaica* Fisch. ex C.A. Mey.), встречается в небольшом обилии (менее 1%).

Таким образом, нами изучен материал из различных участков дизъюнктивного ареала подмаренника душистого.

### 2.3. Методы генетических исследований

Молекулярно-генетические исследования проводились в молекулярно-генетической лаборатории ИФБиТ СФУ. В анализе использовалось 4 популяций. Из каждой популяции было выбрано 6-11 растений, произрастающих на расстоянии не менее 10 м друг от друга. Для транспортировки и хранения растительные образцы помещались в пакеты с силикагелем.

Выделение ДНК растений производилось с помощью набора Diamond DNA<sup>TM</sup> (Барнаул). Брали около 10 мг сухого материала и измельчали в ступке с пестиком. Далее добавляли лизирующий буфер в объеме 500 мкл, перемешивали и помещали в пробирку. После добавляли 10 мкл раствора протеиназы термостатировали около 45 минут при температуре 56 °С. Следующий этап заключался в центрифугировании при 13000 об/мин - 1 минуту, супернатант переносили в другую пробирку. Добавляли 150 мкл сорбента в лизат и переворачивали 4-5 раз, затем центрифугировали 2 минуты. Супернатант переносили в новую пробирку, затем добавляли солевого буфера в количестве 150 мкл, перемешивали аккуратно (переворачивая пробирку 4-5 раз) и убирали в морозильную камеру на пять минут, при температуре -20°C. Замороженный супернатант ставили центрифугироваться 7 минут при 13000 об/мин – для осаждения протеинов. Супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли 250 мкл осаждающего буфера, перемешивали. Центрифугировали 7 мин при 13000 об/мин. После центрифуги – сливали жидкость, оставшийся осадок

промывали в 70% этаноле и снова центрифугировали в течение 1 минуты. Спирт удаляли, осадок просушивали в термостате при 56°C и около 1-й минуты на воздухе, затем растворяли в 70 мкл воды.

Генетический полиморфизм популяций изучали с использованием метода ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats).

На первом этапе исследований производился подбор праймеров, дающих наибольший полиморфный результат. Для этого на 6 образцах ДНК из разных популяций экспериментальным путем тестировался стандартный набор праймеров (Mansour et al., 2009) (табл. 4). Для дальнейшего анализа было отобрано три праймера (17898А, 17898В, ISSR-23). Далее проводился анализ со всеми выделенными образцами.

Смесь для амплификации включала в себя 10 мкл готовой PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 6 мкл воды, 2 мкл ДНК и 2 мкл праймера. Программа амплификации: 95°C – 5 мин, 95°C – 20 сек, 55°C – 45 сек (понижение температуры на 0,7°C в каждом последующем шаге), 72°C – 90 сек, 95°C – 20 сек, 44°C – 30 сек, 72°C – 90 сек.

Разделение продуктов амплификации проводилось в горизонтальной электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при 200V в 1,8% агарозном геле. Гель окрашивали раствором бромид аэтидия и фотографировали при 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), показателя подразделенности популяций ( $G_{st}$ ). Генетические дистанции (D) между популяциями определялись по формуле М. Нея (Nei, 1978).



Дендрограмма сходства строилась 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 рассчитывались по формуле М.Нея (Nei, 1972).

Оценка генетической структуры популяций была проведена с использованием байесовского подхода (MCMC: Марковская цепь Монте-Карло), в программе STRUCTURE версии 2.3.4. (Hubisz et al., 2009).

Программа STRUCTURE находит основную генетическую популяцию, среди различных особей, генотипированных по нескольким маркерам, и выводит ту долю генома индивидуума, которая происходит из последовательности каждой выводимой популяции по методу количественной кластеризации. По итогу, мы можем определить истинное количество кластеров, на которое подразделяются генетически однородные группы.

Большинство параметров было установлено по умолчанию, это было в рекомендациях по руководству пользователя (Pritchard and Wen, 2000). Использовался продолжительный периода Буррина (Length of Burrin Period) = 10 000 и MCMC 50 000 циклов. С помощью оригинального метода (Pritchard, Falush, 2003) рассчитывалось наиболее вероятное количество кластеров и статистики  $\Delta K$ , приведенной в (Evanno, 2005). Специальная статистика  $\Delta K$  может изменить логарифмическую вероятность данных, между последовательными значениями  $K$ . STRUCTURE четко определяет самый верхний иерархический уровень структуры для протестированных сценариев. Количество возможных кластеров ( $K$ ) проверялось от 1 до 7. Для визуализации результатов была использована веб-программа STRUCTURE Harvester (Earl, 2012).

Далее производилось изучение филогенетического сходства популяций *G. odoratum*, произрастающих в разных частях ареала. Для построения

филогенетических деревьев были использованы 3 маркера: ядерный - ITS (Internal Transcribed Spacer) и два хлоропластных - matK (maturase K) и atpB-rbcL (межгенный спейсер между генами, кодирующими бета-субъединицу АТФ-синтазы и большую субъединицу RuBisCO). Праймеры, используемые для амплификации нужных последовательностей, приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика праймеров, использованных для построения филогенетических деревьев

Маркер	Последовательности праймеров
ITS	<i>ITS-for</i> – 5'-CGT-AAC-AAG-GTT-TCC-GTA-G-3' <i>ITS-rev</i> – 5'-GGA-ATC-CTT-GTA-AGT-TTC-TTT-3'
matK	<i>1R_KIM</i> – 5'-CGT-ACA-GTA-CTT-TTG-TGT-TTA-CGA-G-3', <i>3F_KIM</i> – 5'-CCC-AGT-CCA-TCT-GGA-AAT-CTT-GGT-TC-3'
atpB-rbcL	<i>atpBF</i> – 5'-AGTAGTAGGATTGATTCTCA-3' <i>rbcLR</i> – 5'-CAACACTTGCTTTAGTCTCT-3'

Поиск последовательностей, используемых для построения деревьев, производился в БД Nucleotide NCBI. Выравнивание производилось в программе MAFFT v7.505 (стратегия L-INS-i – быстрое локальное выравнивание всех последовательностей с последующим улучшением). Для фильтрации выравниваний использовалась программа Gblocks v0.91b со стандартными параметрами. Построение деревьев производилось в двух вариантах: для отфильтрованных и нефильтрованных выравниваний в веб-программе IQ-TREE со следующими параметрами: модель нуклеотидных замен – Auto, поддержка ветвей – bootstrap (10000 итераций). Подобранные модели для построения деревьев представлены в таблице 5.

Для сравнения из базы данных GenBank были взяты следующие виды:

1. *Gentiana dahurica* AY225309 (Ji, 2022).
2. *Coffea arabica* GW461909 (Vieira, 2018);

3. *Cephalanthus occidentalis* HQ385114 (Refulio-Rodriguez, 2014);
4. *Leptodermis potaninii* AM117241 (Bremer, 2016);
5. *Rubia cordifolia* KJ697699 (Pei, 2017);
6. *Galium elegans* MK028008 (Ehrendorfer, et.al., 2018);
7. *Galium bungei* MG906430 (Yang, et.al., 2018);
8. *Cruciata laevipes* MK028072 (Ehrendorfe, et.al., 2018);
9. *Galium verum* MG906464 (Yang, et.al., 2018);
10. *Galium dahuricum* MH660061 (Xu, et.al., 2020);
11. *Galium triflorum* MG906472 (Yang, et.al., 2018);
12. *Theligonum cynocrambe* ON960551 (Razafimandimbison, 2022).

В качестве аутгруппы использовался представитель семейства Мареновые *Theligonum cynocrambe*.

Таблица 5 – Подобранные модели нуклеотидных замен

Маркер	Вариант	Модель
ITS	-	TNe+G4
	Gblocks	TIM2e+G4
matK	-	TVM+F+G4
	Gblocks	TVM+F+G4
atpB-rbcL	-	TPM2u+F+G4
	Gblocks	TPM2+F+G4

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Оценка генетического полиморфизма популяций *Galium odoratum* с использованием ISSR-маркеров

Для изучения генетического полиморфизма популяций *Galium odoratum* был использован метод ISSR-PCR. Было изучено 4 популяции реликта, произрастающие в черневых лесах Западного Саяна (Go1, Go2), Горной Шории (Go3) и северо-восточного Алтая (Go4).

Первый этап работы заключался в подборе праймеров для ISSR анализа. Всего было протестировано 7 маркеров, представленных в таблице 6. Для дальнейшего анализа отобрано три праймера (17898A, 17898B, ISSR-23), характеризующихся высоким уровнем полиморфизма и обладающих хорошей воспроизводимостью.

Таблица 6 - Характеристика праймеров, использованных в ISSR-PCR

Название	Последовательность
17898A	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-AC-3' (14)
17898B	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GT-3' (14)
HB11	5'-GTG-TGT-GTG-TGT-CC-3' (14)
ISSR-09	5'-ATG-ATG-ATG-ATG-ATG-ATG-3' (18)
ISSR-17	5'-GAC-AGA-CAG-ACA-GAC-A-3' (16)
ISSR-23	5'-ACA-CAC-ACA-CAC-ACA-CTA-3' (18)

В результате амплификации с тремя праймерами, получен 41 фрагмент ДНК, 87,8% из которых являются полиморфными. Число фрагментов варьировало от 5 (ISSR23) до 17 (17899B). Процент внутривидовой

**Изъято в связи с авторским правом 8 страниц**

## ВЫВОДЫ

1. Уровень генетического разнообразия в популяциях *Galium odoratum* невысок и варьирует от 14,63-до 36,59%. Максимальный уровень изменчивости характерен для алтайской популяции Go4 ( $P=36,59\%$ ,  $Ne=0,1244$  ;  $Io=0,1883$ ), минимальный – для западносаянской низкогорной Go1 ( $P=14,63\%$ ;  $Ne=0,0498$  ;  $Io=0,0758$ ).

2. Анализ генетического сходства популяций подмаренника душистого показал, что, минимальную степень родства с другими популяциями демонстрирует западносаянская низкогорная популяция Go1 ( $D=0,2807-2831$ ). Генетически близки друг другу алтайская Go4 и куздеевская Go3 популяции ( $D = 0,1471$ ).

3. Анализ генетической структуры популяций с использованием программы STRUCTURE показал, что распределяемые генотипы особей максимально можно разделить на четыре генетические кластера  $K=4$  ( $\Delta K = 28,56$ ), соответствующие изученным популяциям. Наиболее гетерогенной является алтайская популяция (Go4). И так как образуются отдельные кластеры, значит - это говорит об относительной изоляции горных популяций и вероятно, имеют гибридогенное происхождение.

4. На филогенетических деревьях, построенных с использованием пластидных маркеров, отмечается объединение образцов из изученных популяций в один кластер. При анализе дерева, построенного на основе анализа ITS-регионов, отмечается отделение образца из алтайской популяции в кластер с *Cruciata glabra*, это может говорить о возможной гибридогенности алтайской популяции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Анненков, Н. Ботанический словарь // Internet Archive. – 1859. – 294 с. – URL: [https://archive.org/details/libgen\\_00053433](https://archive.org/details/libgen_00053433) (дата обращения: 20.04.2023).
2. Баранов, В.И. Этапы развития флоры и растительности в третичном периоде на территории СССР / В.И. Баранов.// Высшая школа. – 1959. – 230 с.
3. Брем, А. Жизнь растений. Новейшая ботаническая энциклопедия/ А. Брем //М.: Эксмо. – 2004. – 692 с.
4. Вдовин, В.В. Рельеф Алтае–Саянской горной области / В.В. Вдовин, Г. А. Чернов, П. А. Окишев, М. В. Петкевич, А. А. Мистрюков, Л. К. Зятькова, Л. С. Миляева // Тр. Ин-та геологии и геофизики им. 60-летия СССР СО АН СССР. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ие. – 1988. – С.40-70.
5. Вульф, Е.В. Понятие о реликте в ботанической географии / Е.В. Вульф // Материалы по истории флоры и растительности СССР. – 1941. – №1. – С.28-60.
6. Горчаковский, П.Л. Эндемичные и реликтовые элементы во флоре Урала и их происхождение / П.Л. Горчаковский // Материалы по истории флоры и растительности СССР. – 1963. – № 4. – С.285–374.
7. Губанов, И. А. Дикорастущие полезные растения СССР / Т. А. Работнов. //М.: Мысль. – 1976. – 360 с.
8. Губанов, И. А. Иллюстрированный определитель растений Средней России // М.: Тво науч. изд. КМК, Инт технолог. иссл.– 2004. – Т. 3. – 253 с.
9. Гудошников, С.В. Место черневой тайги в классификации лесной растительности СССР / С.В. Гудошников //Черневая тайга и проблема реликтов. – Томск: изд-во ТПУ. – 1979. – С. 5–10.

10. Гудошников, С.В. Познание природы черневой тайги на основе анализа ее бриофлоры / С.В. Гудошников // Ботан. журн. – 1978. – Т.63, № 1. – С.11–19.
11. Гудошников, С.В. Флора листостебельных мхов черневого подпояса южных гор Сибири и проблема происхождения черневой тайги / С.В. Гудошников // Томск: изд-во ТГУ. – 1986. – 192 с.
12. Дидух, Я.П. Эколого–ценотические особенности поведения некоторых реликтовых и редких видов в свете теории оттеснения реликтов / Я.П. Дидух // Ботан. журн. – 1988. – Т. 73, № 12. – С.1686–1698.
13. Дорофеев, П.И. Третичные флоры Сибири / П.И. Дорофеев // М.-Л: Изд-во АН СССР. – 1963. – 345 с.
14. Еленевский, А.Г. О понятии «реликт» и реликтомании в географии растений / Еленевский А.Г., Радыгина В.И. // Бюлл. МОИП, отд. биол. – 2002. – Т. 3. – С. 39-48.
15. Ильин, М.М. Реликтовые элементы широколиственных лесов во флоре Сибири и их возможное происхождение / М.М. Ильин // Сов. ботан. – 1938. – № 2. – С. 54–55.
16. Ильин, М.М. Третичные реликтовые элементы в таежной флоре Сибири и их возможное происхождение / М.М. Ильин // Материалы по истории флоры и растительности СССР. – М.-Л., 1941. – Т.1. – С.257–292.
17. Казакова, М. В. К юбилею А. В. Щербакова / М. В. Казакова // Фиторазнообразие Восточной Европы. – 2017. – Т. 11. – №. 2. – С. 139-163.
18. Казакова, М.В. О мнимых реликтах на Среднерусской возвышенности / Казакова М.В., Тихомиров В.Н. // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологии. – 1984. – Т. 89. – №. 5. – С. 102–117.



19. Козырева, Ю. В. К проблеме сохранения реликтовой формации - черневой тайги в бассейне Р. Песчаная (Северный Алтай) / Ю. В. Козырева // Труды Тигирекского заповедника. – 2005. – № 1. – С. 84-86.
20. Степанов, Н.В. Красная книга Красноярского края. В 2 т. Т. 2: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений и грибов / Н.В. Степанов, Е.Б. Андреева, Е.М. Антипова, А.Н. Васильев, М.П. Журбенко, А.И. Ирошников, О.Е. Крючкова, Г.В. Кузнецова, Н.П. Кутафьева, Д.И. Назимова, А.В. Пименов, Е.Б. Поспелова, Ю.А. Ребриев, А.Е. Сонникова, Н.Н. Тупицына, Г.П. Урбанавичюс, В.Э. Федосов, И.П. Филиппова, Д.Н. Шауло, С.С. Щербина, И.Е. Ямских; Отв. ред. Н.В. Степанов; 2- изд., перераб. и доп.; Сибирский фед. ун-т. – Красноярск, 2012. – 576 с.: 499 ил.
21. Крылов, Г.В. Основные этапы истории формирования лесной растительности в Западной Сибири / Г.В. Крылов // Тез. докл. Делегатского съезда Всесоюзного Ботанического общества. – 1957. – № 3. – С.27–30.
22. Куминова, А.В. Дробное геоботаническое районирование части Алтае–Саянской геоботанической области (правобережье Енисея) / А.В.Куминова // Растительность правобережья Енисея. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ие. – 1971. – С.67–135.
23. Куминова А. В. Основные итоги изучения растительного покрова правобережья Енисея / А.В. Куминова //Растительность правобережья Енисея южной части Красноярского края. – Новосибирск: Наука. – 1971. – С. 2-12.
24. Куминова, А.В. Растительный покров Алтая / А.В. Куминова // Новосибирск: Изд-во АН СССР. –1960. – 450 с.
25. Куминова, А.В. Характерные черты Алтае-Саянской геоботанической области / А.В. Куминова // Изв. Томск. отд. ВБО. – 1973. – Т.6. – С.23–34.
26. Куцев, М. Г. Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR / М. Г. Куцев. // Барнаул: Artika. – 2009. –163 с.

27. Лавренов, В.К. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины / В.К. Лавренов., Г.В. Лавренова // Санкт-Петербург, Издательский дом «Нева». – 2003. – 179 с.
28. Лацинский, Н.Н. Природные условия Салаирского кряжа / Н.Н. Лацинский, М.П. Ревякина // Экология сообществ черневых лесов Салаира. – Новосибирск: Наука. – 1991. – С.6–13.
29. Линчевский, И. А. Сем. СLІ. Мареновые — Rubiaceae /И. А. Линчевский, Е. Г. Победимова, М. В. Клоков, А. И. Пояркова, Б. К. Шишкин // Флора СССР : в 30 т. — М.,Л. : Изд-во АН СССР. — Т. 23 / ред. тома Б. К. Шишкин. – 1958. – С. 164—419.
30. Липшиц, С.Ю. Некоторые мысли о реликтах / С.Ю. Липшиц // Проблемы экологии, геоботаники, ботанической географии и флорогенетики. Л.: Наука. – 1977. – С. 119-124.
31. Лубягина, Н.П. Интродукция неморальных реликтов черневой тайги Кузнецкого Алатау в искусственно создаваемый фитоценоз / Н.П. Лубягина // Охрана растительного мира Сибири. – Новосибирск: Сиб. отд-ие. – 1981. – С.160-166.
32. Назимова, Д. И. Реликты неморальной флоры в лесах Западного Саяна / Д. И. Назимова // Лесоведение. – 1967. – № 3. – С. 76-88.
33. Огуреева, Г.Н. Структура высотной поясности растительности гор Южной Сибири / Г.Н. Огуреева // Бюл.МОИП, отд.биол. – 1983. – Т.58, № 1. – С.66-77.
34. Пешкова, Г. А. Растительность Сибири: (Предбайкалье и Забайкалье) / Г. А. Пешкова // Новосибирск: Наука: Сиб. отд-ние. –1985. – 145 с.
35. Положий, А. В. Географический анализ флоры черневой тайги Кузнецкого Алатау / А. В. Положий, Э.Д. Крапивкина. // Известия Сибирского отделения АН СССР. Сер. биол. наук. – 1971. – № 5. – С. 21-30.

36. Положий А. В. Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири / А. В. Положий, Э. Д. Крапивкина; Том. гос. ун-т им. В. В. Куйбышева. - Томск: Издательство Томского университета, 1985. – URL: <http://vital.lib.tsu.ru/vital/access/manager/Repository/vtls:000067671> (дата обращения: 24.03.2023).
37. Равкин, Ю. С. Птицы Северо-Восточного Алтая (распределение, численность, структура и динамика населения) / Ю. С. Равкин. – 1973. – С. 409-420.
38. Ревердатто, Л.Ф. Очерк растительности юго-восточной части Томской губернии / Л.Ф. Ревердатто // Изв. Том. ун-та. – 1924. – Т.74. – С.133–143.
39. Смирнова, О. В. Структура травяного покрова широколиственных лесов / О. В. Смирнова; отв. ред. Б. Н. Головкин // АН СССР, Моск. о-во испытателей природы. – Москва: Наука. – 1987. – 205 с.
40. Станков, С.С. Наши лекарственные растения /Н.В Ковалевский, С.С. Станков // Горьковское областное государственное из-во. – 1952. – 244 с.
41. Степанов, Н. В. Сосудистые растения Приенисейских Саян: монография / Н. В. Степанов // Красноярск: Сиб. федер. ун-т. – 2016. – 252 с.
42. Телятьев, В.В. Целебные клады Восточной Сибири / Б.А. Юрцев, В.В. Телятьев // Восточно-Сибирское книжное издательство. – 1976. – 235 с.
43. Толмачев, А.И. К истории возникновения и развития темнохвойной тайги / А.И. Толмачев // М.; Л.: Изд-во АН СССР. – 1954. –155 с.
44. Трофимов, С. С. Горно-таежные глубокоподзоленные непромерзающие почвы Горной Шории / С. А. Таранов, С. С. Трофимов // Лес и почва. – 1968. – С. 107-120.

45. Тутаюк, В.Х. Анатомия и морфология растений / В.Х. Тутаюк. – М. – 1980. – 241 с. – URL: <https://reallib.org/reader?file=546015> (дата обращения: 24.03.2023).
46. Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений //Барнаул: АзБука. – 2007. – С. 64.
47. Черепнин, Л. М. Особенности флоры юга Красноярского края / Л. М. Черепнин // Ученые записки Краснояр. пед. ин-та. – 1957. – Т. 10. – С. 3-11.
48. Шауло, Д. Н. Флора Западного саяна /Д. Н. Шауло// Turczaninowia. – 2006. – №1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/flora-zapadnogo-sayana> (дата обращения: 22.04.2023).
49. Юрцев, Б.А. Популяции растений как объект геоботаники, флористики, ботанической географии / Б.А. Юрцев // Ботан. журн. – 1987. – Т.72, №5. – С.581–588.
50. Яковлев, Г. П. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений / под ред. Г.П. Яковлева. – 3-е изд., испр. И доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 759 с. – ISBN: 978-5-299-00528-8
51. Khalik, K. Genetic diversity and relationships among Egyptian Galium (Rubiaceae) and related species using ISSR and RAPD markers/ Abdel, K. Khalik, M.Abd El-Twab, R. Galal //Biologia. – 2014. – № 69. – P. 300–310.
52. Earl, D. A., STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method/ D.A. Earl, B. M. VonHoldt //Conservation genetics resources. – 2012. – Iss. 4. – P. 359-361.

53. Ehrendorfer, F., cpDNA intergene sequences corroborate restriction site data for reconstructing Rubiaceae phylogeny / F. Ehrendorfer, J.F. Manen, A. Natali // *Pl Syst Evol.* – 1994. – №190. – P. 245–248.
54. Evanno, G., Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G.Evanno, S.Regnaud, J.Goudet // *Molecular ecology.* – 2005. – Iss. 14. – №. 8. – P. 2611-2620.
55. Falush, D., Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies / D. Falush, M. Stephens, J. K. Pritchard // *Genetics.* – 2003. – №. 4. – P. 1567-1587.
56. Natali, A. Phylogeny of the Rubiaceae-Rubioideae, in Particular the Tribe Rubieae: Evidence from a Non-Coding Chloroplast DNA Sequence / A. Natali, J. F. Manen, F.Ehrendorfer // *Annals of the Missouri Botanical Garden.* – 1995. – №3. – P. 428–39.
57. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics.* – 2000. – №. 2. – P. 945-959.
58. Schröter, C. Handwörterbuch der Naturwiss / C. Schröter // *Genetische Pflanzengeographie.* In: *Handwörterbuch der Naturwiss.* – 1934. – Iss. 4. – P. 1002-1044.
59. Schröter, C. Genetische Pflanzengeographie / C. Schröter // *Handwörterbuch der Naturwiss.* – 1913. – P. 907-942.
60. Ziegenhagen, B. Spatial patterns of maternal lineages and clones of *Galium odoratum* in a large ancient woodland: inferences about seedling recruitment / R. Bialozyt, V. Kuhlenkamp, I. Schulze, A. Ulrich, M. Wulf // *Journal of Ecology.* – 2003. – P. 578-586.

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



подпись

И.Е. Ямских

инициалы,  
фамилия

«23» июня 2023 г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СИБИРСКИХ  
ПОПУЛЯЦИЙ GALIUM ODORATUM (RUBIACEAE)

06.04.01 «Биология»

06.04.01.06 «Геномика и биоинформатика»

Руководитель



подпись, дата

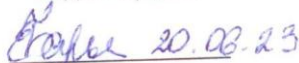
зав. кафедрой, д.б.н.

должность, ученая степень

И.Е. Ямских

инициалы, фамилия

Выпускник

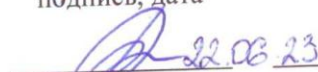


подпись, дата

Д.Е. Барина

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

с.н.с., к.б.н.

должность, ученая степень

И.В. Тихонова

инициалы, фамилия