

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК: 575.174.015.3:582.99.1

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-149-159



Сравнительный анализ генетического полиморфизма в популяциях *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) в Республике Алтай

Е. В. Жмудь¹, И. Н. Кубан¹, А. А. Ачимова², М. Б. Ямтыров², О. В. Дорогина¹

¹Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

²Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Горно-Алтайский ботанический сад, Шебалинский район, Республика Алтай, Россия

Автор, ответственный за переписку: Елена Викторовна Жмудь, elenazhmu@gmail.com

Актуальность. *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin (Asteraceae) – редкий вид для Республики Алтай (РА). Цель данного исследования – в сравнительном плане охарактеризовать генетический полиморфизм *Rhaponticum carthamoides* для введения в культуру образцов из наиболее генетически гетерогенных ценопопуляций, произрастающих в РА.

Материалы и методы. Вид изучен с использованием ISSR-маркеров в пяти ценопопуляциях (ЦП). ДНК выделена из высушенных листьев на основе STAB-метода. Апробированы 17 ISSR-праймеров, из которых отобраны семь наиболее информативных.

Результаты и заключение. Анализ показал, что особи из пяти ЦП на дендрограмме распределились по трем группам сходства. Отдельная клада образована особями из двух ЦП Катунского заповедника. Особи одной из них, произрастающей на хорошо прогреваемых южных склонах, характеризовались более высокой генетической гетерогенностью по сравнению с остальными. Наиболее высокое внутривидовое и межвидовое сходство по распределению фрагментов ДНК обнаружено в двух ЦП, произрастающих в местообитаниях с наименьшей географической удаленностью друг от друга. Достоверно более низкое сходство обнаружено между растениями небольшой по площади изолированной популяции на территории заказника ООПТ «Шавлинский» и особями из других ЦП. Можно предположить, что одна из основных причин наименьшего сходства этой популяции с другими – произрастание в непосредственной близости от подножия перевала в Ачик (Онгудайский район, абсолютная высота 2300 м н. у. м.). Такое местоположение может ограничивать обмен генетической информацией с растениями из других популяций.

Ключевые слова: ISSR-маркеры, краснокнижный вид, генетическая и географическая дистанции, популяционная дифференциация

Благодарности: работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-44-040003, р_а) и при частичной поддержке средств в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (AAAA-A21-121011290025-2).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Жмудь Е.В., Кубан И.Н., Ачимова А.А., Ямтыров М.Б., Дорогина О.В. Сравнительный анализ генетического полиморфизма в популяциях *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) в Республике Алтай. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):149-159. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-149-159

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-149-159

Comparative analysis of genetic polymorphism in *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) populations by ISSR markers in the Altai Republic

Elena V. Zhmud¹, Irina N. Kuban¹, Altyнай A. Achimova², Maxim B. Yamtyrov², Olga V. Dorogina¹

¹ Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Gorno-Altai Botanical Garden, Shebalinsky District, Altai Republic, Russia

Corresponding author: Elena V. Zhmud, elenazhmu@gmail.com

Background. *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin (Asteraceae) is a rare species for the Altai Republic (AR). The purpose of this study was to characterize the genetic polymorphism of *Rhaponticum carthamoides* at the inter- and intrapopulation level in a comparative analysis for subsequent selection of seed samples from the genetically most heterogeneous natural populations of the AR for practical purposes.

Materials and methods. The species was studied for ISSR variability in five habitats in the AR. DNA from dried leaves of *R. carthamoides* was isolated using the STAB method. For testing seventeen ISSR primers were used, seven of which were selected as most informative ones.

Results and conclusion. The analysis showed that individual plants from five cenopopulations (CP) were distributed into three groups of similarity on the dendrogram. A separate clade was formed by plant samples from two CPs of the Katun Nature Reserve (KNR). Samples of one of those CPs grew on well-warmed southern slopes and exhibited a higher genetic heterogeneity than the others. The highest intrapopulation and interpopulation similarity in the distribution of DNA fragments was also found in two CPs from habitats with the smallest geographic distance from each other. Representatives of a separate population, least in size and number of individuals in the KNR, showed a high level of similarity in the distribution of DNA fragments. Significantly lower coefficients of genetic similarity with other CPs were found in plants from a small isolated CP from the Shavlinsky Protected Area. It can be assumed that one of the main reasons for the least genetic similarity of this population with others is its location in the immediate vicinity of the foothill at the pass to Achik (Ongudaysky District; absolute height: 2300 masl). This location can be a limiting factor for the exchange of genetic information with individuals from other populations.

Keywords: ISSR markers, Red Data Book species, genetic and geographic distances, population differentiation

Acknowledgements: the research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 20-44-040003, p_a) and partially from the funds within the framework of the state task assigned to the Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, a project entitled "Analysis of biodiversity, conservation and restoration of rare and resource plant species using experimental methods" (AAAA-A21-121011290025-2).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Zhmud E.V., Kuban I.N., Achimova A.A., Yamtyrov M.B., Dorogina O.V. Comparative analysis of genetic polymorphism in *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) populations by ISSR markers in the Altai Republic. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):149-159. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-149-159

Введение

При решении задач, касающихся рационального использования полезных растений, немаловажную роль играет фактор генетической гетерогенности растений, семена которых взяты из природных условий для реинтродукции, для введения в культуру и отбора наиболее ценных генотипов. Кроме того, для разработки эффективных программ по сохранению генофонда редких видов растений важным критерием является оценка их генетической изменчивости на меж- и внутривидовом уровне. Поэтому работа по восстановлению вида должна включать исследование изменчивости и динамики изменчивости в популяциях редких и близких к ним полиморфных видов, а также популяционно-генетической структуры вида, для чего в последние десятилетия все шире используются молекулярные методы (Nechaeva et al., 2013; Pakhrou et al., 2017; Bhattacharyya, van Staden, 2018; Nigmatullina et al., 2018). Их роль важна для решения вопросов, касающихся не только таксономии, филогении, эволюции, но и для изучения генетической вариабельности и выявления инбридинговой депрессии в природных популяциях. А полевые эксперименты необходимы для проверки гипотез, отражающих долгосрочную экологическую и эволюционную историю видов (Anderson et al., 2011). В природных популяциях может нарушаться эволюционно сложившееся соотношение компонент, характеризующих внутри- и межпопуляционную изменчивость. Это может происходить, например, в результате антропогенного воздействия. В процессе любой эксплуатации природных ресурсов нарушаются эволюционно сложившиеся уровни генного разнообразия. Во всех случаях непропорциональное изъятие одних генотипов и недоиспользование других либо их неравномерное воспроизводство порождают неблагоприятные процессы, приводящие к снижению приспособленности популяций. Механизм, лежащий в основе таких явлений, сопряжен не только с уменьшением генетического разнообразия, но и с его увеличением по отношению к исторически сложившемуся оптимуму (Altukhov, 2003).

В местообитаниях изолированных или с наличием антропогенной нагрузки также может произойти обеднение генетической структуры популяции из-за нарушения процессов естественного семенного возобновления. По литературным данным, полученным для сосудистых растений, изучение полиморфизма ISSR-маркеров позволяет дать оценку межвидовой и внутривидовой генетической гетерогенности популяций (Nabieva et al., 2020). Исследования в изолированных местообитаниях должны проводиться в сравнительном плане с популяционно-генетическими показателями у особей того же вида, произрастающих в охраняемых местообитаниях с отсутствием антропогенной нагрузки. Согласно литературным данным, ненарушенные экосистемы эффективны как резервуар генетического разнообразия, так как способны к поддержанию генетической гетерогенности, аналогичной уровню исходных диких популяций (Cabrera-Toledo et al., 2020). Только на основе сохранения, восстановления и имитации исторически обусловленных направлений и интенсивности генетических информационных потоков возможно длительное существование охраняемого сообщества и его способность целесообразно реагировать на те или иные внешние воздействия, которые не выходят за пределы исторически сложившегося оптимума (Altukhov, 2004).

Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin (Asteraceae) – корневищное поликарпическое растение с монокарпическими генеративными побегами. Вид охраняется в Республике Алтай (РА) (Red Data Book..., 2017). Надземная и подземная части у этого вида используются в качестве кормового, лекарственного сырья и в косметической промышленности (Zhmd et al., 2022). Развитие особей в местах с наличием антропогенной нагрузки лимитировано активным выпасом, проведением массовых, нерегулируемых заготовок корневищ. Эти факторы создают угрозу нарушения семенного возобновления. Самым опасным для редких видов последствием нарушения естественного семенного возобновления может стать увеличение гомозиготных особей в популяциях в местообитаниях с антропогенным воздействием. Это ведет к выпадению видов из травостоя, несмотря на наличие вегетативного возобновления (Zhmd et al., 2022). При антропогенном воздействии происходит нарушение вегетативного, а затем и семенного размножения, что может приводить также к сокращению генетического разнообразия популяций. Согласно литературным данным, *R. carthamoides*, как правило, полностью исчезает в местах, где проводится выпас скота и ведется промышленный сбор сырья (Nekratova et al., 2020). Нами применен метод ISSR-маркирования с целью исследования сравнительного генетического полиморфизма. Основой этого метода является анализ полиморфных участков ДНК между микросателлитами, широко представленными в геномах растений. Подобных исследований с использованием данного метода у представителей *R. carthamoides* до недавнего времени не проводилось. Поэтому на сегодняшний день уровень полиморфизма и популяционно-генетическая структура этого вида на Алтае остается малоизученной.

Актуальность данных исследований определяется возможностью выявления перераспределения генетического материала в популяциях у этого редкого для Республики Алтай вида, так как уменьшение внутривидовой компоненты и нарастание межпопуляционной может привести к деградации популяций *R. carthamoides* (Dorogina, Zhmd, 2020).

Цель данного исследования – сравнительная характеристика генетического полиморфизма *Rhaponticum carthamoides* на меж- и внутривидовом уровне для сохранения генофонда этого вида и отбора образцов семян из генетически наиболее гетерогенных природных популяций Республики Алтай для введения в культуру.

Для этого выполнены следующие задачи:

- собран материал (фрагменты листовых пластинок) для исследования в ценопопуляциях вида в различных эколого-географических условиях;
- подобраны условия в соответствии с методикой для проведения ПЦП-анализа;
- проведен анализ полиморфизма ISSR-маркеров в популяциях *R. carthamoides*;
- выявлены наиболее гетерогенные природные популяции для последующего отбора образцов семян для введения в культуру.

Материалы и методы

Материал (фрагменты листовых пластинок) *R. carthamoides* собран в Республике Алтай в 2019–2020 гг. в пяти ценопопуляциях (ЦП). ЦП 1 – Семинский перевал (Онгудайский район); ЦП 2 – у подножия горы Красная

(Усть-Коксинский район, окр. с. Кайтанак); ЦП 3 – особо охраняемая природная территория (ООПТ) заказник «Шавлинский» (Онгудайский район, окр. с. Белый Бом). В Катунском заповеднике (КЗ, Усть-Коксинский район) исследованы особи в ЦП 4 и ЦП 5. В качестве дополнительной характеристики для каждой популяции определено проективное покрытие (ПП, %) (табл. 1, рис. 1).

В пределах ЦП № 3 особи вида, вероятно, подвергались антропогенному воздействию, так как у большей части особей отсутствовали соцветия, вероятно, в результате выпаса.

ДНК из высушенных листьев *R. carthamoides* выделена на основе STAB-метода с некоторыми модификациями (Doyle, Doyle, 1987). Для апробации использованы 17 ISSR-праймеров, из которых отобраны семь наиболее информативных. Они характеризовались полиморфным и воспроизводимым паттерном. Это 17898A, 17899B, HB-10, M-1, HB-12, UBS-857, UBC-807 (Vasilyeva et al., 2018). ПЦР проведена на амплификаторе C1000 (Bio-Rad, USA). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. В ее составе использованы следующие компоненты: 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Medigen, Russia); 2,7 mM MgCl₂; 0,8 mM ISSR-праймер (Medigen, Russia); раствор ДНК – 2 мкл; вода mQ H₂O – 2 мкл. Изучение полиморфизма ISSR-маркеров

проведено в листьях, высушенных в полевых и лабораторных условиях, у 34 особей *R. carthamoides*.

Амплификация состояла из нескольких этапов: денатурация ДНК в течение 90 с при 94°C и 35 циклов, каждый из которых включал 40 с при 94°C, 45 с – отжиг праймера и 90 с при 72°C (табл. 2).

Продолжительность заключительного этапа пролонгирования нуклеотидной цепи составила 5 мин при 72°C. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1,5-процентном агарозном геле в буфере 1x TAE при напряжении 4 В/см. Для статистической обработки данных использовали пакеты программ TREECON (Van de Peer, De Wachter, 1994) и GenALEX 6.51 для MS Excel с определением доли полиморфных локусов, абсолютного числа аллелей (Na), эффективного числа аллелей (Ne) и ожидаемой гетерозиготности (He) (Nei, 1987). Каждый ISSR-маркер рассматривался как доминантный, и отмечалось его наличие (1) либо отсутствие (0). Генетические дистанции рассчитывали по Нею. Уровень полиморфизма (P, %) каждого праймера рассчитывали по формуле $P = 100 * N_p / N$, где N_p – число полиморфных фрагментов, N – общее число фрагментов (Nei, Li, 1979). Анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости проводили с использованием метода ANOVA.

Таблица 1. Характеристика местообитаний *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin в Республике Алтай

Table 1. Characteristics of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin habitats in the Altai Republic

№ ЦП / CP No.	Название местонахождения / Name of the CP location	Высота н. у. м., м; экспозиция (эксп.) склона; координаты / Height, masl; slope exposure; coordinates	Название фитоценоза; общее проективное покрытие, %; сопутствующие виды растений / Name of the phytocenosis; total projective cover, %; other plant species in the location
1	Онгудайский район (р-н), Семинский перевал	1850 м; склон северной эксп.; 51°13'51" N, 85°21'07" E	Редкостойный кедровый лес; 95–98%; <i>Bupleurum aureum</i> Fisch. ex Hoffm., <i>Hedysarum neglectum</i> Ledeb., <i>Geranium albiflorum</i> Ledeb., <i>Poa palustris</i> L., <i>Rhaponticum carthamoides</i> (Willd.) Iljin, <i>Trollius altaicus</i> C.A. Mey.
2	Усть-Коксинский р-н, окр. с. Кайтанак, подножие горы Красная	1830 м; склон северной эксп.; 50°10'32" N, 85°22'48" E	Субальпийский луг среди редкостойного кедрового леса; 50–60%; <i>Alopecurus pratensis</i> L., <i>Aquilegia glandulosa</i> Fisch. ex Link, <i>Bupleurum aureum</i> , <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Geranium albiflorum</i> , <i>G. sylvaticum</i> L., <i>Poa sibirica</i> Roshev., <i>R. carthamoides</i> , <i>Polygonum bistorta</i> L., <i>Ranunculus grandifolius</i> C.A. Mey., <i>Sanguisorba officinalis</i> L., <i>Trollius asiaticus</i> L., <i>Viola altaica</i> Ker-Gawl.
3	Онгудайский р-н, окр. с. Белый Бом (ООПТ «Шавлинский»)	2100 м; склон южной эксп.; 50°16' N, 87°12'31" E	Субальпийский луг; 80–90%; <i>Aconitum altaicum</i> Steinb., <i>Geranium albiflorum</i> , <i>Poa sibirica</i> , <i>Polygonum bistorta</i> , <i>R. carthamoides</i> , <i>Trollius altaicus</i>
4	КЗ*, Усть-Коксинский р-н, бер. р. Зайчиха	1594 м; склон южной эксп.; 49°21'36" N, 85°26'24" E	Опушка редкостойного березового леса с кустарником; 80–90%; <i>Lonicera tatarica</i> L., <i>Bupleurum aureum</i> , <i>Chamaenerion angustifolium</i> (L.) Holub., <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Galium boreale</i> L., <i>Lathyrus gmelinii</i> Fritsch., <i>R. carthamoides</i> , <i>Saussurea alpina</i> (L.) DC., <i>Veratrum lobelianum</i> Bernh., <i>Viola altaica</i>
5	КЗ, Усть-Коксинский р-н, перекаат из оз. Верх. Поперечное в оз. Поперечное	2056 м; склон северной эксп.; 49°56'55" N, 86°06'05" E	Субальпийский луг; <i>Pinus sibirica</i> Du Tour, <i>Betula rotundifolia</i> Spach, <i>Aconitum anthoroideum</i> DC., <i>Hedysarum theinum</i> Krasnob., <i>Poa pratensis</i> L., <i>Rhodiola rosea</i> L., <i>Rumex confertus</i> Willd., <i>Salix</i> sp., <i>Sanguisorba alpina</i> Bunge, <i>Saussurea alpina</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i> L., <i>Veratrum lobelianum</i>

Примечание: * КЗ – Катунский заповедник; ЦП – ценопопуляция

Note: * KZ – Katun Nature Reserve; CP – cenopopulation

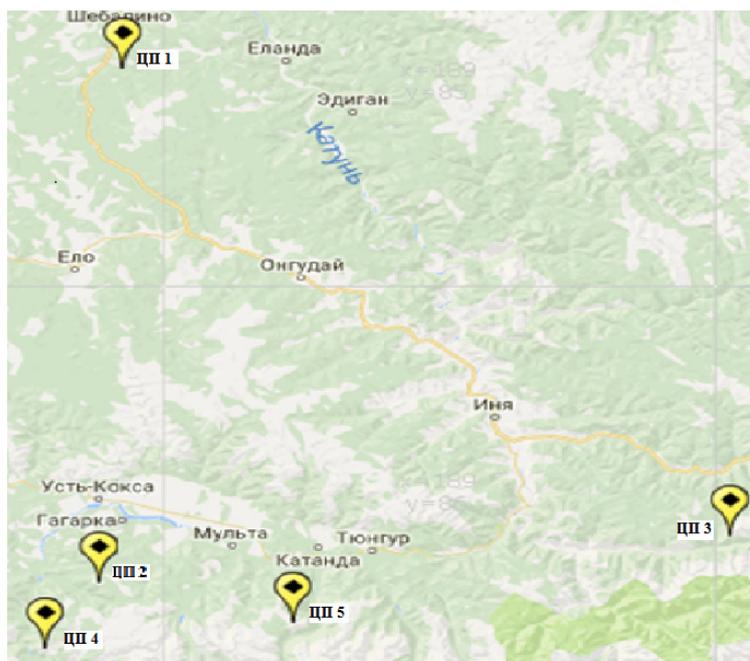


Рис. 1. Местонахождения исследованных растений *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin в Республике Алтай (обозначения: ЦП 1 – Онгудайский район, Семинский перевал; ЦП 2 – Усть-Коксинский район, окр. с. Кайтанак, подножие горы Красная; ЦП 3 – ООПТ заказник «Шавлинский»; ЦП 4 и ЦП 5 – Катунский заповедник)

Fig. 1. Locations of the investigated *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin plants in the Altai Republic (designations: ЦП 1 – Seminsky Pass, Ongudaysky District; ЦП 2 – Krasnaya Mountain's foothill, vicinity of Kaytanak Village, Ust-Koksinsky District; ЦП 3 – Shavlin'sky Protected Area; ЦП 4 and ЦП 5 – Katun Nature Reserve)

Таблица 2. Характеристика ISSR-спектров в популяциях *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin
Table 2. Characterization of ISSR patterns for *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin populations

Название праймера / Primer name	Нуклеотидная последовательность 5' - 3' / Nucleotide sequence 5' - 3'	Температура отжига, °С / Annealing temperature, °C	Количество фрагментов Number of fragments		Уровень полиморфизма праймера / Primer polymorphism level
			амплифицированных / amplified	полиморфных / polymorphic	
UBC-807	(AG)8T	52	10	8	80,0
M-1	(AC)7AC	56	13	12	92,3
17899 A	(CA)6AG	47	13	12	92,3
17898 B	(CA) 6GT	42	15	13	86,7
HB-10	(CAC) 3GC	51	9	7	77,8
HB-12	(GA) 6CC	42	13	11	84,6
UBC-857	(AC) 8 YG	55	14	13	92,0

Результаты

В результате исследования *R. carthamoides* в природных условиях обнаружено, что для ЦП 1 занимаемая площадь составила $800 \times 800 \text{ м}^2$, а ПП варьировало в пределах 80–100% особей в травостое. В ЦП 2, произрастающей на площади около $900 \times 500 \text{ м}^2$, величина ПП приближалась к 50–80%. В ЦП 5, на территории $1300 \times 1400 \text{ м}^2$ в Катунском заповеднике, величина ПП особей этого вида приближалась к 50%. Величина ПП для особей из ЦП 3, произрастающей на площади $200 \times 600 \text{ м}^2$, не превышала 10–30%, что мы обнаружили также и в ЦП 5, занимавшей наименьшую площадь – около $10 \times 30 \text{ м}^2$.

При тестировании 17 ISSR-праймеров отобраны семь наиболее информативных (см. табл. 2). Всего выявлено 78 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 76 – полиморфные. Число амплифицированных фрагментов ДНК зависело от использованного праймера. С помощью праймера (СА)6GT выявлено наибольшее число локусов (15). Число полиморфных локусов находилось в пределах от 8 до 13, а доля полиморфных локусов варьировала от 77,8 до 92,3%. На электрофореграмме можно видеть вариабельность ISSR-образцов *Rhaponticum carthamoides* в Республике Алтай при использовании праймера UBS-857 (рис. 2).

Она занимала локальное местообитание на южном склоне у подножия перевала с абсолютной высотой 2300 м, и ее особи находились в определенной изоляции от представителей вида из других изученных ЦП.

Из таблицы 3 следует, что средние значения коэффициентов внутривидового сходства у растений из четырех изученных ЦП, а также межвидового сходства, за исключением ЦП 3, высоки и не имели достоверных отличий.

Сравнение показало, что особи из ЦП 3 характеризовались максимальными отличиями в распределении ISSR-маркеров, то есть наименьшим сходством с исследованными образцами из других четырех ЦП, включая сравнительно близко произрастающие особи из ЦП 5. Это, вероятно, явилось результатом определенной географической изоляции ЦП 3, как обсуждалось выше.

По данным анализа ANOVA обнаружено, что доля внутривидовой изменчивости в исследованных популяциях *R. carthamoides* составляет 2/3 от общей генетической изменчивости (рис. 4).

Исходя из оценки генетического разнообразия, в изученных ЦП показатели ожидаемой и фактической гетерозиготности оказались близкими. Наибольшей гетерогенностью в распределении ISSR-маркеров характеризовались представители из ЦП 3 и ЦП 4, произрастающие

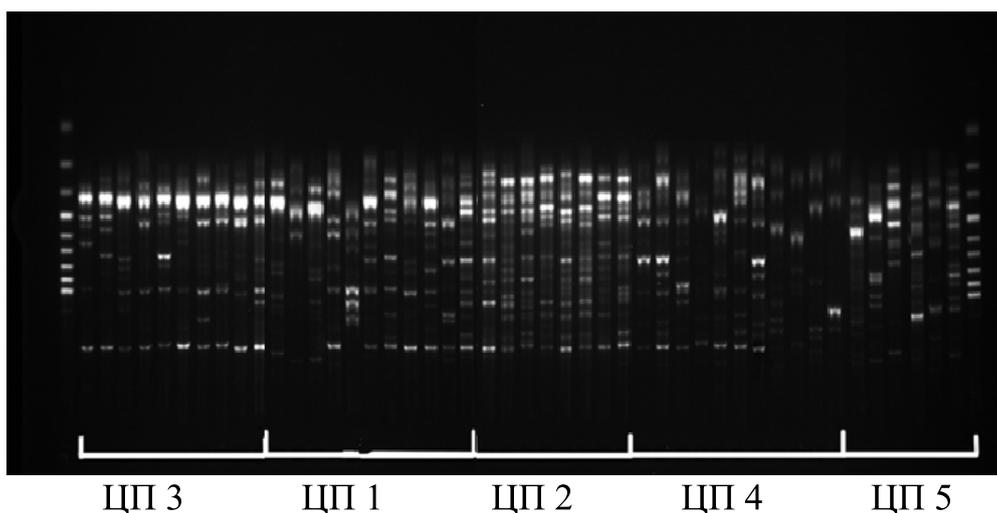


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером UBS-857 в популяциях *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin в Республике Алтай

Fig. 2. Electropherogram of amplification products with primer UBS-857 in populations of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin in the Altai Republic

На дендрограмме изученные особи *R. carthamoides* образовали три клады (рис. 3). В первую кладу вошли в основном особи из ЦП 4 и ЦП 5 из Катунского заповедника (5 и 6 особей соответственно). Вторая клада образована в основном особями из ЦП 1 и ЦП 2, произрастающими на Семинском перевале и у подножия горы Красная. Их генотипы между собой характеризовались высокой степенью сходства (77,4%) (табл. 3) и не формировали отдельные клады.

Особи из ЦП 3 расположены на дендрограмме автономно. При анализе средних коэффициентов сходства обнаружено, что для особей из этой ЦП характерно достоверно более низкое сходство (17,4; 18,7; 18,4% соответственно) по сравнению с растениями из других ЦП (см. табл. 3).

в изолированном местообитании ООПТ «Шавлинский» и в Катунском заповеднике соответственно (табл. 4). Условия в этих местообитаниях отличались тем, что особи из ЦП 3 произрастали на большей абсолютной высоте, а из ЦП 4 – на относительно небольших абсолютных высотах. Сходство заключалось в произрастании особей из этих ЦП на хорошо прогреваемых склонах южной экспозиции (см. табл. 1).

На основании анализа данных по географической (км) и генетической дистанции (табл. 5) обнаружено, что минимальными отличиями географических и генетических расстояний характеризовались особи из ЦП 4 и ЦП 5, произрастающие в Катунском заповеднике на относительно небольшом расстоянии друг от друга, что представляется естественным.

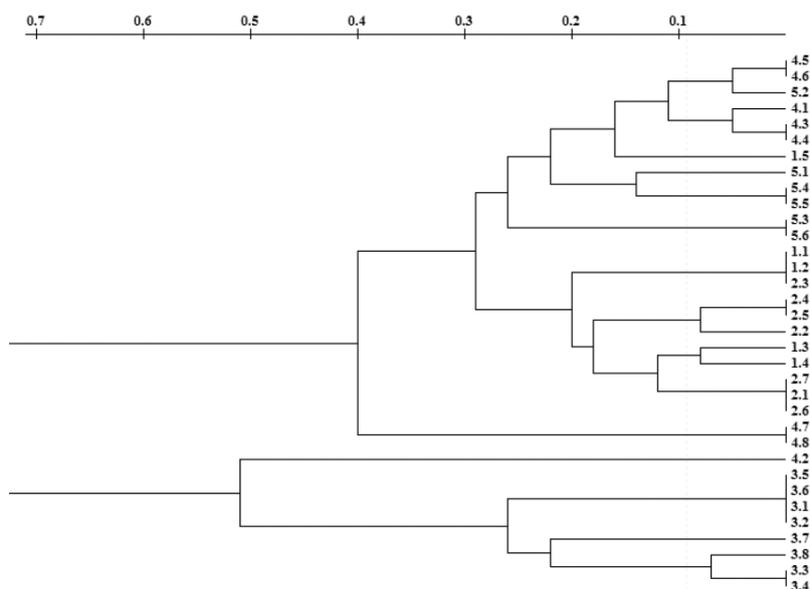


Рис. 3. Консенсусная (по двум праймерам UBS-857 и 17899A) дендрограмма, построенная на основе данных по ISSR-спектрам *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin через программу TREECON (верхняя шкала – генетические расстояния (Nei, Li, 1979); обозначения: ЦП 1 – особи № 1.1–№ 1.5; ЦП 2 – особи № 2.1–№ 2.7; ЦП 3 – особи № 3.1–№ 3.8; ЦП 4 – особи № 4.1–№ 4.8; ЦП 5 – особи № 5.1–№ 5.6)

Fig. 3. Consensus dendrogram (for two primers UBS-857 and 17899A) built on the basis of the data on the ISSR patterns of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin using the TREECON program (the upper scale is genetic distances (Nei, Li, 1979); designations: ЦП 1 – plant samples Nos. 1.1–1.5; ЦП 2 – samples Nos. 2.1–2.7; ЦП 3 – samples Nos. 3.1–3.8; ЦП 4 – samples Nos. 4.1–4.8; ЦП 5 – samples Nos. 5.1–5.6)

Таблица 3. Значения коэффициентов сходства внутри и между популяциями *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin в Республике Алтай

Table 3. Values of the coefficients of similarity within and between the populations of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin in the Altai Republic

№ ЦП / CP No.	M ± m	Cv, %	min	max
ЦП 1 ср	74,0 ± 2,9	8,7	65,5	81,8
1.2	77,4 ± 4,2	12,0	61,7	84,2
1.3	17,4 ± 0,6	7,1	16,0	19,4
1.4	69,8 ± 4,5	14,3	52,9	76,1
1.5	73,5 ± 3,1	9,4	62,4	79,8
ЦП 2 ср	87,5 ± 1,6	4,2	81,6	90,6
2.3	18,7 ± 0,4	4,6	17,3	19,4
2.4	71,5 ± 2,3	7,2	65,9	75,7
2.5	79,3 ± 4,5	12,6	71,4	90,3
ЦП 3 ср	82,3 ± 1,4	4,7	74,0	84,6
3.4	25,8 ± 2,8	30,2	13,5	31,0
3.5	18,4 ± 5,2	79,6	0,0	29,4
ЦП 4 ср	73,5 ± 4,4	15,9	52,0	81,9
4.5	74,9 ± 6,8	23,9	49,3	90,6
ЦП 5 ср	92,9 ± 0,8	2,0	89,5	94,5

Примечание: ЦП – ценопуляция; M – среднее значение; m – ошибка; Cv, % – коэффициент вариации; min – минимальное значение; max – максимальное значение

Note: CP – cenopopulation; M – mean value; m – error; Cv, % – coefficient of variation; min – minimum value; max – maximum value

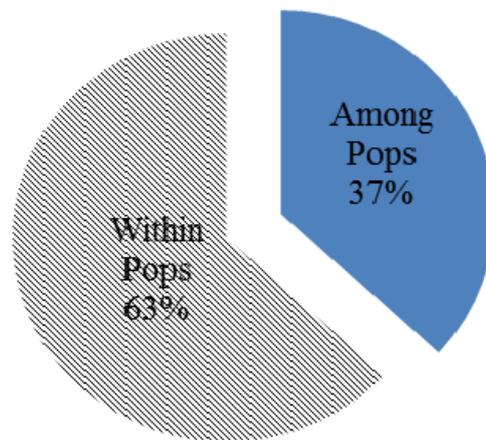


Рис. 4. Результаты ANOVA-анализа генетической изменчивости (%) у *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin в Республике Алтай

Fig. 4. ANOVA results for genetic variance (%) among *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin in the Altai Republic

Таблица 4. Параметры генетического разнообразия популяций *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin

Table 4. Genetic diversity parameters in *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin populations

№ ЦП / CP No.	He	uHe	Na	Ne	% P
ЦП 1	0,140 ± 0,075	0,155 ± 0,083	1,000 ± 0,327	1,246 ± 0,139	37,5
ЦП 2	0,103 ± 0,068	0,111 ± 0,073	0,750 ± 0,313	1,176 ± 0,118	25,0
ЦП 3	0,175 ± 0,065	0,187 ± 0,069	1,375 ± 0,324	1,273 ± 0,111	62,5
ЦП 4	0,291 ± 0,081	0,310 ± 0,086	1,625 ± 0,263	1,549 ± 0,167	75,0
ЦП 5	0,113 ± 0,074	0,123 ± 0,081	0,875 ± 0,295	1,208 ± 0,138	25,0

Примечание: ЦП – ценопопуляция; He – ожидаемая гетерозиготность; uHe – объективная ожидаемая гетерозиготность; Na – число аллелей; Ne – число эффективных аллелей; % P – процент полиморфных локусов

Note: CP – cenopopulation; He – expected heterozygosity; uHe – objective expected heterozygosity; Na – number of alleles; Ne – number of effective alleles; % P – percentage of polymorphic loci

Таблица 5. Параметры географической (км) и генетической дистанции популяций *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin

Table 5. Parameters of geographic (km) and genetic distances among *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin populations

№ ЦП / CP No.	ЦП 1 / CP 1	ЦП 2 / CP 2	ЦП 3 / CP 3	ЦП 4 / CP 4	ЦП 5 / CP 5
ЦП 1	–	122*	210	215	162
ЦП 2	0,022**	–	165	89	72
ЦП 3	0,522	0,483	–	177	100
ЦП 4	0,358	0,308	0,404	–	87
ЦП 5	0,318	0,284	0,657	0,087	–

Примечание: ЦП – ценопопуляция; * – географические расстояния; ** – генетические дистанции; прочерк означает идентичность параметров

Note: CP – cenopopulation; * – geographic distances; ** – genetic distances; a dash means identical parameters

Можно также предположить, что особи из ЦП 4 явились наиболее близкородственными с особями из ЦП 5 из-за географической близости. Минимальными генетическими отличиями характеризовались и особи из ЦП 1 и ЦП 2. Для особей из этих популяций характерно также сравнительно небольшое географическое расстояние (см. табл. 5). Особи, произраставшие в ЦП 1 и ЦП 3, в высокой степени отличались географически, поэтому их низкое генетическое сходство не вызывает удивления (см. табл. 5).

Сравнение остальных образцов показало, что особи из ЦП 3 максимально отличались по распределению ISSR-маркеров, то есть обладали наименьшим сходством с исследованными образцами в других четырех ЦП, включая сравнительно близко произраставшие особи из ЦП 5. Это, вероятно, явилось результатом определенной географической изоляции особей из ЦП 3, как уже обсуждалось выше.

Обсуждение результатов

Генетический процесс в норме можно определить как тип воспроизводства видовых генофондов, при котором соотношение внутри- и межпопуляционной компонент генного разнообразия сохраняется на эволюционно сложившемся оптимальном уровне, специфичном для каждого вида (Altukhov, 2004). Поэтому исследования естественного генетического полиморфизма особенно актуальны для редких видов из-за относительно небольшого числа и объема их природных популяций.

Сравнение по численности особей и занимаемой ими площади в изученных местообитаниях показало, что наиболее высокое ПП *R. carthamoides* наблюдалось в ЦП 1 и ЦП 2 в пределах наибольших площадей, занимаемых этим видом. То есть эти ЦП относительно более благополучны по численности и занимаемой площади. Обнаружено наименьшее генетическое расстояние между этими ЦП, что согласуется с результатами ISSR-анализа, на основании которого выявлено высокое генетическое сходство особей из этих ЦП, произраставших на Семинском перевале и у подножия горы Красная. Кроме того, в данных местообитаниях наблюдалось сходство по экологическим условиям. Можно предположить, что наличие сходных экологических условий для произрастания растений (близкие значения абсолютных высот и произрастание особей вида под пологом леса) может служить в качестве фактора генетической общности растений в этих местонахождениях *R. carthamoides*. Это могло способствовать сохранению влаги в почвенном горизонте и повлиять на развитие определенного генетического пула особей вида, так как произрастание в условиях более высокой влагообеспеченности имеет решающее значение при их росте и развитии (см. табл. 1) (Kuban et al., 2018). Близость показателей ожидаемой и фактической гетерозиготности может свидетельствовать о спонтанности скрещивания особей (Chesnokov, Artemyeva, 2015).

Особи *R. carthamoides* из ЦП 3 характеризовались достоверно более низким сходством с растениями из трех местообитаний (ЦП 1, ЦП 2, ЦП 5) (p -level составил соответственно 0,0015; 0,011; 0,005). Вероятно, особи этой ЦП находились в определенной генетической изоляции от других исследованных ЦП вида. Основным фактором изоляции может быть перевал с абсолютной высотой 2300 м, у подножия которого произрастали ее особи. Кроме того, эта ЦП расположена в определенной близости от берега реки Шавла, что также может служить в ка-

честве одного из факторов обособления особей этого вида в данном местообитании. Других ЦП этого вида здесь нами не найдено. Представители *R. carthamoides* из ЦП 5 в Катунском заповеднике произрастали на близких абсолютных высотах с особями из ЦП 3. Однако местообитание ЦП 5 расположено на увлажненном склоне северной экспозиции, а ЦП 3 – на более сухом южном склоне (см. табл. 1). Возможно, что особи из ЦП 5 находились в более благоприятных условиях, и кроме того, местообитание ЦП 5 не являлось столь же изолированным.

ЦП 4 характеризовалась наиболее высокой генетической гетерогенностью и сравнительно высоким обилием особей. К отличительным особенностям данного местообитания относится также полное отсутствие антропогенного воздействия на растения в силу их произрастания на охраняемой территории. В ЦП 3, так же как в ЦП 4, обнаружена высокая внутривидовая генетическая гетерогенность, одной из возможных причин которой являются похожие условия местообитаний, заключающиеся в экологических особенностях – произрастании растений этих двух ЦП на хорошо прогреваемых склонах южной экспозиции.

Аналогичные результаты получены у растений из природных популяций *Arabidopsis thaliana*, произраставших в благоприятных условиях локальных местообитаний в северной части ареала этого вида (Fedorenko et al., 2014). Это также согласуется с утверждением о том, что изолированная популяция, если она не исчезает в ходе истории, способна поддерживать динамическое равновесие с окружающей средой, так как внутривидовая генетическая дифференциация в условиях нормальной природной среды протекает в среднем по селективно-нейтральному типу (Altukhov, 2004).

Заключение

Таким образом, исследование генетического полиморфизма особей из пяти ценопопуляций *R. carthamoides* показало, что особи из четырех ценопопуляций обладают высоким внутри- и межпопуляционным генетическим сходством, выявленным по распределению ISSR-маркеров.

Выявленный низкий полиморфизм по ISSR-маркерам ($K_{sx} = 73,5-92,9\%$) соответствует сложившимся представлениям об эндемичных видах, имеющих узколокальное распространение. Уровень генетической изменчивости у таких видов может снижаться в результате антропогенного воздействия и уменьшения численности особей на ограниченной территории. Генетическое разнообразие растений в охраняемых естественных популяциях при отсутствии антропогенного воздействия, какими являются местообитания особей в ООПТ, зачастую является единственным возможным ориентиром для сохранения на видовом уровне. Можно предположить, что усилению гомогенной структуры популяций этого вида способствует значительная антропогенная нагрузка, что должно послужить предпосылкой для усиления мер охраны. Для введения в культуру целесообразно использовать семенной материал из популяций, которые характеризуются отсутствием факторов изоляции и сравнительно высокой генетической гетерогенностью особей.

Принимая во внимание незначительную величину популяционной дифференциации вида, для его сохранения *in situ* можно рекомендовать исключение из хозяйственного использования и охрану наиболее полиморфных популяций *R. carthamoides*.

References / Литература

- Altukhov Yu.P. Dynamics of gene pools under anthropogenic impacts (Dinamika genofondov pri antropogennykh vozdeystviyakh). *The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2004;8(29):40-59. [in Russian] (Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях. *Информационный вестник ВОВУС*. 2004;8(29):40-59).
- Altukhov Yu.P. Genetic processes in populations (Geneticheskiye protsessy v populyatsiyakh). Moscow: Akademkniga; 2003. [in Russian] (Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. Москва: Академкнига; 2003).
- Anderson J.T., Willis J.H., Mitchell-Olds T. Evolutionary genetics of plant adaptation. *Trends in Genetics*. 2011;27(7):258-266. DOI: 10.1016/j.tig.2011.04.001
- Bhattacharyya P., van Staden J. Molecular insights into genetic diversity and population dynamics of five medicinal *Eulophia* species: a threatened orchid taxa of Africa. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2018;24(4):631-641. DOI: 10.1007/s12298-018-0523-6
- Cabrera-Toledo D., Vargas-Ponce O., Ascencio-Ramírez S., Valadez-Sandoval L.M., Pérez-Alquicira J., Morales-Saavedra J. et al. Morphological and genetic variation in monocultures, forestry systems and wild populations of *Agave maximiliana* of Western Mexico: implications for its conservation. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:817. DOI: 10.3389/fpls.2020.00817
- Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015;50(5):571-578. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.571eng
- Dorogina O.V., Zhmud E.V. Molecular-genetic methods in plant ecology. *Contemporary Problems of Ecology*. 2020;13(4):333-345. DOI: 10.1134/S1995425520040058
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19(1):11-15.
- Fedorenko O.M., Zaretskaya M.V., Lebedeva O.N., Titov A.F. Genetic diversity of *Arabidopsis thaliana* (L.) natural populations in the northern part of the species range. *Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences*. 2014;(2):36-42. [in Russian] (Федоренко О.М., Зарецкая М.В., Лебедева О.Н., Титов А.Ф. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.), расположенных на северной периферии ареала вида. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2014;(2):36-42).
- Kuban I.N., Dorogina O.V., Zhmud E.V. The local populations of the rare species *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) in the Altai Republic condition. *Flora and Vegetation of Asian Russia*. 2018;3(31):66-76. [in Russian] (Кубан И.Н., Жмудь Е.В., Дорогина О.В. Состояние ценопопуляций редкого вида *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) в Республике Алтай. *Растительный мир Азиатской России*. 2018;3(31):66-76). DOI: 10/21782/RMAR1995-2449-2018-3(66-76)
- Nabieva A., Zhmud E., Kuban I., Dorogina O. Morphometric and molecular analysis of *Cypripedium × ventricosum* (Orchidaceae) population in the Novosibirsk Region. *Botanicheskii zhurnal = Botanical Journal*. 2020;105(6):78-85. [in Russian] (Набиева А.Ю., Жмудь Е.В., Кубан И.Н., Дорогина О.В. Морфометрический и молекулярный анализ популяции *Cypripedium × ventricosum* (Orchidaceae) в Новосибирской области. *Ботанический журнал*. 2020;105(6):78-85). DOI: 10.31857/S0006813620060058
- Nechaeva Y.S., Boronnikova S.V., Yusupov R.R., Heinze B. The study of ISSR-markers polymorphism in natural and cultural populations of larch. *Fundamental Research*. 2013;(6-6):1426-1431. [in Russian] (Нечаева Ю.С., Боронникова С.В., Юсупов Р.Д., Хайнус Б. Изучение полиморфизма ISSR-маркеров в природных и искусственных популяциях лиственницы. *Фундаментальные исследования*. 2013;(6-6):1426-1431).
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York, NY: Columbia University Press; 1987.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(10):5269-5273. DOI: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Nekratova N.A., Kurovskiy A.V., Shurupova M.N. Impact of elevation and slope exposure on abundance of rare medicinal plant *Rhaponticum carthamoides* (Maral root). *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020;10(4):210-217. DOI: 10.15421/2020_190
- Nigmatullina N.V., Kuluev A.R., Kuluev B.R. Molecular markers used to determine the genetic diversity and species identification of wild plants. *Biomics*. 2018;10(3):290-318. [in Russian] (Нигматулина Н.В., Кулуев А.Р., Кулуев Б.Р. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификация дикорастущих растений. *Биомика*. 2018;10(3):290-318). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39
- Pakhrou O., Medraoui L., Yatrib C., Alami M., Filali-Maltouf A., Belkadi B. Assessment of genetic diversity and population structure of an endemic Moroccan tree (*Argania spinosa* L.) based in IRAP and ISSR markers and implications for conservation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017;23(3):651-661. DOI: 10.1007/s12298-017-0446-7
- Red Data Book of the Altai Republic (plants) (Krasnaya kniga Respubliki Altai.[rasteniya]). 3rd ed. Gorno-Altai; 2017. [in Russian] (Красная книга Республики Алтай (растения). 3-е изд. Горно-Алтайск, 2017).
- Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*. 1994;10(5):569-570. DOI: 10.1093/bioinformatics/10.5.569
- Vasilyeva O.Yu., Dorogina O.V., Kuban I.N., Sarlaeva I.Ya., Buglova L.V. Methodical aspects of studying of biore-source collections of rare and economic valuable plants. *Horticulture and Viticulture*. 2018;4(214):12-18. [in Russian] (Васильева О.Ю., Дорогина О.В., Кубан И.Н., Сарлаева И.Я., Буглова Л.В. Методические аспекты изучения биоресурсных коллекций редких и хозяйственно ценных растений. *Садоводство и виноградарство*. 2018;4(214):12-18). DOI: 10.31676/0235-2591-2018-4-12-18
- Zhmud E.V., Achimova A.A., Kuban I.N., Yamtirov M.B., Dorogina O.V. *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) in the Altai Republic: assessment of the state of the plant affected by human activities. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2022;15(1):92-106. [in Russian] (Жмудь Е.В., Ачимова А.А., Кубан И.Н., Ямтыров М.Б., Дорогина О.В. *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) в Республике Алтай: оценка состояния при антропогенном воздействии. *Вестник Сибирского федерального университета. Биология*. 2022;15(1):92-106). DOI: 10.17516/1997-1389-0376

Информация об авторах

Елена Викторовна Жмудь, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, elenazhmu@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5534-7691>

Ирина Николаевна Кубан, младший научный сотрудник, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, irinakuban@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4305-9729>

Алтынай Алексеевна Ачимова, кандидат биологических наук, директор филиала, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Горно-Алтайский ботанический сад – Алтайский филиал ЦСБС СО РАН, 649218 Россия, Республика Алтай, Шебалинский район, с. Камлак, урочище Чистый Луг, gabs@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1940-2224>

Максим Борисович Ямтыров, младший научный сотрудник, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Горно-Алтайский ботанический сад – Алтайский филиал ЦСБС СО РАН, 649218 Россия, Республика Алтай, Шебалинский район, с. Камлак, урочище Чистый Луг, gabs@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9065-3811>

Ольга Викторовна Дорогина, доктор биологических наук, заведующая лабораторией, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, olga-dorogina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5729-3594>

Information about the authors

Elena V. Zhmut, Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia, elenazhmu@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5534-7691>

Irina N. Kuban, Associate Researcher, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia, irinakuban@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4305-9729>

Altynai A. Achimova, Cand. Sci. (Biology), Director of the Branch, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Gorno-Altai Botanical Garden, Altai Branch of the CSBG, SB RAS, Chisty Lug Tract, Kamlak, Shebalinsky District, Altai Republic 649218, Russia, gabs@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1940-2224>

Maxim B. Yamtyrov, Associate Researcher, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Gorno-Altai Botanical Garden, Altai Branch of the CSBG, SB RAS, Chisty Lug Tract, Kamlak, Shebalinsky District, Altai Republic 649218, Russia, gabs@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9065-3811>

Olga V. Dorogina, Dr. Sci. (Biology), Head of a Laboratory, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia, olga-dorogina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5729-3594>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 21.09.2021; одобрена после рецензирования 22.12.2022; принята к публикации 01.06.2023. The article was submitted on 21.09.2021; approved after reviewing on 22.12.2022; accepted for publication on 01.06.2023.