

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

«Морфологическая, генетическая изменчивость и филогения видов р. *Trollius*
(*Ranunculaceae*) в Красноярском крае и Хакасии»

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	_____		И.Р. Путилин
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____		И.В. Тихонова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2023

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Морфологическая, генетическая изменчивость и филогения видов р. *Trollius* (Ranunculaceae) в Красноярском крае и Хакасии» содержит 75 страниц текстового документа, 4 приложения, 88 использованных источников, 17 рисунков и 7 таблиц.

Ключевые слова: *TROLLIUS*, МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ МОРФОМЕТРИЯ, ISSR-PCR, ФИЛОГЕНИЯ, ИЗМЕНЧИВОСТЬ.

Объекты исследования – 7 популяций видов рода *Trollius* L. (2 – *Trollius vitalii*, 2 – *Trollius asiaticus*, 1 – *Trollius kolonok*, 1 – *Trollius austrosibiricus*, 1 – *Trollius kytmanovii*), произрастающих в пределах южной и центральной территорий Красноярского края и Республики Хакасия.

Цель работы - морфологический, популяционно-генетический и филогенетический анализы популяций видов р. *Trollius*, произрастающих на территории Красноярского края и Республики Хакасия.

В результате работы были проведены классический морфометрический анализ, GMM-анализ, популяционно-генетический и филогенетический анализы. Классическая морфометрия показала достоверное отделение вида *T. kolonok* от всех остальных, однако в пространстве синтетических координат наблюдается лишь тенденция к отделению. GMM-анализ показал статистически достоверное разделение форм листовых пластинок на 3 группы: 1 – *T. kolonok*, 2 – *T. vitalii* и 3 – *T. asiaticus*, *T. austrosibiricus* и *T. kytmanovii*. Анализ популяционно-генетической структуры не выявил достоверной разницы между исследуемыми популяциями. Филогенетический анализ продемонстрировал обособленность видов относительно друг друга, однако не выявил стабильной картины филогенетических взаимоотношений между исследуемыми видами.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Общая характеристика и видовое разнообразие рода <i>Trollius</i> L.....	7
1.2 Характеристика методов морфологических исследований	14
1.2.1 Классическая морфометрия	14
1.2.2 Геометрическая морфометрия	14
1.3 Молекулярные-генетические методы в исследовании растений	15
1.3.1 Генетический полиморфизм	15
1.3.2 Изучение филогенетических взаимоотношений	17
ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1 Районы исследования.....	21
2.2 Объекты исследования	24
2.3 Методика исследования	26
2.3.1 Классическая морфометрия	26
2.3.2 Геометрическая морфометрия	29
2.3.3 Анализ генетического полиморфизма популяций.....	30
2.3.4 Филогенетический анализ	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1 Классическая морфометрия популяций видов рода <i>Trollius</i>	35
3.2 Геометрическая морфометрия листовых пластинок растений рода <i>Trollius</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Генетический полиморфизм популяций рода <i>Trollius</i>	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Филогенетический анализ видов рода <i>Trollius</i>	Ошибка! Закладка не определена.

ВЫВОДЫ.....	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ А	47
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	53
ПРИЛОЖЕНИЕ В	54
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	58

ВВЕДЕНИЕ

Процесс изучения популяций растений не только вносит вклад в фундаментальную ботанику, но также имеет и практическую направленность – изучение предпосылок и механизмов для устойчивого существования популяций различных видов растений в естественных фитоценозах. Особенно это актуально для популяций редких и исчезающих видов растений (эндемиков, реликтов и т.д.). Данная проблема особенно важна для растений с не до конца ясными видовыми границами, обусловленными высокой экологической пластичностью.

Чёткая видовая идентификация растений имеет высокую практическую значимость. Разные виды растений могут иметь различные особенности биохимии и видоспецифические вещества, которые могут быть использованы для нужд медицины, в том числе и традиционной. На основании знаний об экологии и морфологии видов можно делать выводы об их видовой принадлежности. Но этого не всегда достаточно. Например, представители р. *Trollius* отличаются высокой степенью морфологической изменчивости, что затрудняет ревизию данного рода. Для решения данной проблемы используются более сложные подходы для анализа морфологической изменчивости, а также молекулярно-генетические методы исследований.

Новизна работы заключается в том, что нами впервые проведены исследования морфологической, генетической изменчивости популяций сибирских видов жарков. Нами впервые проведён GMM-анализ вегетативных органов (прикорневых листьев) растений рода *Trollius*. Впервые определены нуклеотидные последовательности пластидных межгенных спейсеров исследуемых видов.

Цель работы: морфологический, популяционно-генетический и филогенетический анализы популяций видов р. *Trollius*, произрастающих на территории Красноярского края и Республики Хакассия.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести классический морфометрический анализ листовых пластинок популяций видов рода *Trollius*;
2. Провести GMM-анализ листовых пластинок популяций изучаемых видов;
3. Изучить генетический полиморфизм популяций видов с использованием ISSR-маркеров (HB12, HB14, ISSR-17);
4. Выяснить филогенетические взаимоотношения некоторых видов с использованием пластидных межгенных спейсеров (atpB-rbcL, psbA-trnH, trnL-trnF).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика и видовое разнообразие рода *Trollius* L

Купальницы (*Trollius* L.) – род многолетних травянистых растений семейства Лютиковые (*Ranunculaceae* L.), насчитывающий от 30 до 35 видов [1, 2, 3], распространённых голарктически (преимущественно, в палеарктике). Наибольшее видовое разнообразие представлено в восточно-азиатской флористической области [4]. На территории России выделяется около 20 видов [5], из которых около 12 произрастает на территории Сибири [6].

Для представителей данного рода характерен двойной, венчиковидный околоцветник (цветок от 20 до 50 мм в диаметре), с 5 – 20 или более оранжевыми или жёлтыми лепестками-нектарниками и чашелистиками. Чашелистики от яйцевидных до почти округлых. Лепестки узкие, линейные, расширенные у основания. Тычинки и пестики многочисленные, на выпуклом цветоложе. Плоды состоят из значительного количества более-менее сросшихся при основании листовок, раскрывающихся вдоль внутреннего шва. Семена чёрные, блестящие, овальные. Растения 20 – 80 см высотой с прямостоячим стеблем и мочковатыми корнями. Листорасположение – очередное. Прикорневые листья с длинными черешками и пальчато-разделёнными пластинами, из которых верхние – почти сидячие. Полный онтогенез составляет около 50 лет [7, 8, 9].

Единственный полномасштабный обзор рода представлен в монографии А. Дорожевски [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**], в которой она разделяет виды на 7 секций в соответствии с их морфологическими характеристиками:

1. Sect. *Longipetala* – лепестки-нектарники от 7 до 40 мм в длину, удлинённо-узкие; пластинка плоская, тонкая, не утолщённая и мясистая, похожа на чашелистики, в основном того же оранжевого цвета (за исключением *Trollius sibiricus* Schipcz.);

2. Sect. *Pumilotrollius* – растения 5-30 см в высоту, диаметр цветка 2-4 см; лепестки-нектарники 2-7 мм в длину; стебли обычно с одним цветком и без листьев; если листья есть, то они глубоко рассечены;
3. Sect. *Yunnanotrollius* – растения 30-80 см в высоту, диаметр цветка 3-7 см; нектарники 6-4 мм в длину с бороздкой; побеги в основном ветвистые и облиственные, листовая пластинка довольно толстая, трехлопастная, с целыми неразрезанными сегментами;
4. Sect. *Laxotrollius* – распространены в неарктическом царстве;
5. Sect. *Acaulitrollius* – цветки белые, светлосерые или светло-сереневые; если жёлтые, то при плодах имеется клюв 7-8 мм длиной;
6. Sect. *Insulaetrollius* – растения, произрастающие в пределах региона Охотск-Япония-Камчатка; нектарники 2-12 мм в длину, линейные, расширенные или грушевидной формы, лопасти часто расширены при основании и имеют желобок;
7. Sect. *Trollius* – растения из других регионов Азии, Европы и Кавказа; нектарники 6-14 мм длиной, лопасти никогда не расширены при основании.

В той же монографии А. Дорожевска указывает на высокую степень полиморфизма купальниц, обусловленную экологической адаптацией, что затрудняет разделение видов на секции. К тому же, определение видов рода *Trollius* затрудняется тем, что для наиболее точной видовой идентификации необходимо иметь цветки и зрелые плоды [9].

Растения рода *Trollius* являются лекарственными, т.к. содержат С-гликозиды (часто являются «сердечными» гликозидами), проглобофлоровую кислоту, ориентин, витексин (обладают противовирусными, антибактериальными и антиоксидантными свойствами), и другие вещества [10, 11, 12, 13, 14].

Приведём характеристику изучаемых нами видов. Все они относятся к секции *Longipetala*.

***Trollius asiaticus* L. (купальница азиатская).** Растения, по разным источникам, от (10) 40 до 50 (80 см) в высоту с прямыми, простыми или ветвистыми цветоносами, при основании одетыми прошлогодними листьями. Имеется один или несколько цветков около 5 см в диаметре. Чашелистики в количестве 10-20 шт, оранжево-красные, от широкоэллиптических до обратнойцевидных. Нектарники узко-обратноланцетовидные, на конце заострённые, оранжево-красные, в 2-3 раза длиннее тычинок и равны чашелистикам. Плод – многолистовка; каждая листовка 10-11 мм в длину с носиком от 0,5 до 1 мм, загнутым внутрь. Прикорневые листья с длинными черешками, стеблевые от черешковых (нижних) до сидячих (верхних). Листовая пластинка пальчато-рассечённая, сегменты в количестве 5 шт ромбовидные. Произрастает в влажных местах на субальпийских и альпийских лугах, в светлых лесах. Ареал ограничен северным Китаем, Казахстаном, Монголией, а также Сибирью и Уралом [8, 15, 16,]. Вегетация растения длится около 4 месяцев – с конца мая до середины сентября. Рост надземных побегов происходит довольно быстро: длина прикорневых листьев достигает 11-14 см в мае за первые 5-7 дней вегетации и до 25 см в июне [17, 18].

***Trollius vitalii* Stepanov (купальница Виталия).** Растения от 25 до 70 см в высоту с простыми или ветвистыми цветоносами. Имеется один или два цветка 4-5 см в диаметре. Чашелистики в количестве 16-25 шт, ярко-оранжевые, снаружи красноватые (в гербарии желтеющие), яйцевидно-эллиптические, вверху зубчатые, 2-3 см длиной и 1,5-3 см шириной. Нектарники линейные на конце заострённые, 15-20 мм длиной, 1-1,5 мм шириной, почти равные или в 1,5 раза короче чашелистиков и в 2 раза длиннее тычинок. Завязи искривлённые 3-3,5 мм. Столбик по длине равен завязи. Плод – многолистовка, каждая листовка 1-1,5 см в длину с носиком 3-5 мм, отогнутым в сторону от оси листовки на 30-90°. Листья в основании стебля чешуевидные. Прикорневые листья (в числе 1-4 шт) с более-менее

длинными черешками (до 1/2 стебля), верхние листья сидячие. Листовая пластинка пальчато-раздельная, каждый из 5 сегментов ромбический, глубоко-надрезанный (до 5/6). Произрастает на субальпийских лугах, также по берегам рек, озёр, ключам и верховым болотам. Ареал ограничен Западным Саяном [3919]. Вид считается уязвимым, и его численность сокращается вследствие влияния антропогенного фактора – строительства дорог, туристических зон отдыха и сбора растения для букетов [19].

Н.В. Степанов, описывая *T. vitalii* Stepanov – купальницу Виталия, выводит родство от восточносибирского *T. bargusinensis* Sipl. [17], однако ранее Н.В. Фризен в монографической обработке рода *Trollius* для Флоры Сибири не отделяет *T. bargusinenses* от *T. asiaticus* [8]. Так же Д.Н. Шауло говорит о том, что в принципе имеющиеся данные о флоре высокогорий Западного Саяна не позволяют выделить имеющиеся таксоны в роде *Trollius* в ранг видов [20]. В своём исследовании Л.В. Буглова указывает на то, что *T. vitalii* Stepanov. не выделяется в отдельных вид, указывая на морфологическую неоднородность собранных образцов, на основании которых данные организмы были выделены в отдельный вид. Так же указывается, что ряд образцов находится в пределах изменчивости *T. asiaticus* L. В этой же работе результаты генетических исследований указывают на то, что генетически эти два вида настолько близки, что разделять их на два родственных вида нет никаких оснований, однако работа вызывает ряд вопросов [21].

***Trollius kolonok* Stepanov (купальница колонковая).** Растения от 60 до 100 (130) см в высоту с простыми или разветвлёнными выше середины цветоносами. Цветок 5-9 см в диаметре. Чашелистики в количестве 10-18 шт, тёмно-оранжевые, широко обратнойцевидные или яйцевидные, 3,4-4 см длиной и 2-2,3 см шириной, с цельными или неправильно зубчатыми краями в верхней части. Нектарники лопатчато-линейно-ланцетовидные, 25-30 мм длиной и 4-5 мм шириной, длиннее тычинок, но короче чашелистиков. Завязи прямые, со стилодиями 3-4 мм длиной. Стеблевые листья похожи на

прикорневые, короткочерешковые или сидячие. Прикорневые листья с черешками 40-70 см. Листовая пластинка пятиугольная, до 16-26 см в диаметре, центральный сегмент ромбический, 3-раздельный, по краю надрезанно-зубчатый; боковые сегменты косовоееровидные. Произрастает в субальпийских разнотравных лугах, по заболоченным долинам и среди редколесий. Может быть доминантом в травостое субальпийских лужаек. Ареал изучен слабо, однако известна популяция в пределах восточных отрогов Кузнецкого Алатау, окр. пгт. Коммунар [22].

***Trollius austrosibiricus* Erst & Lufarov (купальница южно-сибирская).** Растения от 20 до 70 см в высоту с прямыми, простыми или редко слаборазветвлёнными стеблями. 1-2 цветка диаметром 3,5-5,5 см. Чашелистики в количестве 8-14 шт, красно-оранжевые или жёлто-оранжевые, ромбовидные или широко-эллиптические, 1,3-2,4 см длиной и 0,8-1,5 см шириной. Нектарники в количестве 9-18 шт, широко-ланцетовидные, слегка расширяющиеся в середине, оранжевые или красно-оранжевые, 2-2,8 см длиной и 0,2-0,3 см шириной. Завязи 10-15 мм в длину, с 1,5-3,0 миллиметровыми слегка загнутыми стилодиями. Прикорневые листья 2-7 шт, листовые пластинки до 8 см в диаметре с 3-7 ромбовидными сегментами. Растения произрастают в субальпийских и лесных зонах на влажных лугах. Ареал ограничен горными регионами Южной и Центральной Сибири [23].

***Trollius kytmanovii* Reverd. (купальница Кытманова).** Растения от 20 до 60 см в высоту с простыми или в верхней части ветвистыми стеблями. Цветки 1-2 шт, 3-5 см в диаметре. Нектарники 10-20 мм в длину, в 1,5-2 раза длиннее тычинок, но заметно короче чашелистиков, линейные или слегка расширенные в верхней части. Листовки 6-8 мм в длину с прямыми или слегка изогнутыми носиками (1,2-2 мм в длину). Прикорневые листья на черешках, пластинки в очертании 5-угольные, до основания рассечённые на 5 широкоромбических сегментов, до половины или глубже разрезанные на доли [24]. Предпочитает расти по сырым лугам, лесным полянам и в лесах.

Ареал ограничен Восточной Сибирью, однако популяция, анализируемая в данной работе, собрана в пределах восточной границы Западной Сибири.

В работах, посвящённых изучению морфологии купальниц, часто встречается попытка разделить виды между собой, используя соотношения различных морфологических характеристик, например: соотношение количества чашелистиков к лепесткам [25], соотношение длины нектарников к длине тычинок [26, 23] и т.д., однако, подобные работы отличаются следующими особенностями: либо отсутствует статистическая обработка данных как таковая, либо статистическая обработка присутствует, но она представлена только классической описательной статистикой (среднее, стандартное отклонение, дисперсия). Также, довольно часто для анализа видов используются признаки, связанные с цветком и практически не рассматриваются остальные части растения: листья, корни и т.д. Данное явление может быть связано с «гипнозом цветка» [27].

У ряда исследователей есть вопросы, связанные с морфологическими и генетическими особенностями некоторых описанных видов, в частности с *T. vitalii*. Так, Д.Н. Шауло [20], считает, что размеры цветка, параметры нектарников, степень рассеченность листовой пластинки у *T. vitalii* вполне укладываются «в рамки вида» *T. asiaticus* L. При этом автором ничего не было сказано о других важных признаках *T. vitalii*, упомянутых в протологе: изогнутые завязи и длинные (3-3,5 мм) носики листовок (стилодии). «Рамки вида» *T. asiaticus* в части, касающейся именно этих особенностей и обозначенные позже [23] указывают, что длина стилодия у купальницы азиатской составляет всё же 0,5-1 мм (рис. 1). Получается противоречивая ситуация, когда одни и те же авторы включают в состав *T. asiaticus* вид, который не соответствует его «рамкам».

В работе М.М. Серебряного [28] *T. vitalii* относится к синонимам *Trollius chinensis* Bunge. на основании сходства некоторых признаков. Еще в одной работе, посвященной генетическому анализу купальниц с использованием ISSR-маркеров, Л.В. Буглова и Н.С. Нуждина [21]

затрагивают таксономический статус *T. vitalii*. По мнению данных авторов *T. vitalii* полностью вписывается в рамки *T. asiaticus*, что на наш взгляд не совсем соответствует приведенным ими же данным: три образца *T. vitalii* в результате анализа генетического полиморфизма оказались настолько неодинаковы, что попали в группы сходств с разными видами (*T. asiaticus*, *T. altaicus*, *T. sibiricus*). Всё это указывает на слишком неоднозначную ситуацию в понимании статуса отдельных видов и необходимости их более детального исследования. Спорным является также утверждение авторов, что купальница Виталия является гибридом *T. asiaticus* × *T. sajanensis*, при том, что один из родительских видов не отмечен в ближайшем окружении. Таким образом, в настоящее время нет убедительного таксономического решения о статусе *T. vitalii*.



Рисунок 1 – Внешний вид краевых завязей в цветках (пик – конец цветения) различных представителей рода *Trollius*. 1-2 – *T. altaicus* (короткий, относительно широкий пигментированный носик), 3 – *T. vitalii* (длинный

носик, отогнутый внутрь), 4 – *T. kolonok* (длинный носик, отогнутый наружу), 5-7 – *T. asiaticus* (короткий носик).

1.2 Характеристика методов морфологических исследований

1.2.1 Классическая морфометрия

Самой распространённой тактикой анализа морфологии растений является использование методов описательной статистики, чего, однако, совсем недостаточно. Также, с целью сокращения размерности данных и выявления наиболее сильно влияющих на распределение данных переменных (морфологических измерений) используется метод главных компонент (PCA). В основном все вычисления производятся в Microsoft Excel или PAST [29], однако существует ряд «пакетов», используемых в среде языка программирования R [30], который в свою очередь был разработан для статистического анализа данных и визуализации полученных результатов. В частности, один из таких пакетов – MorphoTools2 [31]. С помощью данного пакета можно произвести анализ данных с использованием описательной статистики, выполнить различные методы сокращения размерности данных и т.д., однако функционал данного пакета подходит скорее начинающим (специфический формат таблиц, невозможность их редактирования в ходе работы), что не мешает исследователям пользоваться им. Из-за этого складывается ситуация, что публикаций по анализу морфологической изменчивости довольно много, однако не все они демонстрируют высокий уровень статистической обработки данных и достаточную глубину анализа полученных результатов.

1.2.2 Геометрическая морфометрия

Геометрическая морфометрия (GMM) – это метод, используемый в биологии для анализа и количественного измерения формы и размеров биологических структур, где измеряемыми переменными являются не длина черешка, диаметр цветка, например,, а форма. Этот метод включает

использование цифровых изображений или определённых точек на структурах для определения информации о форме и размерах. Затем, используются математические методы для анализа этой информации, что позволяет сравнивать форму и размеры структур между разными видами (популяциями) [32]. Самыми популярными средами для реализации GMM-анализа являются пакет для R «geomorph» [33] и программа «MorphoJ» [34], функционал которых похож: проведение Прокрустова преобразования (для соотнесения точек разных образцов между собой) и дальнейший статистический анализ – PCA, CVA (Canonical Variable Analysis) и т.д.

1.3 Молекулярные-генетические методы в исследовании растений

Традиционно, молекулярно-генетические методы изучения биологического объектов, в том числе и растений, можно разделить на следующие категории:

1. Основанные на анализе нуклеиновых кислот (НК);
 - a. С использованием анонимных последовательностей (внутрипопуляционный, межпопуляционный полиморфизм);
 - b. С использованием известных последовательностей (популяционная геномика, филогения и т.д.).
2. Основанные на анализе других молекул (белков, липидов и т.д.).

Зачастую, исследователи фокусируются на изучении именно нуклеотидных последовательностей, т.к. работа с НК менее трудозатратна и более репрезентативна. В довесок, тестировать генетический полиморфизм не на уровне экспрессии гена, а на геномном уровне гораздо более правильный подход, чтобы исключить фактор изменчивости [35].

1.3.1 Генетический полиморфизм

Методы изучения генетического полиморфизма можно разделить на две группы: полногеномные и фрагментные. Фрагментный анализ ДНК – амплификация ДНК с использованием специфических праймеров,

комплементарных определённым участкам генома с последующим разделением продуктов в электрическом поле (с помощью электрофореза).

Выделяют следующие методы фрагментного анализа:

1. Микросателлитный (SSR, или STR) [36] и межмикросателлитный (ISSR) анализы [37];
2. Исследование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) [38];
3. ДНК-фингерпринтинг (AFLP, RAPD, RFLP и т.д.) [39] и др.

Микросателлитный и межмикросателлитный анализы связаны между собой: в геномах организмов присутствуют короткие tandemные повторы – микросателлиты, и если в случае SSR-анализа исследуется длина этих повторов путём амплификации этих участков (требуется знания последовательностей, находящихся между повторами, следовательно, требуется предварительное секвенирование, зачастую, полногеномное) и последующего электрофореза, то в случае ISSR достаточно использовать практически любой праймер, комплементарный этому повтору – исследуются участки между повторами (не требует знания последовательности, т.к. тандемы зачастую похожи в разных группах организмов, к тому же, каждый праймер подбирается эмпирически) (рис. 2).

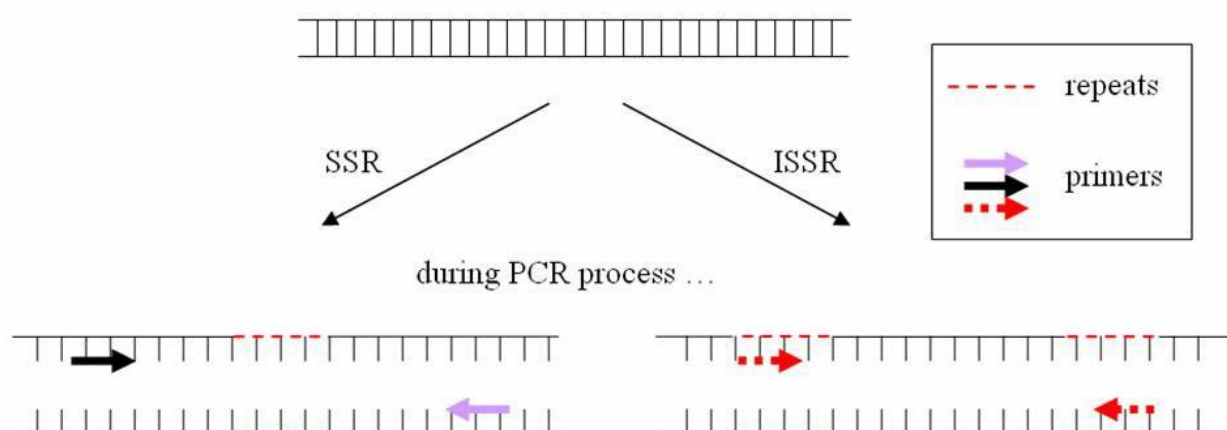


Рисунок 2 – Общая схема реализации методов SSR и ISSR

Де-факто, SSR и ISSR относятся к методам ДНК-фингерпринтинга, однако их обособленность и взаимосвязь друг с другом позволяют их выделить в отдельную группу методов.

SSR-маркеры являются кодоминантными (в отличие от ISSR-маркеров, которые являются доминантными), что позволяет изучать различные характеристики популяций, связанных с гетерозиготностью, соответствие модели Харди-Вайнберга и т.д. В свою очередь ISSR-маркеры, дающие большее количество бэндов, позволяют детальнее изучать внутри- и межпопуляционный полиморфизм.

Однонуклеотидные полиморфизмы («снипы») довольно сильно распространены в геномах и по разным оценкам встречаются в одном из 1000 случаев в геномах живых организмов. Расположение снипа может иметь фенотипические последствия, в зависимости от типа мутации. Есть разные подходы к изучению снипов: методы, основанные на гибридизации (например, SNP-микрочипы), методы, основанные на специфическом взаимодействии фермента и НК (например, SNP-RFLP) и другие методы (например, гель-электрофорез в температурном градиенте), однако суть сводится к обнаружению однонуклеотидной замены и анализу встречаемости этой замены в группе организмов.

Методы ДНК-фингерпринтинга основаны на реакции ПЦР, однако от метода к методу слегка меняется реализация: RAPD – праймер подбирается случайным образом; AFLP – предварительно геномная ДНК обрабатывается специфическими рестриктазами, к ней лигируются адаптеры с липкими концами, комплементарными концам рестрицированных фрагментов, и затем проводится амплификация с праймерами, комплементарными к адаптерам; RFLP – то же, что AFLP, однако не проводится селективная амплификация полученных продуктов реакции.

1.3.2 Изучение филогенетических взаимоотношений

Филогения, в общем и целом, полностью строится на знании последовательности того или иного гена, межгенного спейсера или всего генома. Результат филогенетического исследования целиком зависит от того, какие методы были использованы на разных этапах обработки «сырых» данных – секвенированных последовательностей.

Первым этапом филогенетического анализа является выравнивание последовательностей между собой. Выравнивание можно разделить на следующие виды:

- **Попарное:**

- Глобальное (*Global*) – метод выравнивания двух последовательностей на всю их длину, максимизирующий совпадения и минимизирующий пропуски [40];

- Полуглобальное (*Semi-global, glocal*) – метод выравнивания двух последовательностей на всю их длину, но с разрешением пропусков в начале или конце одной из последовательностей [41];

- Локальное (*Local*) – метод выравнивания двух последовательностей путём определения областей с высокой схожестью [42].

- **Множественное:**

- CLUSTAL [43] – метод множественного выравнивания последовательностей, работающий по принципу постепенного выравнивания последовательностей путём попарного выравнивания и последующего формирования общей матрицы. Изначально был разработан для выравнивания белковых последовательностей, однако и с нуклеиновыми последовательностями тоже способен функционировать;

- MUSCLE [44] – метод множественного выравнивания последовательностей, функционирующий путём создания профилей скрытых Марковских моделей для каждой последовательности и последующего выравнивания этих профилей;

- MAFFT [45] – метод множественного выравнивания последовательностей, использующий алгоритм быстрого преобразования Фурье. Он работает путём разбиения последовательностей на блоки и выравнивания их.

Следующий этап опциональный – фильтрация выравниваний. Фильтрация представляет собой удаление определённых участков выравниваний, которые по разным соображениям, могут повлиять на построение филогенетического дерева. Реализуется зачастую с помощью алгоритмов Gblocks [46]. Существует два диаметрально противоположных мнения по поводу фильтрации выравниваний. При фильтрации может быть отброшена часть информативных данных (например, инделы). Кроме того, фильтрация не всегда приводит к выводам, близким к действительности. Также, вне зависимости от выбора алгоритма выравнивания существует вероятность ошибки, в результате которой не выровненные участки будут вырезаны [47]. С другой стороны, филогенетические деревья, полученные из отфильтрованных выравниваний, получаются обычно более биологически обоснованными. К тому же, фильтруя данные, происходит изменение их размерности, что упрощает анализ, уменьшая общую дисперсию и вероятность ошибки.

Следующим важным этапом для построения филогенетических деревьев является выбор модели нуклеотидных замен. Существует великое множество моделей замен, таких как Jukes-Cantor, Kumura-89, Tamura-Nei, GTR и т.д. и все они отличаются разным количеством параметров и их значениями. Например, простейшая модель Jukes-Cantor предписывает одинаковые частоты встречаемости нуклеотидов в геноме ($=1$) и одинаковые вероятности мутаций этих нуклеотидов [49], в то время как наиболее «сложная» модель GTR (General Time Reversible) учитывает разные частоты встречаемости нуклеотидов и разные вероятности мутаций нуклеотидов [50]. Также, в каждую из моделей дополнительно можно ввести такие параметры,

как I – доля неизменяемых сайтов в выравнивании и G – присутствие гамма-распределения скоростей замены в сайтах.

Финальный этап – построение дерева – также является не самой тривиальной задачей. Для реконструкции филогении необходимо определиться, какой из методов использовать. Существует две основных группы методов – *методы расстояний* (характеризуют последовательность, как точку в системе координат, и затем находят расстояние между координатами: UPGMA, NJ, LS, ME и т.д.) и *дискретные методы* (используют максимум информации о последовательности – состав, длина и т.д.: MP, MR, MB и т.д.). Дискретные методы в свою очередь используют методы расстояний для построения инициального дерева, которое в результате большого количества итераций будет уточняться. Наиболее часто в литературе используются именно дискретные методы, в частности, ML (Maximum-Likelihood) и MB (Байесовский метод), а впоследствии результаты сравнивают. Наименее биологически оправданным является MP (Maximum Parsimony), т.к. исходит из того, что мутации в последовательностях эволюционно невыгодны.

ГЛАВА 2. РАЙОНЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Районы исследования

Исследования проводились в пределах Красноярского края и Республики Хакасия. Большая часть сборов была произведена в северо-восточной части Западного Саяна (Ермаковский район), остальные сборы происходили в пределах Красноярской лесостепи (Емельяновский район), Кузнецкого Алатау (Ширинский район) и восточной части Верхнетазовской возвышенности (Туруханский район).

Западный Саян – это горная система, расположенная в пределах Южной Сибири, на юге Красноярского края и севере Тувы. С запада ограничена Шапшальским хребтом Восточного Алтая и Абаканским хребтом Кузнецкого Алатау. Западный Саян представляет собой сильно расчленённый горный массив, широкой полосой простирающийся от истоков р. Абакана в северо-восточном направлении, до верховьев р. Казыра, где соединяется с Восточным Саяном [51].

Климат Западного Саяна – резко континентальный с продолжительной и холодной зимой. Средние температуры января в горах до $-25,9^{\circ}\text{C}$, в котловинах – до $-34,9^{\circ}\text{C}$. Средняя температура июля от $12,3-12,6^{\circ}\text{C}$ (в горах), до $16,9^{\circ}\text{C}$ (в котловинах). Максимум осадков – в июле, минимум – в феврале. Значительная мощность снежного покрова на северном макросклоне Западного Саяна, особенно на хребте Ергак-Таргак-Тайга, способствует активному проявлению лавинной деятельности. В высокогорьях много снежников, сохраняющихся в течении всего лета [52].

В распределении ландшафтов чётко выражены высотно-поясные закономерности. Поясность представлена степным, лесостепным, подтаёжным, черневым таёжным, субальпийским и альпийским поясами [53].

В Западном Саяне преобладает темнохвойная тайга. Главные древесные породы – сосна сибирская, пихта и ель. Растения нижнего яруса –

мхи, лишайники, майник, седмичник, грушанка, папоротники, хвощи, бадан, черника, брусника и т.д.

Окрестности Красноярска располагаются в Красноярско–Канской провинции и относятся к Красноярскому округу. Данная провинция является самой низкой краевой частью Среднесибирского плоскогорья. В рельефе выделяется две обширные холмистые равнины: Приенисейская (западная) и Канская (восточная). Рельеф образован волнистой равниной предгорного прогиба перед уступом Восточного Саяна [54].

Климат Красноярска умеренно континентальный [55]. Средняя годовая температура воздуха – 0,5-0,6°C, средняя температура января -28,7°C, июля - +15,7°C. Годовое количество осадков колеблется от 338 до 380 мм при довольно резкой разнице в распределении их между основными сезонами. Зима малоснежная, с частыми оттепелями. Строительство ГЭС привело к изменению гидротермического режима р. Енисей, следовательно, температура воздуха в холодное время года стала на 2-4°C выше, а в тёплое время года на 2-3,3°C ниже [56].

Характер растительного покрова г. Красноярска обусловлен местонахождением его территории близ границы лесостепной и таёжной природных зон и антропогенным воздействием. Встречаются хвойные, берёзовые леса. Подлесок образован кизильником, боярышником, спиреей и т.д. Травостой представлен горошком, чиной, василистником, пупавкой и т.д. [57].

Кузнецкий Алатау – преимущественно низкие и средние массивно-глыбовые горы, не составляющие единого хребта. Характерная черта рельефа – сочетание гольцовых куполовидных форм с выровненными водораздельными пространствами. Юго-западный склон более короткий, крутой и глубокорасчленённый, чем северо-восточный. Водораздел смещён юго-западу. На севере преобладают низкогорья, в центральной части – среднегорья. На юге распространены альпинотипные высокогорья с обилием скальных выходов горных пород.

Климат Кузнецкого Алатау континентальный. Средняя температура января от $-15,3$ – $-19,6^{\circ}\text{C}$, июля – $12,6$ - $17,5^{\circ}\text{C}$. Хребет выполняет барьерную функцию по отношению к западному переносу воздушных масс. На юго-западном макросклоне выпадает 1200-1500 мм осадков в год, на северо-восточном – в два раза меньше.

На хорошо увлажнённом юго-западном макросклоне на высотах 300–600 м. распространены низкогорные осиново-пихтовые высокотравные (черневые) леса на дерново-глубокоподзолистых и серых метаморфических непромерзающих почвах. Обилен подлесок, в котором представлены черёмуха, карагана, спирея, калина, жимолость, жёлтая акация. В травостое встречаются виды, свойственные европейским широколиственным лесам – копытень, ясменник и др.

На менее увлажнённом северо-восточном макросклоне ландшафты отличаются остепнённостью и повышенной долей лиственницы и сосны в древостое. Предгорная и низкогорная части заняты мелкодерновинными и разнотравно-злаковыми степями на чернозёмах оподзоленных, экспозиционными берёзово-лиственничными лесостепями на серых метаморфических почвах. По крутым склонам световых экспозиций степные сообщества поднимаются до абсолютных высот 550—600 м. Выше господствуют парковые лиственничные и остепнённые лиственнично-сосновые леса с разнотравно-злаковым, разнотравно-осочковым покровом на дерново-подзолистых или чернозёмовидных почвах. На высотах 800—1100 м, как и на западном склоне, доминируют пихтово-кедровые зеленомошные леса на подзолистых почвах [58].

Юг Туруханского района является южной границей вечной мерзлоты Красноярского края. Также этот район захватывает восточную часть Верхнетазовской возвышенности (восток Западно-Сибирской равнины). Территория представляет собой антиклинальное поднятие, в своде которого обнажаются верхнемеловые пески, перекрытые ледниковыми отложениями [59].

Климат резко континентальный. Зимой температура опускается до -60°C, а летом повышается до +35°C [60]. Годовой уровень осадков – 590 мм [61].

Территория соответствует лесной равнинной зональной области. В флоре преобладают светлохвойные с участием кедра ели и берёзы зеленомошные леса; доминирующий древостой образован *Pinus sylvestris* L. [62, 63]. Окрестности села Зотино располагаются в средней тайге близ устья реки Дубчес.

2.2 Объекты исследования

Объектами исследования являлись 7 популяций видов рода *Trollius* L. (2 – *Trollius vitalii*, 2 – *Trollius asiaticus*, 1 – *Trollius kolonok*, 1 – *Trollius austrosibiricus*, 1 – *Trollius kytmanovii*), произрастающих в пределах южной и центральной территорий Красноярского края и Республики Хакасия. Местонахождения изучаемых популяций представлены на рисунке 3, характеристика местообитаний представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика местообитаний популяций р. *Trollius*

№	Название сообщества, местоположение	Состав древостоя	Доминирующие виды травяно-кустарничкового яруса	Координаты
KRU (AS)	<i>Trollius asiaticus</i> L. Сосново-елово-берёзовый лес осочково-разнотравный (окр. д. Крутая, Емельяновский район, Красноярский край)	6Б2Е2С	<i>Corydalis bracteata</i> (15%) <i>Carex macroura</i> (15%) <i>Calamagrostis arundinacea</i> (15%) <i>Trollius asiaticus</i> (3%)	54,38860N 89,45389E
SYA (AS)	<i>Trollius asiaticus</i> L. Березняк с примесью ели, лиственницы хвощево-злаковый (окр. д. Малая Сья, Ширинский район, Хакасия)	9Б1Л+Е	<i>Carex cespitosa</i> (20 %), <i>Brachypodium pinnatum</i> (15 %), <i>Equisetum pratense</i> (15 %), <i>Calamagrostis obtusata</i> (15 %), <i>Trollius asiaticus</i> (5%)	60,90185N 89,68101E

Продолжение таблицы 1.

N	Название сообщества, местоположение	Состав древостоя	Доминирующие виды травяно-кустарничкового яруса	Координаты
IDZ (AU)	<i>Trollius austrosibiricus</i> Luferov & Erst Лиственничник разнотравно-вейниковый (долина р. Иджим, Усинская котловина, Ермаковский район, Красноярский край)	Л9Б1+Е	<i>Calamagrostis obtusata</i> (50%), <i>Carex macroura</i> (5%), <i>Saussurea parviflora</i> (3%), <i>Trollius austrosibiricus</i> (1%)	54,31889N 89,18139E
OYA (VI)	<i>Trollius vitalii</i> Stepanov Субальпийское редколесье (Природный парк Ергаки, район озера Ойское, Ермаковский район, Красноярский край)	-	<i>Carex altaica</i> (40%), <i>Veratrum lobelianum</i> (20%), <i>Vaccinium myrtillus</i> (15%), <i>Euphorbia sajanensis</i> (10%), <i>Caltha palustris</i> (10%), <i>Trollius vitalii</i> (7%)	52,83461N 93,24348E
TOR (VI)	<i>Trollius vitalii</i> Stepanov Субальпийский луг (Природный парк Ергаки, район Тормозаковского моста, Ермаковский район, Красноярский край)	-	<i>Alopecurus pratensis</i> (25%), <i>Euphorbia pilosa</i> (20%), <i>Pedicularis incarnata</i> (20%), <i>Geranium albiflorum</i> (20%), <i>Poa sibirica</i> (15%), <i>Trollius vitalii</i> (15%), <i>Rhaponticum carthamoides</i> (15%), <i>Bupleurum aureum</i> (10%)	52,80944N 93,28639E
SHI (KO)	<i>Trollius kolonok</i> Stepanov Высокотравный субальпийский луг (окр. пос. Коммунар, Кузнецкий Алатау, Ширинский район, Хакасия)	-	<i>Geranium krylovii</i> (10%), <i>Trollius kolonok</i> (10%), <i>Euphorbia pilosa</i> (10%), <i>Heraclium sphondylium</i> sp. (15%), <i>Allium ursinum</i> (15%)	54,34500N 89,14778E
ZOT (KY)	<i>Trollius kytmanovii</i> Reverd. Кедрово-сосновый лес разнотравный (окр. с. Зотино, Туруханский район, Красноярский край)	С82К	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> (30%), <i>Vaccinium myrtillus</i> (30%), <i>Ledum palustre</i> (20%), <i>Carex globularis</i> (10%), <i>Empetrum nigrum</i> (10%), <i>Trollius kytmanovii</i> (5%)	60,90185N 89,68101E

2.3 Методика исследования

2.3.1 Классическая морфометрия

Измерения высоты растения и параметров прикорневых листьев проводилось на ~ 30 генеративных особях для каждой популяции, выбранных случайным образом. Измерялись следующие параметры: высота растения (x1), длина черешка прикорневого листа (x2), длины долей прикорневого листа (x3-x7), ширина каждой доли (x8-x12), глубина рассечения прикорневого листа (x13), глубины рассечения каждой доли (x14-x21) (рис. 4).

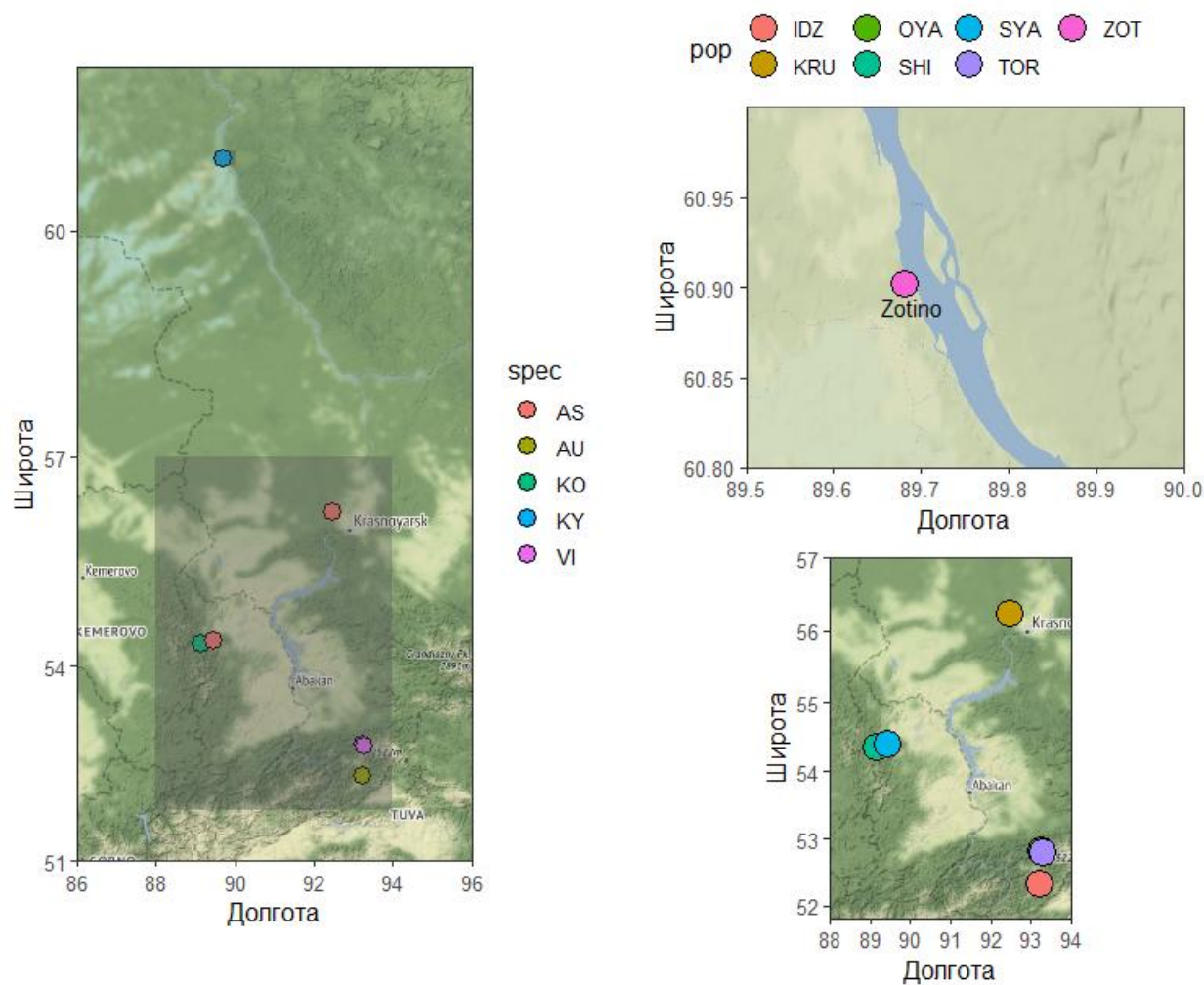


Рисунок 3 – Местонахождения точек сбора исследуемых популяций р. *Trollius*. Слева аббревиатуры обозначают вид купальниц. Справа аббревиатуры обозначают название популяции

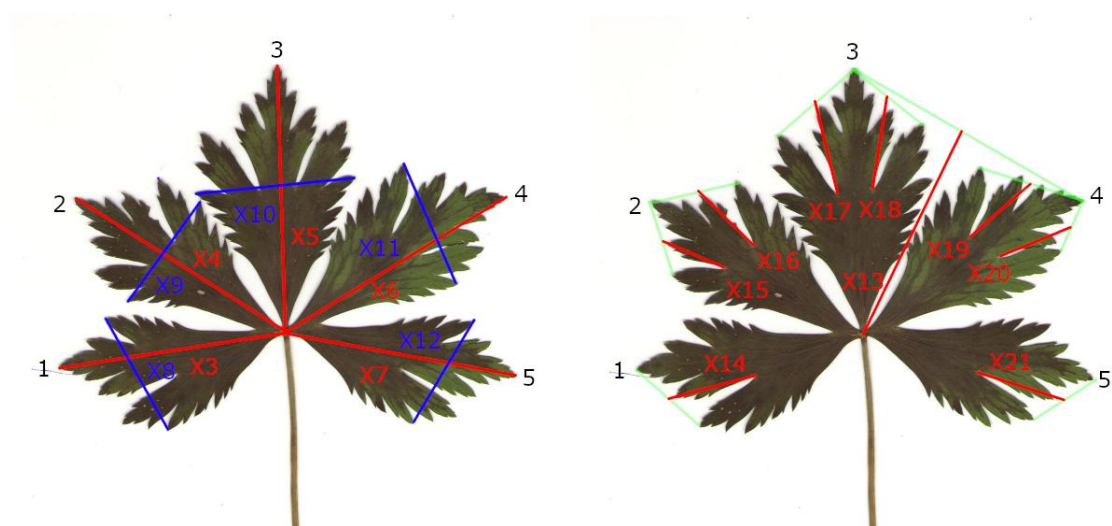


Рисунок 4 – Измеряемые параметры прикорневых листьев

Статистическая обработка проводилась с помощью статистического языка программирования R v4.2.3 (среда разработки – RStudio v2023.0.3.0-386). Для каждой переменной определялись минимальное и максимальное значения, среднее значения (mean), стандартное отклонение (SD), 0,25-й, 25-й, 50-й (медиана), 75-й и 97,5-й процентиля и коэффициент вариации ($SD/mean * 100$). С целью проверки возможности использования стандартных методов статистической обработки проводилась проверка на нормальность распределения каждой переменной с помощью трёх статистических тестов: тест Шапиро-Уилка (на основе средних значений распределений), тест Хи-квадрат (на основе дисперсий распределений) а также тест Харке-Бэра (на основе асимметрии и эксцесса распределений), реализованный с помощью пакета «tseries» [64] для R. Для оценки индивидуальной изменчивости признаков рассчитывался коэффициент вариации (Cv). Для проверки достоверно значимой разницы между средними значениями признаков каждого вида использовался тест Тьюки. Далее, для сокращения размерности

данных с целью выявления наиболее значимых параметров, а также для визуализации распределения данных в синтетических координатах использовались следующие методы:

1. Анализ главных компонент (Principal Component Analysis – PCA): позволяет найти наиболее значимые компоненты в исходных данных на основе линейной комбинации исходных признаков;
2. Сокращение единичных значений (Singular Value Decomposition - SVD): позволяет найти наиболее значимые компоненты в данных на основе разложения исходных данных на три компонента – матрицу левых сингулярных векторов, матрицу правых сингулярных векторов и диагональную матрицу сингулярных значений [65];
3. Анализ независимых компонент (Independent Component Analysis - ICA): поиск наиболее значимых переменных на основе разложения данных на независимые компоненты [66, 67];
4. Факторизация неотрицательной матрицы (Non-negative Matrix Factorization - NMF): определение наиболее значимых признаков на основе разложения исходных данных на две неотрицательные матрицы меньшего размера [68, 69];
5. t-распределённое стохастическое вложение соседей (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding - tSNE): метод визуализации данных в синтетических координатах на основе моделирования вероятностного распределения расстояний между объектами в высокоразмерном и низкоразмерном пространствах [70, 71];
6. Метод снижения размерности данных на основе равномерного приближения многообразия и его проекции (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimensionality Reduction - UMAP): метод визуализации данных в синтетических координатах, основанный на моделировании вероятностного распределения расстояний между

объектами в исходном пространстве и их проекции на низкоразмерное пространство [72].

Визуализация полученных результатов производилась с помощью пакетов «ggplot2» v3.4.2 [73] и «ggpubr» v0.6.0 [74]. Также, визуализация PCA производилась с помощью метода упругих карт в программе ViDaExpert v1.2 (Detailed map 25*25) [75].

2.3.2 Геометрическая морфометрия

Прикорневые листья ~100 генеративных особей были отсканированы с помощью МФУ Kyocera ECOSYS M204dn со следующими параметрами: формат изображения – А4, плотность пикселей – 600 dpi. Анализ изменчивости форм между видами производился по каждой из пяти долей листа в виду сложности формы листовой пластинки. Перед расстановкой точек (ландмарок), определяющих форму листовой пластинки, был сформирован TPS-файл (Thin Plate Spline) в программе «tpsUtil» v1.26 [76]. Отсканированные изображения импортированы в программу «tpsDig2» v2.16 [77] для расстановки ландмарок и записи их в TPS-файл. Для 1-ой и 5-ой долей количество ландмарок составило 26 штук, для 2-ой, 3-ей и 4-ой долей количество ландмарок составило 25 (рис. 5). Дальнейшая статистическая обработка производилась в программе MorphoJ v1.07a, где для каждого вида было произведено Прокрустово преобразование (масштабирование форм), определена средняя форма каждой доли листа, произведён анализ главных компонент, канонический вариативный анализ (Canonical Variate Analysis – CVA – определяет наиболее значимые компоненты изменчивости формы, для поиска различий между формами). С помощью пакета «geomorph» v4.0.5 для R был проведён Прокрустов дисперсионный анализ (Procrustes ANOVA) и попарное сравнение форм между видами на основании результатов Прокрустова дисперсионного анализа (функция «pairwise»).



Рисунок 5 – Ландмарки, расставленные на каждой из 5-ти долей листовой пластинки

2.3.3 Анализ генетического полиморфизма популяций

Выделение ДНК. В ходе работы была использована ДНК из 10 случайно выбранных образцов из каждой из исследуемых популяций. Выделение ДНК производили из 30-40г сухой гомогенизированной листовой ткани с использованием цетилтриметиламмония бромидного буфера –

СТАВ-буфере (2% СТАВ, 1,4М NaCl, 20mM EDTA, 100 mM tris-HCl pH 8) [78]. Ниже представлен протокол выделения:

1. Измельчить и растереть 30-40г высушенного образца. Перенести образец в 1,5мл пробирку;
2. Добавить 1000мкл 2% СТАВ-буфера и термостатировать в течение 2,5ч при 65°C;
3. Центрифугировать образцы в течении 20 минут при 20°C со скоростью 13000 об/мин;
4. Отобрать максимально возможное количество (~ 700 мкл) супернатанта в новую пробирку, добавить равное количество хлороформа, гомогенизировать раствор на вортексе;
5. Повторить пункты 3-4 ещё раз;
6. Отобрать в новую пробирку супернатант и добавить равное количество охлаждённого изопропанола. Аккуратно перемешать раствор в руках и поместить в морозильную камеру на 40 минут. В это же время произвести холостой запуск центрифуги при 4°C на скорости 13000 об/мин в течении 40 минут;
7. Центрифугировать образцы при 4°C на скорости 13000 об/мин в течении 15 минут;
8. Отобрать супернатант и добавить около 70мкл 80% этанола, встряхнуть на вортексе;
9. Центрифугировать образцы при комнатной температуре на скорости 13000 об/мин в течении 10 минут;
10. Повторить пункты 8-9 ещё 2 раза;
11. Спирт слить и оставить ДНК в открытой пробирке для сушки (на 1 час или на ночь);
12. Высохшие образцы ДНК растворить в 40мкл ddH₂O

ISSR-анализ. Для проведения ISSR-анализа использовались праймеры, представленные в таблице 2. Именно эти праймеры показали наиболее

подходящий результат – давали наибольшее количество чётко различимых бэндов на электрофореграмме [79].

Таблица 2 – Характеристика праймеров, использованных для ISSR-анализа

Праймер	Последовательность
17899A	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-AG-3'
HB12	5'-CAC-CAC-CAC-GC-3'
HB14	5'-CTC-CTC-CTC-GC-3'

Аmplификацию с вышеуказанными праймерами проводили в 10мкл реакционной смеси, состоящей из 5мкл PCR-микса «БиоМастер *HS-Taq* ПЦР» (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 3мкл ddH₂O, 1мкл ДНК и 1мкл праймера. Ниже представлена программа амплификации:

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

Разделение продуктов амплификации производилось в 2% агарозном геле (BIORON GmbH, Франкфурт, Германия) в электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при напряжении 230В. При приготовлении геля в раствор добавлялось 5мкл EtBr для визуализации продуктов амплификации в УФ-излучении.

Полученные результаты переводились в матрицу нулей и единиц, где 1 – присутствие локуса, 0 – отсутствие. В пакете GenAlEx v6.51b2 [80] для Microsoft Excel рассчитывали следующие показатели:

- N – количество аллелей;
- P – процент полиморфных локусов;
- H – генетическое разнообразие Нэя;
- H_D – генетические дистанции Нэя между популяциями;
- H_I – генетическое сходство Нэя между популяциями;
- I_O – информационный индекс Шеннона.

Помимо вышеуказанных показателей программе TFPGA v1.3 построены дендрограммы сходства популяций на основании дистанций Нэя.

Для оценки генетической структуры популяций был использован байесовский подход, реализованный в программе STRUCTURE v2.3.4. Использовалось длительное выгорание (burn-in) – 20000 циклов и MCMC – 60000 циклов. Максимальное количество кластеров оценивалось с помощью ΔK [81]. Количество возможных кластеров (K) тестировалось от 1 до 10 в десяти повторностях. Для визуализации результатов была использована программа STRUCTURE Harvester Web 0.6.94 [82].

2.3.4 Филогенетический анализ

Для проведения филогенетического анализа была использована ДНК 6 представителей р. *Trollius* (*T. asiaticus*, *T. kolonok*, *T. vitalii*, *T. sibiricus* Schipcz., *T. altaicus*, *T. europaeus* L.). Образцы сибирской, алтайской и европейской купальниц были взяты из культуры. Амплификация ДНК проводилась по протоколу, указанному в разделе 2.3.3 с праймерами, комплементарными к межгенным спейсерам, указанными в таблице 3.

Амплифицированная ДНК была секвенирована с помощью набора реактивов BigDive Terminator v3.1 (Applied Biosystems, MD, USA) методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130 (г. Новосибирск). Проверка сиквенсов на предмет неоднозначных результатов и последующая конвертация в FASTA-формат происходила в программе Unipro UGENE v46.0 [83]. Подбор последовательностей родственных видов растений осуществлялся в БД

«Nucleotide» NIH NCBI по принципу принадлежности родственных растений к семейству Лютиковых. Аутгруппа для укоренения дендрограмм (*Papaver somniferum* L.) была выбрана из соображений, что мак относится к семейству Маковых, в свою очередь данное семейство объединяется с семейством Лютиковых в порядок Лютикоцветных.

Таблица 3 – Характеристика праймеров, использованных для реконструкции филогении

Локус	Пара последовательностей
atpB-rbcL	forward: 5'-AGTAGTAGGATTGATTCTCA-3' reverse: 5'-CAACACTTGCTTTAGTCTCT-3'
psbA-trnH	forward: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' reverse: 5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'
trnL-trnF	forward: 5'-AGGATTTTCAGTCCTCTGCTC-3' reverse: 5'-GGGGGATAGAGGGACTTGAA-3'

Выравнивание последовательностей производилось в программе MAFFT v7.505. Подбор модели нуклеотидных и построение филогенетических деревьев производилось на веб-сервере IQ-TREE [84] со следующими параметрами: Substitution model – Auto, Bootstrap analysis – Ultrafast (Number of bootstrap iterations - 10000). Стратегия построения деревьев – Maximum Likelihood (ML). Визуализация деревьев производилась в программе FigTree v1.4.4 [85].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Классическая морфометрия популяций видов рода *Trollius*

Для каждого измеренного морфологического признака было произведено три теста на нормальность. Результаты тестов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты тестов на нормальность признаков.

N	p-value		
	Shapiro-Wilk	Chi-square	Jarque-Berra
x1	5.45E-05	0	0.001522
x2	1.11E-06	0	0.000291
x3	2.82E-08	4.99E-219	1.26E-09
x4	1.06E-07	1.47E-233	6.17E-08
x5	1.31E-08	2.53E-227	2.63E-09
x6	1.50E-08	2.73E-245	7.03E-10
x7	2.56E-09	5.09E-230	4.01E-11
x8	2.34E-13	0	0
x9	5.11E-12	1.16E-230	0
x10	3.56E-11	1.07E-224	0
x11	4.01E-13	6.66E-260	0
x12	7.88E-13	0	0
x13	1.06E-08	6.88E-198	2.35E-10
x14	3.99E-14	0	0
x15	6.83E-12	3.14E-144	0
x16	5.13E-13	1.84E-161	0
x17	9.04E-14	2.86E-167	0
x18	7.06E-12	4.96E-141	0
x19	5.57E-13	8.85E-194	0
x20	5.08E-12	2.00E-144	0
x21	2.10E-14	0	0

Согласно результатам тестов, все признаки статистически достоверно распределены нормально ($p\text{-value} < 0.05$). Эти результаты говорят о том, что можно использовать стандартные статистические параметры для изучения морфологической изменчивости.

Изъято в связи с авторским правом 18 страниц

ВЫВОДЫ

1. По результатам классического морфометрического анализа листовых пластинок видов *p.Trollius* не выявлено статистически достоверной разницы между видами *T. asiaticus*, *T. austrosibiricus* и *T. kytmanovii*; достоверно от остальных видов отличается *T. kolonok*. Разделение на три группы видов наблюдается при проекции на пространство главных компонент распределения данных в упругой карте: 1 – *T. vitalii*, 2 – *T. kolonok* и 3 – *T. asiaticus*, *T. austrosibiricus*. Растения вида *T. kytmanovii* равномерно распределены по всей проекции.
2. По результатам анализа геометрической морфометрии в пространстве канонических переменных выделяется три группы видов: 1 – *T. vitalii*, 2 – *T. kolonok* и 3 – *T. asiaticus*, *T. austrosibiricus* и *T. kytmanovii*. Основными наблюдаемыми признаками, с помощью которых растения можно разделить на группы являются глубины рассечения 1 и 5 долей прикорневого листа.
3. Анализ генетического полиморфизма показал высокую степень сходства исследуемых популяций ($H_I = 0,892 - 0.929$) при высокой степени внутрипопуляционной изменчивости ($P = 77,27 - 84,85\%$). На дендрограмме сходства наблюдается чёткое разделение исследуемых популяций на две группы по дистанциям Нэя: 1 – *T. asiaticus*, *T. kolonok* и *T. vitalii* (TOR) и 2 – *T. austrosibiricus* и *T. vitalii* (OYA), однако, по результатам соотнесения предполагаемых генотипов по видам нельзя сделать вывод о достоверности полученного результата.
4. Филогенетический анализ показал обособленность исследуемых видов по пластидным маркерам *atpB-rbcL*, *psbA-trnH* и *trnL-trnF*, однако полученная картина не позволяет выявить чёткие филогенетические взаимоотношения между исследуемыми видами растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kadota, Y. Genus *Trollius* L. (Ranunculaceae) in Japan / Y. Kadota //Bulletin of the National Science Museum. Series B: Botany. – 1987.
2. Kadota, Y. et al. A revision of the genus *Trollius* (Ranunculaceae) in Japan / Y. Kadota et al. //J. Jap. Bot. – 2016. – Vol. 91. – P. 178-200.
3. Doroszewska, A. genus *Trollius* L.; a taxonomical study //Monographiae botanicae. – 1974.
4. Desperes, L. Geographic pattern of genetic variation in the European globeflower *Trollius europaeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers / L. Desperes et al. //Molecular Ecology. – 2002. – Vol. 11. – №. 11. – P. 2337-2347.
5. Luferov, A.N. The genus *Trollius* (Ranunculaceae) in the Russian Far East / A.N. Luferov et al. //Turczaninowia. – 2018. – Vol. 21. – №. 2. – P. 110-116.
6. Эрст, А.С. Род *Trollius* L.(Ranunculaceae) во флоре Алтайской горной страны / А.С. Эрст и др. //Систематические заметки по материалам гербария им. ПН Крылова Томского государственного университета. – 2018. – №. 118. – С. 64-76.
7. Шипчинский, Н.В. Род Купальница - *Trollius* L //Флора СССР. Издательский дом АН СССР, Москва, Ленинград. – 1937. – Т. 7. – С. 42-53.
8. Фризен, Н.В. *Trollius* L.–жарок, или купальница //Флора Сибири. – 1993. – Т. 6. – С. 103-108.
9. Акшенцев, Е.В. Пространственно-временная организация ценопопуляций купальницы европейской (*Trollius europaeus* L.) //Автореф. дисс. канд. биол. наук. Новосибирск. – 2006.
10. Zou, J.H. Acylated flavone C-glycosides from *Trollius ledebouri* / J.H. Zou et al. //Journal of natural products. – 2004. – Vol. 67. – №. 4. – P. 664-667.
11. Li, Y.L. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge / Y.L. Li et al. //Journal of ethnopharmacology. – 2002. – Vol. 79. – №. 3. – P. 365-368.

12. Wang, R.F. A bioactive alkaloid from the flowers of *Trollius chinensis* / R.F. Wang et al. // *Heterocycles-Sendai Institute of Heterocyclic Chemistry*. – 2004. – Vol. 63. – №. 6. – P. 1443-1448.
13. An, F. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice / F. An et al. // *Neural Regeneration Research*. – 2012. – Vol. 7. – №. 33. – P. 2565.
14. Witkowska- Banaszczak E. The genus *Trollius*—review of pharmacological and chemical research / E. Witkowska-Banaszczak // *Phytotherapy Research*. – 2015. – Vol. 29. – №. 4. – P. 475-500.
15. Flora of China [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200008264
16. Энциклопедия декоративных садовых растений. Купальница (*Trollius*) [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: http://flower.onego.ru/other/trolli_s.html
17. Степанов, Н.В. Флорогенетический анализ (на примере северо-восточной части Западного Саяна): Учеб. пособие. Часть 1 / Краснояр. гос. ун-т. Красноярск, 1994. 108 с.
18. Биоразнообразие Алтае-Саянского экорегиона. *Trollius asiaticus* L. [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: http://bioaltai-sayan.ru/regnum/species_all.php?right=box-spec-p/trollius.php&left=go.php&species=trollius_asiaticus
19. Красная книга Красноярского края / Н. В. Степанов, Е. М. Антипова, С. В. Антипова [и др.]. Том 2. – 3-е издание, переработанное и дополненное. – Красноярск : Сибирский федеральный университет, 2022. – 762 с.
20. Шауло, Д.Н. Флора Западного Саяна / Д.Н. Шауло // *Turczaninowia*. – 2006. – Т.9, №1-2. – С. 5-336
21. Буглова, Л.В. Естественные гибриды *Trollius asiaticus* x *T. altaicus*: признаки и распространения / Л.В. Буглова // *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*, 2018. – Т. 1. – С. 180–183

22. Степанов, Н. В. Новый вид *Trollius* L. (Ranunculaceae) из Кузнецкого Алатау / Н.В. Степанов //Систематические заметки по материалам гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. – 2018. – №. 117. – С.40-45
23. Erst, A. *Trollius austrosibiricus* (Ranunculaceae), a new species from South Siberia / A. Erst et al. //PhytoKeys. – 2019. – №. 115. – P. 83.
24. *Trollius kytmanovii*. Биоразнообразие Алтае-Саянского экорегиона [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: http://bioaltai-sayan.ru/regnum/species_all.php?right=box-spec-p/trollius.php&left=go.php&species=trollius_kytmanovii
25. Буглова, Л.В. Новые морфологические критерии для дифференциации видов *Trollius altaicus* x *T. asiaticus* / Л.В. Буглова и др. //Проблемы изучения растительного покрова Сибири: мат-лы VI междунар. науч. конф., поев. – 2017. – С. 148-149.
26. Siplivinsky, V. N. The genus *Trollius* L. on the North and East of Asia //Novitates systematicae plantarum vascularium. Leningrad. – 1972. – Vol. 9. – P. 163-182.
27. Тихомиров, В. Н. Происхождение покрытосеменных растений и «гипноз цветка» //Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. отд. биол. – 1987. – Т. 92. – №. 6.
28. Serebryanyi, M.M. Towards a taxonomic revision of the genus *Trollius* (Ranunculaceae) in the Asian part of Russia. I. *Trollius chinensis*: taxonomic and geographical reconsiderations / M.M. Serebryanyi //Novitates Systimaticae Plantarum Vascularium. – 2019. – Vol. 50. – P. 101-114.
29. Hammer, Ø. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis / Ø. Hammer et al. //Palaeontologia electronica. – 2001. – Vol. 4. – №. 1. – P. 9.
30. Ihaka, R. R: a language for data analysis and graphics / R. Ihikara et al. //Journal of computational and graphical statistics. – 1996. – Vol. 5. – №. 3. – P. 299-314.

31. Šlenker, M. MorphoTools2: an R package for multivariate morphometric analysis / M. Šlenker et al. //Bioinformatics. – 2022. – Vol. 38. – №. 10. – P. 2954-2955.
32. Slice, D.E. Geometric morphometrics / D.E. Slice //Annu. Rev. Anthropol. – 2007. – Vol. 36. – P. 261-281.
33. Adams, D.C. geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data / D.C. Adams et al. //Methods in ecology and evolution. – 2013. – Vol. 4. – №. 4. – P. 393-399.
34. Klingenberg, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics / C.P. Klingenberg //Molecular ecology resources. – 2011. – Vol. 11. – №. 2. – P. 353-357.
35. Мухина, Ж.М. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях / Ж.М. Мухина и др. //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 66.
36. Morgante, M. PCR- amplified microsatellites as markers in plant genetics / M. Morgante et al. //The plant journal. – 1993. – Vol. 3. – №. 1. – P. 175-182.
37. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz et al. //Genomics. – 1994. – Vol. 20. – №. 2. – P. 176-183.
38. Syvänen, A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms / A.C. Syvänen //Nature Reviews Genetics. – 2001. – Vol. 2. – №. 12. – P. 930-942.
39. Vos, P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos et. al. //Nucleic acids research. – 1995. – Vol. 23. – №. 21. – P. 4407-4414.
40. Needleman, S.B. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S.B. Needleman, et al. // Journal of molecular biology. – 1970. – Vol. 48. – №. 3. – P. 443-453.
41. Brudno, M. Glocal alignment: finding rearrangements during alignment / M. Brudno et. al. //Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. – №. 1. – P. 54-62

42. Smith, T.F. Identification of common molecular subsequences / T.F. Smith et al. // Journal of molecular biology. – 1981. – Vol. 147. – №. 1. – P. 195-197.
43. Higgins, D.G. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer / D.G. Higgins et al. //Gene. – 1988. – Vol. 73. – №. 1. – P. 237-244.
44. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.C. Edgar //Nucleic acids research. – 2004. – Vol. 32. – №. 5. – P. 1792-1797.
45. Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K. Katoh et al. //Molecular biology and evolution. – 2013. – Vol. 30. – №. 4. – P. 772-780.
46. Talavera, G. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments / G. Talavera et al. //Systematic biology. – 2007. – Vol. 56. – №. 4. – P. 564-577.
47. Wong, K.M. Alignment uncertainty and genomic analysis / K.M. Wong et al. //Science. – 2008. – Vol. 319. – №. 5862. – P. 473-476.
48. Tan, G. Current methods for automated filtering of multiple sequence alignments frequently worsen single-gene phylogenetic inference / G. Tan et. al. // Systematic biology. – 2015. – Vol. 64. – №. 5. – P. 778-791.
49. Jukes, T.H. Evolution of protein molecules / T.H. Jukes et al. //Mammalian protein metabolism. – 1969. – Vol. 3. – P. 21-132.
50. Tavaré, S. Line-of-descent and genealogical processes, and their applications in population genetics models / S. Tavaré //Theoretical population biology. – 1984. – Vol. 26. – №. 2. – P. 119-164.
51. Красноборов, И.М. Высокогорная флора Западного Саяна: монография / И. М. Красноборов; отв. ред. А. И. Толмачев; Академия наук [АН] СССР. Сибирское отделение [СО]. Центральный сибирский ботанический сад [ЦСБС]. - Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1976. - 379 с.: ил.
52. Большая российская энциклопедия. Западный Саян [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://bigenc.ru/geography/text/1988160>

53. Назимова, Д.И. Высотная поясность и климат в горах Южной Сибири / Д.И. Назимова и др. // География и природные ресурсы, 1981. - №2. – С.68-78.
54. Кириллов, М.В. Красноярский край. Природное и экономико-географическое районирование / М.В. Кириллов, Ю.А. Щербаков. – Красноярск : Кн. изд-во, 1962. – 404 с.
55. Баженова О. И. Ландшафтно-климатические типы систем экзогенного рельефообразования субаридных районов юга Сибири / О.И. Баженова // География и природные ресурсы. – 2006. – №. 4. – С. 57-65.
56. Антипова, С.В. Урбанфлора города Красноярска (сосудистые растения) : монография / С.В. Антипова, Е.М. Антипова ; Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. – Изд. 2-е., испр. и доп. – Красноярск : 2016. – 373 с.
57. Шумилова Л.В. Ботаническая география Сибири : Учеб. пособие / Под ред. д-ра биол. наук проф. Л. П. Сергиевской ; Томский гос. ун-т им. В. В. Куйбышева. - Томск : Изд-во Том. ун-та, 1962. - 439 с.: ил.
58. Большая Российская Энциклопедия. Кузнецкий Алатау [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: <https://old.bigenc.ru/geography/text/5869146>
59. Западно-Сибирская равнина: Физическая география России и СССР [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: http://ecosystema.ru/08nature/world/geoussr/2_1.html#2_1_1
60. Туруханский район: Энциклопедия Красноярского края [Электронный ресурс]. – 2023; Режим доступа: <https://my.krskstate.ru/docs/regions/turukhanskiy-rayon/>
61. Герасимов И.П. Средняя Сибирь : Монография / И.П. Герасимов – Москва: Наука, 1964. – 492 с.
62. Уфимцева, М.Г. Ландшафты Тюменской области: Учебное пособие / М.Г. Уфимцева - Тюмень : ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, 2021. – 76 с.

63. Schulze, E.D. The Eurosiberian Transect: an introduction to the experimental region / E.D. Schulze et al. //Tellus B: Chemical and Physical Meteorology. – 2002. – Vol. 54. – №. 5. – P. 421-428.
64. Trapletti, A. tseries: Time Series Analysis and Computational Finance / A. Trapletti et al. //R project. – 2015.
65. Klema, V. The singular value decomposition: Its computation and some applications / V. Klema et al. //IEEE Transactions on automatic control. – 1980. – Vol. 25. – №. 2. – P. 164-176.
66. Comon, P. Independent component analysis, a new concept? / P. Comon //Signal processing. – 1994. – Vol. 36. – №. 3. – P. 287-314.
67. Marchini, J.L. fastICA: Fast ICA Algorithms to Perform ICA and Projection Pursuit / J.L. Marchini et al. //R project. – 2017
68. Lee, D.D. Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization / D.D. Lee et al. //Nature. – 1999. – Vol. 401. – №. 6755. – P. 788-791.
69. Gaujoux, R. A flexible R package for nonnegative matrix factorization / R. Gaujoux et al. //BMC bioinformatics. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 1-9.
70. Van der Maaten, L. Visualizing data using t-SNE / L. Van der Maaten et al. //Journal of machine learning research. – 2008. – Vol. 9. – №. 11.
71. Krijthe, J. Rtsne: T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding using a Barnes-Hut Implementation / J. Krijthe et al. //R project. – 2020
72. McInnes, L. Umap: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction / L. McInnes et al. //arXiv preprint arXiv:1802.03426. – 2018.
73. Gómez-Rubio, V. ggplot2: elegant graphics for data analysis / V. Gómez-Rubio //Journal of Statistical Software. – 2017. – Vol. 77. – P. 1-3.
74. Kassambara, A. ggpubr: ‘ggplot2’ Based Publication Ready Plots / //R project. – 2020
75. Gorban, A.N. Principal manifolds and graphs in practice: from molecular biology to dynamical systems / A.N. Gorban et al. //International journal of neural systems. – 2010. – Vol. 20. – №. 03. – P. 219-232.

76. Rohlf, F.J. tpsUtil, file utility program, version 1.26 / F.J. Rohlf //Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. – 2004.
77. Rohlf, F.J. tpsDig2, digitize landmarks and outlines, version 2.16 / F.J. Rohlf //Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. – 2010.
78. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle et al.//Phytochemical bulletin. – 1987. – Vol. 19. – №. 1. – P. 11-15.
79. Путилин, И.Р. Генетический полиморфизм популяций и филогения сибирских видов р. Trollius L : специальность 06.03.01 «Биология» : дипломная работа / Путилин Илья Романович ; Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2021. – 55 с.
80. Peakall, R. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update / R. Peakall et al. //Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 2537-2539.
81. Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard et al.//Genetics. – 2000. – Vol. 155. – №. 2. – P. 945-959.
82. Earl, D. A STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D Earl et al. //Conservation genetics resources. – 2012. – Vol. 4. – №. 2. – P. 359-361.
83. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov et al. //Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – №. 8. – P. 1166-1167.
84. Trifinopoulos, J. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis / J. Trifinopoulos et al. //Nucleic acids research. – 2016. – Vol. 44. – №. W1. – P. W232-W235.
85. Rambaut, A. FigTree v1.4.4 / A. Rambaut et al. // <https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4/>. – 2018.

86. Мамаев, С.А. Основные принципы методики исследования внутривидовой изменчивости древесных растений // Индивидуальная и эколого-географическая изменчивость растений. Свердловск, 1975. С. 3–14.
87. Zhai, W. Chloroplast genomic data provide new and robust insights into the phylogeny and evolution of the Ranunculaceae / W. Zhang et al. //Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2019. – Vol. 135. – P. 12-21.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Описательная статистика и коэффициенты вариации исследуемых признаков

№	Mean	SD	Min	Max	SE	2.5%	25%	Median (50%)	75%	97.5%	CV
Высота растения (x1)											
AS	756.13	150.2	462	1033	24.37	468.48	657.5	774	853.75	1026.53	19.86431
AU	746.52	131.78	522	1053	25.36	536.3	663.5	726	823.5	1029.6	17.65257
KO	1022.9	188.23	681	1324	33.81	711	901	1050	1164	1313.5	18.4016
KY	677.82	102.13	471	857	24.77	492.2	641	678	708	854.2	15.06742
VI	554.57	118.88	318	799	14.75	380.8	460	529	645	764	21.43643
Длина черешка прикорневого листа (x2)											
AS	366.13	71.92	223	561	11.67	235.02	326.5	363	399.75	518.45	19.6433
AU	320.96	83.77	143	599	16.12	208.65	264.5	314	361	481.35	26.09983
KO	546.03	115.81	279	694	20.8	282.75	489.5	577	632	674.5	21.20946
KY	344.29	103.98	168	540	25.22	185.2	289	310	416	522.4	30.20128
VI	245.95	74.28	126	489	9.21	133.4	187	249	290	382	30.20126
Длина 1-ой доли листа (x3)											
AS	51.42	12.33	27	81	2	28.85	43.5	49	61	75.45	23.979
AU	46.37	13.05	28	85	2.51	29.3	38	43	52.5	75.9	28.1432
KO	91.58	18.56	54	139	3.33	65.25	77.5	92	101.5	131.5	20.26643
KY	70.76	10.3	57	96	2.5	57.8	62	69	77	92	14.55625
VI	42.54	10.8	23	73	1.34	25.6	34	42	51	61	25.38787
Длина 2-ой доли листа (x4)											
AS	54	12.63	31	79	2.05	31.92	45.25	54	61.75	76.22	23.38889
AU	50.48	14.83	30	93	2.85	31.3	42	46	58.5	81.3	29.37797

Продолжение приложения А

№	Mean	SD	Min	Max	SE	2.5%	25%	Median (50%)	75%	97.5%	CV
KO	97.58	19.47	55	147	3.5	64.75	84	97	109	132	19.95286
KY	76.29	10.96	64	104	2.66	64	71	74	81	101.6	14.36623
VI	46.32	12.1	23	75	1.5	27	36	46	57	66.2	26.12263
Длина 3-ей доли листа (x5)											
AS	54.29	11.86	34	83	1.92	34.92	46.25	53.5	58.75	76.52	21.84564
AU	49.63	13	32	87	2.5	32.65	41.5	48	55.5	77.25	26.19383
KO	99.19	20.14	46	145	3.62	66.25	87	100	112	133.75	20.30447
KY	75.18	10.88	51	98	2.64	56.2	69	74	80	94.8	14.47193
VI	48.05	12.1	24	78	1.5	28.6	38	46	57	67	25.1821
Длина 4-ой доли листа (x6)											
AS	53.08	11.76	28	75	1.91	30.77	47.5	54	58	74.07	22.15524
AU	50.78	15.43	28	96	2.97	29.95	41.5	47	56	83.65	30.38598
KO	99.65	20.35	53	147	3.66	65	86	102	107.5	138.75	20.42148
KY	76	11.58	60	100	2.81	60.4	70	74	82	98.4	15.23684
VI	46.97	11.79	24	78	1.46	28	39	45	57	67	25.10113
Длина 5-ой доли листа (x7)											
AS	50.05	10.32	28	74	1.67	30.77	45.25	50	55	69.37	20.61938
AU	47.81	13.65	30	86	2.63	31.95	39	45	52.5	77.55	28.55051
KO	93.16	20.37	47	140	3.66	56	77.5	95	106.5	128.75	21.86561
KY	70.41	10.42	55	91	2.53	56.2	64	67	80	90.2	14.79903
VI	42.86	10.9	22	74	1.35	25.8	35	40	53	63.2	25.43164
Ширина 1-ой доли листа (x8)											
AS	33.84	8.65	16	54	1.4	16.92	30	33	38.5	50.3	25.56147
AU	29.33	10.45	13	62	2.01	16.25	22.5	27	34	52.25	35.62905
KO	78.81	26.63	32	142	4.78	35.75	59.5	73	96.5	135.25	33.79013

Продолжение приложения А

№	Mean	SD	Min	Max	SE	2.5%	25%	Median (50%)	75%	97.5%	CV
KY	50.29	9.75	34	68	2.37	34	45	50	54	67.6	19.38755
VI	30.88	9.77	14	54	1.21	16.2	23	30	36	52.8	31.6386
Ширина 2-ой доли листа (x9)											
AS	32.55	7.33	15	47	1.19	21.48	27.25	32.5	37	47	22.5192
AU	29.37	8.06	19	53	1.55	19.65	23	29	33	47.15	27.44297
KO	68.45	19.11	31	101	3.43	34.75	53.5	69	80	98.75	27.91819
KY	47.35	7.51	38	63	1.82	38.4	42	44	53	61.4	15.86061
VI	26.98	8.09	13	50	1	15	22	26	32	45.6	29.98517
Ширина 3-ей доли листа (x10)											
AS	35.87	8.32	21	54	1.35	21	31	35.5	39.75	54	23.19487
AU	33.44	9.06	20	56	1.74	21.3	27	31	37.5	53.4	27.0933
KO	71.61	19.16	29	120	3.44	43.25	58	72	82.5	108	26.75604
KY	48.18	9.36	30	66	2.27	32.8	40	50	54	63.6	19.42715
VI	28.57	8.2	12	54	1.02	14	23	27	34	45.4	28.70144
Ширина 4-ой доли листа (x11)											
AS	32.05	6.6	15	49	1.07	17.78	29	32	36.75	42.52	20.59282
AU	29.7	8.89	18	58	1.71	19.3	23	29	32	50.2	29.93266
KO	69.68	21.73	27	125	3.9	37.5	57.5	67	77.5	124.25	31.18542
KY	45.53	9.3	35	69	2.26	35.4	38	44	52	63.4	20.42609
VI	26.89	7.95	11	44	0.99	14.6	21	27	31	42.4	29.56489
Ширина 5-ой доли листа (x12)											
AS	32.76	7.47	20	48	1.21	20	27.25	32	38	47.07	22.8022
AU	31.37	11.79	16	69	2.27	16.65	25.5	31	33.5	60.55	37.58368
KO	77.65	23.35	34	135	4.19	44.5	61	78	89.5	127.5	30.07083
KY	49.29	14.26	25	76	3.46	26.2	39	51	56	73.6	28.93082

Продолжение приложения А

№	Mean	SD	Min	Max	SE	2.5%	25%	Median (50%)	75%	97.5%	CV
VI	30.02	10.1	13	55	1.25	15	23	29	36	51.8	33.64424
Глубина рассечения листовой пластины (x13)											
AS	44.18	10.23	23	68	1.66	26.7	36.25	43.5	49	67.07	23.15527
AU	41.37	10.74	27	70	2.07	27.65	33.5	38	45.5	64.8	25.96084
KO	84.16	17.7	38	127	3.18	54.5	74	80	95	114.25	21.03137
KY	62.47	10.9	43	86	2.64	44.6	56	64	67	82.8	17.44838
VI	40.31	10.93	19	63	1.36	22.2	32	38	48	58.8	27.11486
Глубина рассечения 1-ой доли (x14)											
AS	20.37	6.44	9	34	1.04	9.92	16.25	19.5	25.25	32.15	31.61512
AU	19.33	11.04	7	57	2.12	8.3	12	16	22	47.25	57.1133
KO	63.42	21.61	31	108	3.88	34	45	60	78	100.5	34.07442
KY	32.41	8.9	19	55	2.16	19.4	30	31	33	53.4	27.46066
VI	24.66	7.74	10	40	0.96	12	19	24	29	39.4	31.38686
Глубина 1-го рассечения 2-ой доли (x15)											
AS	15.87	5.07	5	26	0.82	6.85	13	16	19.75	25.07	31.94707
AU	13.33	4.33	8	25	0.83	8	10	12	15.5	22.4	32.48312
KO	41.03	12.19	20	73	2.19	23.75	31.5	42	47.5	68.5	29.70997
KY	25.76	6.97	15	39	1.69	15	22	26	29	38.2	27.05745
VI	18.06	6.26	7	38	0.78	9	14	18	20	34.6	34.66224
Глубина 2-го рассечения 2-ой доли (x16)											
AS	17.53	4.65	10	28	0.75	10.93	14	17	20	27.07	26.52596
AU	15.22	5.33	9	32	1.03	9	12	14	16.5	28.1	35.01971
KO	44.58	14.79	20	83	2.66	23	34.5	43	50	79.25	33.17631
KY	26.76	6.56	16	39	1.59	16.8	22	28	30	37.8	24.5142
VI	19.94	6.71	5	38	0.83	9.2	16	19	23	37	33.65095

Продолжение приложения А

№	Mean	SD	Min	Max	SE	2.5%	25%	Median (50%)	75%	97.5%	CV
Глубина 1-го рассечения 3-ей доли (x17)											
AS	17.26	4.75	9	28	0.77	9	14.25	16.5	19	27.07	27.52028
AU	16.19	4.63	9	29	0.89	9	13.5	15	18	27.05	28.5979
KO	46.65	13.15	18	74	2.36	25.5	38.5	43	54.5	71	28.18864
KY	27.24	7.96	17	44	1.93	17.4	20	25	33	41.2	29.22173
VI	18.92	5.36	5	38	0.67	8.6	16	19	22	28.2	28.32981
Глубина 2-го рассечения 3-ей доли (x18)											
AS	18.08	5.45	8	37	0.88	9.85	15	17	20.75	27.75	30.14381
AU	16.33	5.05	10	31	0.97	10	12	16	19.5	25.8	30.92468
KO	45.06	12.25	18	69	2.2	26.25	36	44	52	68.25	27.18597
KY	29.18	8.57	19	51	2.08	19	22	28	33	47	29.36943
VI	20.23	6.11	6	39	0.76	10.6	17	20	24	33.8	30.20267
Глубина 1-го рассечения 4-ой доли (x19)											
AS	16.03	4.8	8	30	0.78	8	14	16	18	27.22	29.94386
AU	15.44	5.85	8	31	1.13	8	11.5	14	18.5	29.05	37.8886
KO	46.68	13.55	19	85	2.43	25.75	36.5	48	56	70.75	29.02742
KY	27.88	9.14	16	50	2.22	17.2	23	25	31	47.6	32.78336
VI	18.54	5.87	6	31	0.73	8.6	15	19	22	29.4	31.66127
Глубина 2-го рассечения 4-ой доли (x20)											
AS	14.97	4.26	9	25	0.69	9	12	15	17	23.15	28.45691
AU	14.67	5.55	8	28	1.07	8.65	10	15	16	28	37.83231
KO	41.68	11.29	21	69	2.03	23.25	34	42	48.5	61.5	27.08733
KY	23.94	6.68	8	33	1.62	10.8	21	25	30	32.2	27.90309
VI	17.48	5.8	7	31	0.72	8.6	13	16	22	29.4	33.18078

Окончание приложения А

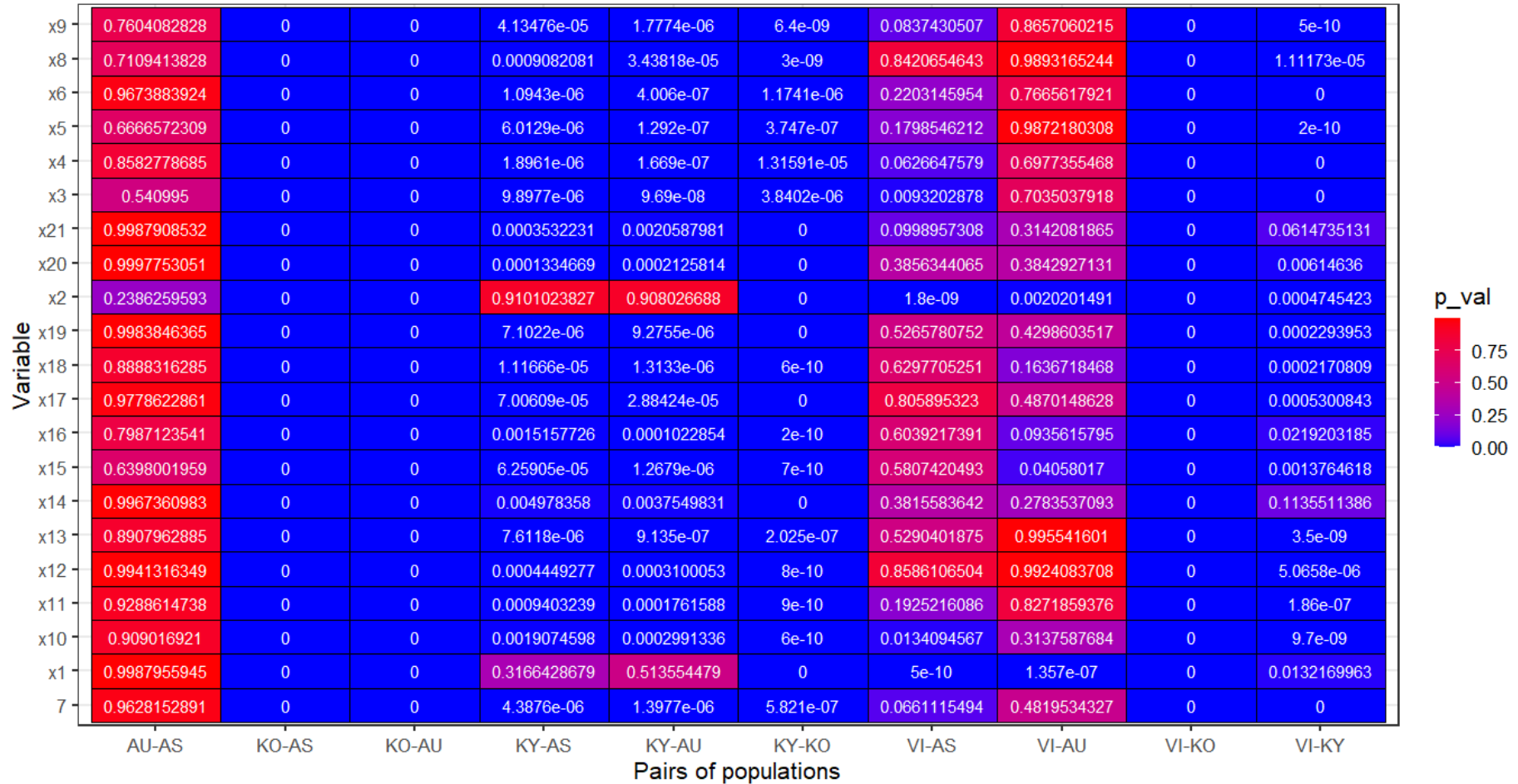
№	Mean	SD	Min	Max	SE	2.5%	25%	Median (50%)	75%	97.5%	CV
Глубина рассечения 5-ой доли (x21)											
AS	18.11	5.01	9	29	0.81	10.85	15	17.5	21	27.15	27.66427
AU	18.85	7.26	9	39	1.4	9	13.5	19	21	35.75	38.51459
KO	61.13	20.73	30	118	3.72	30.75	47	62	70	104.5	33.91134
KY	31.59	8.4	13	46	2.04	16.2	27	32	35	45.6	26.59069
VI	23.63	8.17	10	43	1.01	11.6	17	23	28	40.8	34.57469

Примечание к приложению А:

- Mean – среднее значение
- SD – стандартное отклонение
- SE – стандартная ошибка
- Median – медианное значение
- CV – коэффициент вариации

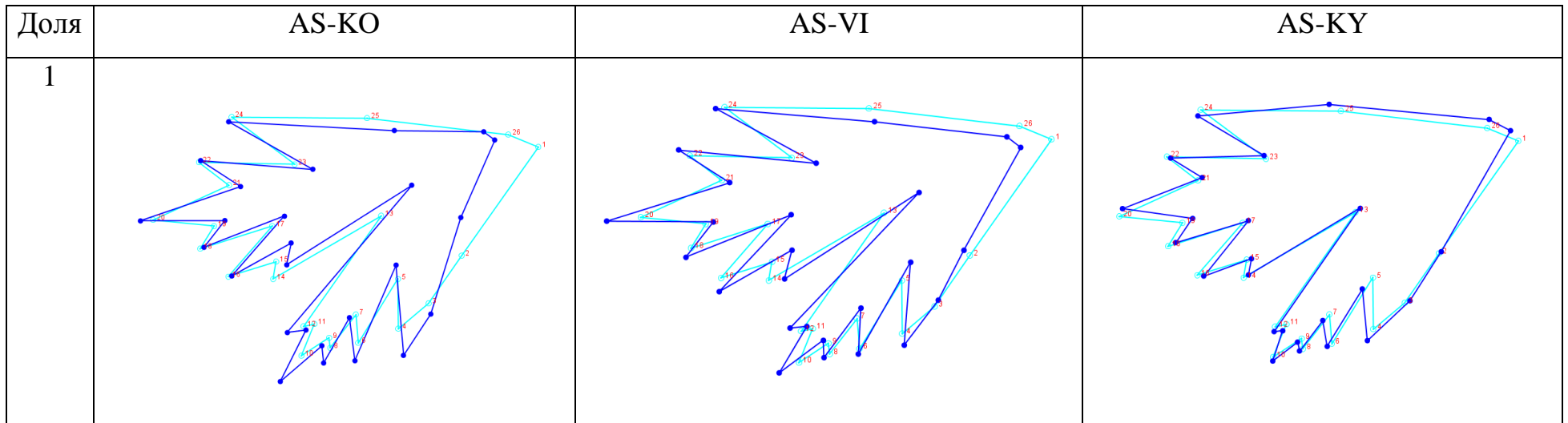
ПРИЛОЖЕНИЕ Б

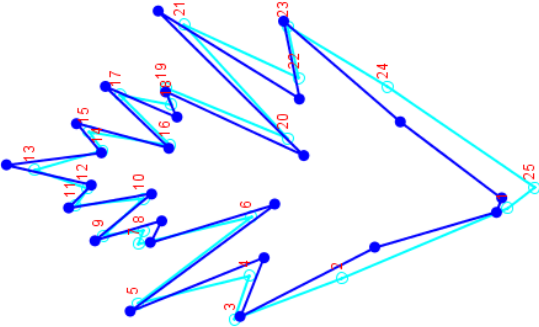
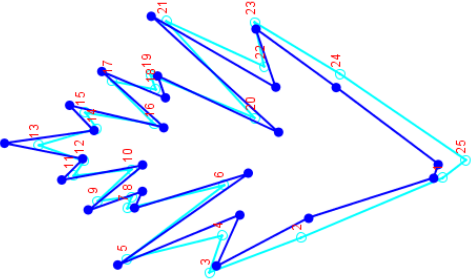
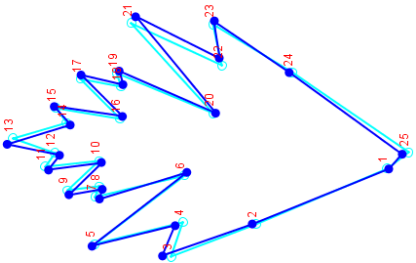
Результаты множественного попарного теста Тьюки



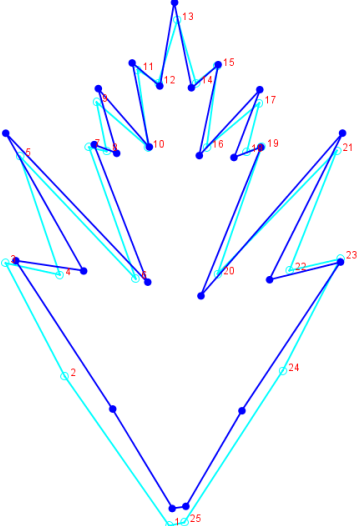
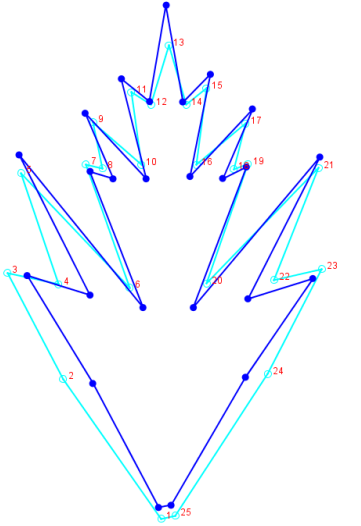
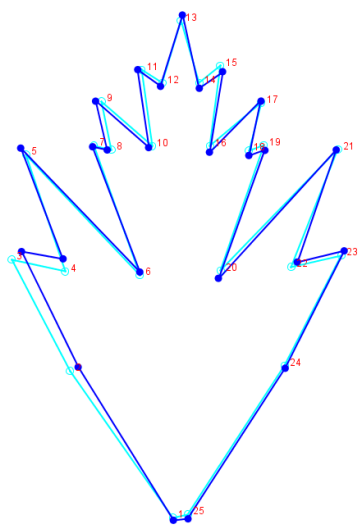
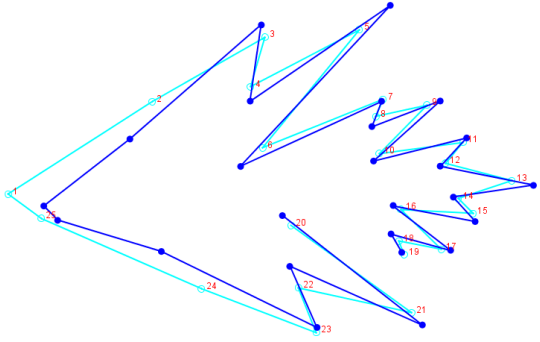
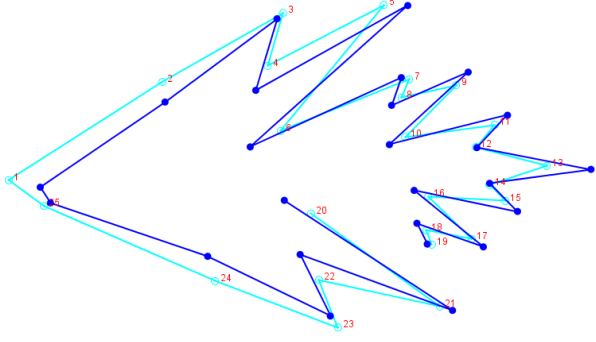
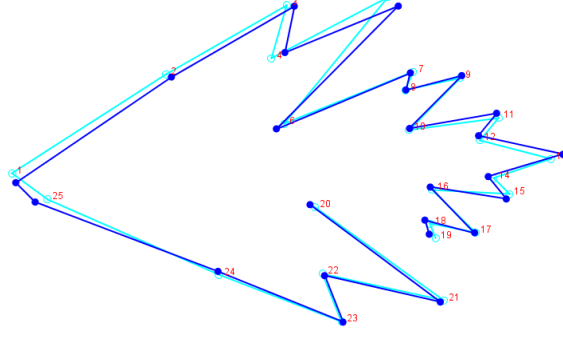
ПРИЛОЖЕНИЕ В

Сравнение средних форм долей листовых пластинок для пар AS-KO, AS-VI и AS-KY

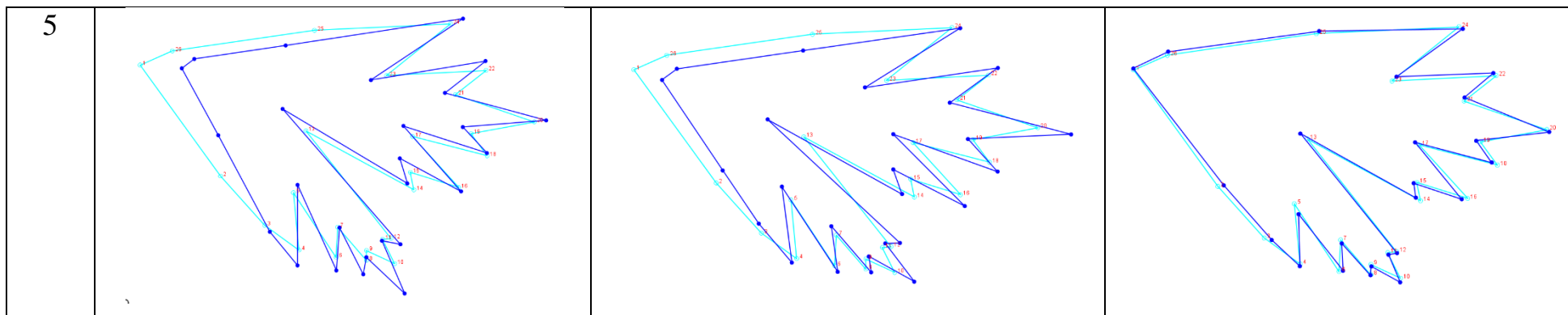


2			
Доля	AS-KO	AS-VI	AS-KY

Продолжение приложения В

3				
4				
Доля	AS-KO		AS-VI	AS-KY

Продолжение приложения В

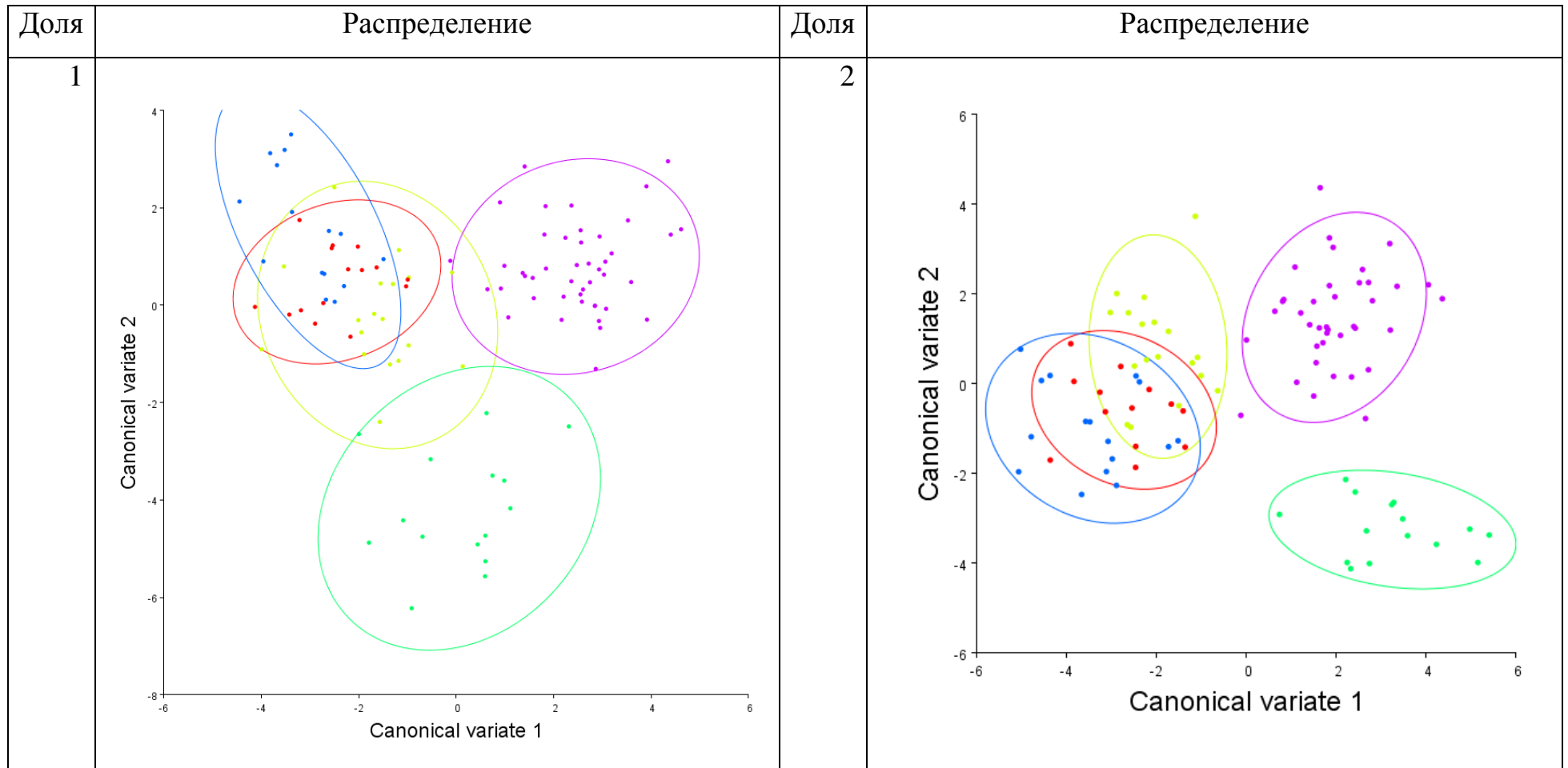


Примечание к приложению В:

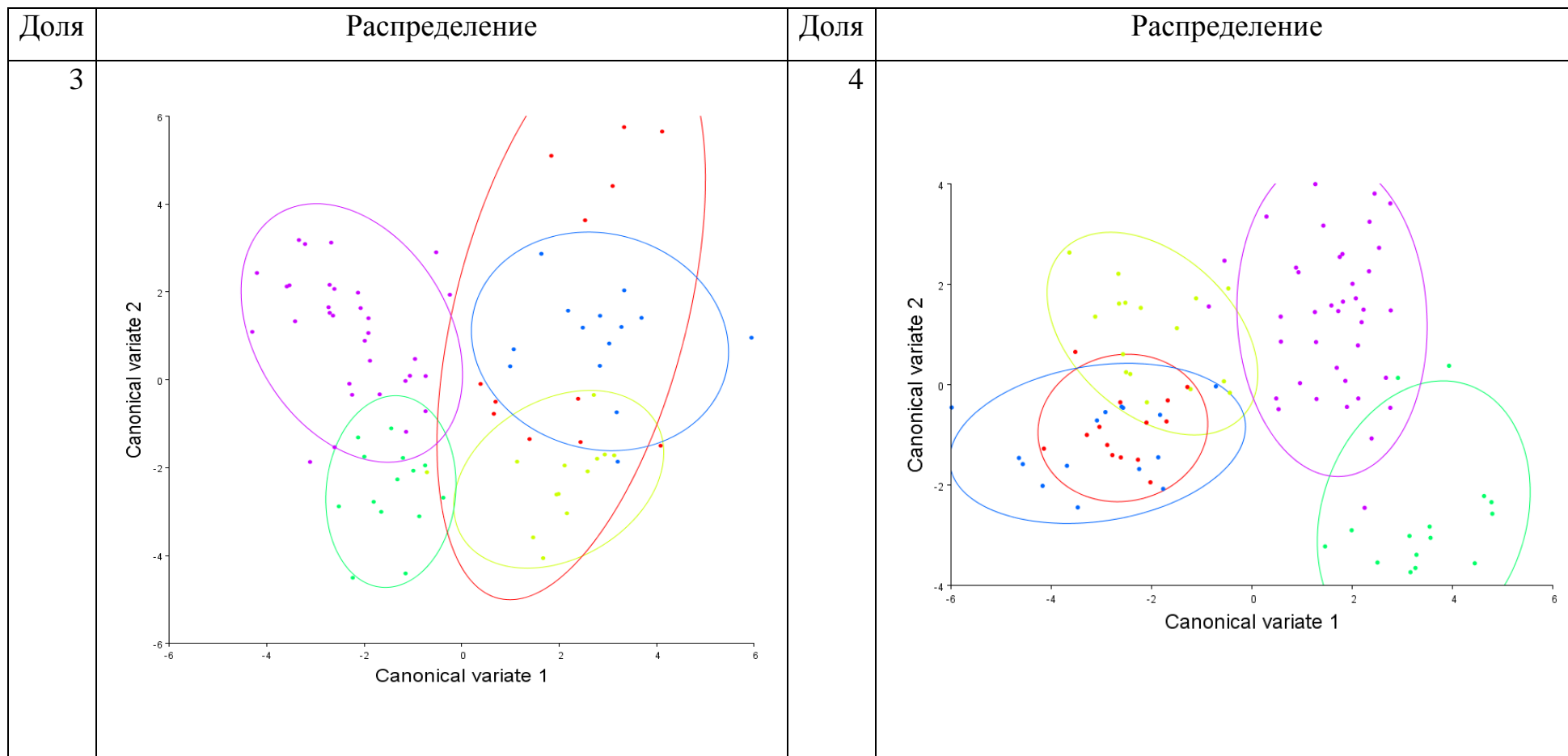
- Тёмно-синий – *T. asiaticus*
- Светло-синий – другой вид

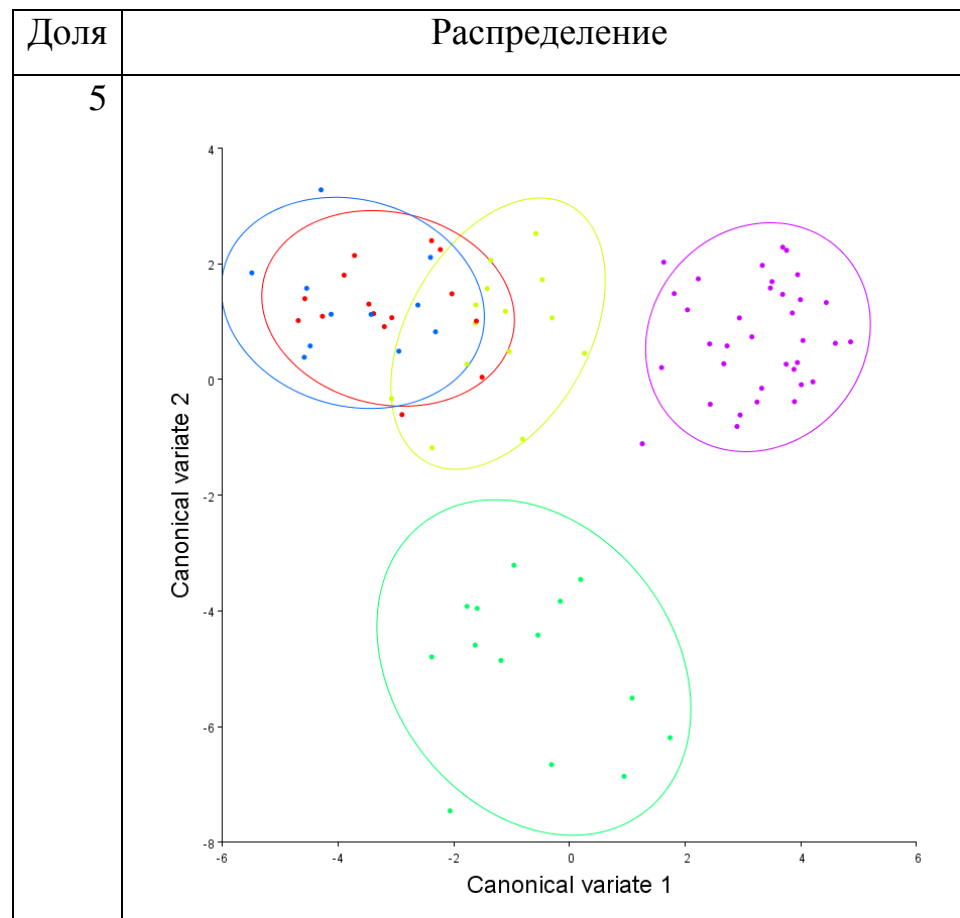
ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Распределение форм долей листовых пластинок в пространстве канонических переменных



Продолжение приложения Г





Примечание к приложению Г: красный – *T. asiaticus*, жёлтый – *T. austrosibiricus*, зелёный – *T. kolonok*, синий – *T. kytmanovii*, фиолетовый – *T. vitalii*.

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» июль 2023 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Морфологическая, генетическая изменчивость и филогения видов р. *Trollius*
(Ranunculaceae) в Красноярском крае и Хакасии»

06.04.01 «Биология»

06.04.01.06 «Геномика и биоинформатика»

Руководитель	 подпись, дата 13.06.23	зав. кафедрой, д.б.н. должность, ученая степень	<u>И.Е. Ямских</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата 13.06.23		<u>И.Р. Путилин</u> инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	н.с. ЗСО ИЛ СО РАН, к.б.н. должность, ученая степень	<u>И.В. Тихонова</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2023