

Молекулярно-генетические методы в экологии растений

О. В. ДОРОГИНА, Е. В. ЖМУДЬ

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
E-mail: olga-dorogina@yandex.ru

Статья поступила 05.02.2020

После доработки 15.02.2020

Принята к печати 18.02.2020

АННОТАЦИЯ

В настоящее время молекулярно-генетический анализ получил широкое применение в различных областях наук. В частности, основой современной методологической базы для оценки состояния окружающей среды является молекулярная экология. Различные виды и популяции заключают в себе большой запас генетической изменчивости, который играет основную роль в адаптации видов к определенным экологическим условиям. Значительная часть этой изменчивости не имеет четкого фенотипического выражения, что значительно осложняет исследование огромного генетического потенциала родов, видов и популяций. Более удобными маркерами для изучения этих вопросов являются белки семян и ДНК, характеризующиеся значительным внутривидовым полиморфизмом и независимостью от внешних условий произрастания растений, а в качестве методов – электрофорез запасных белков семян и все методы полимеразной цепной реакции амплификации геномной ДНК. В данном обзоре показана роль молекулярно-генетических методов в решении традиционных экологических задач, касающихся таксономии, филогении, эволюции, изучения генетической вариабельности и выявления инбридинговой депрессии в природных и искусственно созданных популяциях эндемичных, редких и исчезающих видов, а также в их паспортизации (путем штрих-кодирования) и создании генбанков ДНК.

Ключевые слова: экология, молекулярная экология, запасные белки, ДНК-маркеры, популяции, виды, внутри- и межпопуляционная изменчивость, редкие и исчезающие виды, реконструкция, искусственные популяции.

Основой экологии является исследование взаимодействия организмов друг с другом и со средой на фенотипическом уровне, но из-за недостаточной информативности фенотипических данных назревает необходимость в использовании генетических методов. Экология и генетика вместе объясняют механизмы эволюционной изменчивости и биоразнообразия. Экологические взаимоотношения организмов с биотической и абиотической средой – суть естественного отбора. Эти взаимоотношения определяют приспособленность

особей к данной среде, которую можно охарактеризовать как по фенотипическим признакам, так и по молекулярно-генетическим маркерам. В настоящее время молекулярная экология представляет собой отрасль знания на стыке молекулярной биологии и экологии, изучающую влияние экологических факторов на молекулярные структуры (в частности, ДНК, РНК и др.) живого организма. Все больше исследователей оценивают молекулярную экологию как основу методологической базы, позволяющей эффективно определять состав,

оценивать состояние и контролировать реакцию исследуемых многокомпонентных биотических систем на изменения различных параметров среды.

Взаимодействие наук экологии и молекулярной биологии появилось относительно недавно. Главной целью исследований в области экологической геномики является получение знаний о взаимосвязи между организмами (включая микробы) и их окружающей средой с использованием различных молекулярных методов [Kloet et al., 2011]. Биоразнообразие можно изучать на разных уровнях, от белков и нуклеиновых кислот (в молекулярной биологии) до организмов, популяций, сообществ, экосистем и, наконец, биосферы. Последние уровни – от популяций до биосферы – обычно рассматриваются в качестве основных тем экологических исследований.

В литературе существует мнение, что там, где встречаются экология и молекулярная биология, можно говорить об экогеномике. Экогеномика – это область исследований, в которой молекулярные уровни изучения биоразнообразия соприкасаются с экосистемными (по: [Kloet et al., 2011]), см. рисунок.

С помощью методов экологической генетики можно изучить эволюционные процессы и генетические механизмы, влияющие на фенотипические признаки, выяснить молекулярные основы фенотипической пластичности (взаимодействие генотип – среда) и выявить генетические механизмы адаптаций [Anderson, Mitchell-Olds, 2011].

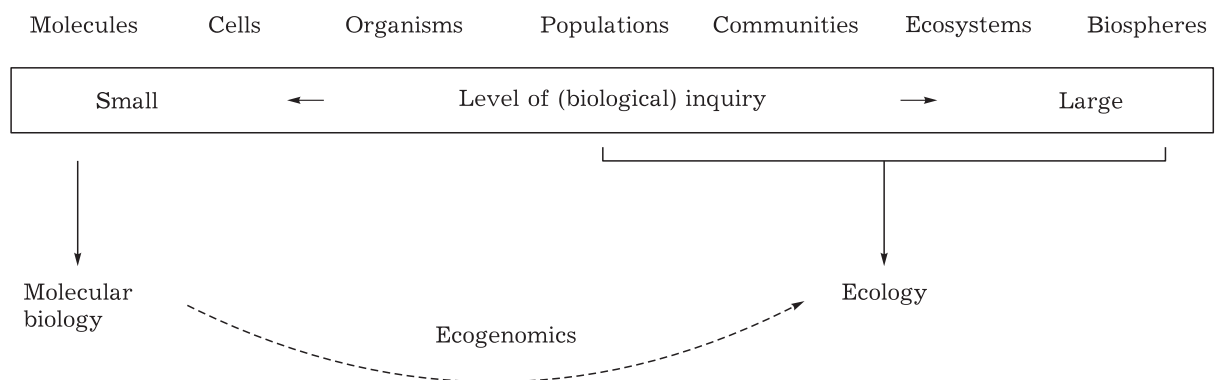
Относительно новая отрасль экологической науки – молекулярная экология как междисциплинарный раздел эволюционной биологии, основана на применении данных молекуляр-

ной популяционной генетики и филогенетики, геномики при решении традиционных экологических задач, таких как диагностика видов, сохранение и оценка биоразнообразия, экологическая структура ареалов, межвидовые отношения, поведенческая экология и т. д.

Электрофоретический спектр гетерогенных, многокомпонентных белков и ДНК представляет собой совокупность мономорфных и в разной степени полиморфных (аллельных) компонентов. Маркеры, с помощью которых можно выявить различия между анализируемыми образцами, называются полиморфными, а маркеры, присутствующие у всех исследуемых образцов, – мономорфными. Мономорфные (по подвижности) являются общими для рода или вида, а остальные от степени полиморфизма или множественности аллелей являются общими для подвида, популяции, генотипа.

Полиморфные маркеры можно разделить на кодоминантные и доминантные. Это подразделение базируется на способности маркера различать гетеро- и гомозиготы друг от друга. Как правило, кодоминантные маркеры могут состоять из множества разных аллелей, в то время как доминантные – только из двух аллелей.

Парадигмы молекулярной экологии встроены в парадигмы эволюционной и популяционной генетики, поэтому на вопросы, по каким критериям различаются популяции и виды (по каким аллелям, генотипам, фенотипам, генетической структуре, системе скрещивания), можно ответить, проводя исследования с использованием в качестве маркеров электрофоретические спектры запасных белков семян и ДНК.



Взаимосвязь изучения биоразнообразия организмов в экогеномике на различных уровнях – от молекулярной биологии до экосистем (по: [Kloet et al., 2011])

БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Запасные белки семян – хорошо известный класс молекулярных маркеров, применяемых для решения вопросов в филогении, эволюции, а также для идентификации и паспортизации видов и популяций. В то же время на практике не все белки могут быть использованы в качестве генетического маркера и не всякая генетическая система легко поддается маркированию белками. При этом необходимо учитывать следующее:

- для проведения сравнительных исследований по белкам – маркерам очень важно исключить влияние внешних факторов среды, а также присутствующей онтогенетической и тканевой изменчивости;

- сравнительный анализ большого числа представителей многих видов, родов и семейств культурных растений и их диких сородичей названными выше методами показал, что специфичность разных групп белков неодинакова. У одних она проявляется на уровне рода, трибы и семейства, у других – на уровне вида, подвида, у третьих – на уровне биотипов, их генетических групп и популяций. Наиболее удобными маркерами в этом отношении многие авторы считают запасные белки эндосперма (проламины и глютелины).

Известно, что основу генетической конституции организма составляет геном. В настоящее время пять базисных геномов S, H, Y, P, W в различных комбинациях составляют хромосомную основу рода *Elymus* L. [Dewey, 1984; Jensen, 1990; Torabinejad, Mueller, 1993].

С помощью проламинов и глютелинов, используемых для идентификации и регистрации конкретных генотипов, можно выявлять гибридные сорта и виды [Асбаганов и др., 2014; Губарева и др., 2015; Вишнякова, Гончаров, 2019], изучать внутривидовые и внутривидовые пулы, а также устанавливать межвидовые и геномные различия [Бадаева и др., 2019; Baum et al., 2011; Grigoreva, 2019].

Изучение внутри- и межпопуляционной изменчивости показало, что каждая популяция и каждый вид характеризуются различной изменчивостью и специфической картиной распределения компонентов запасных белков семени [Тарвердян и др., 2013; Есимбекова и др., 2015; Поморцев и др., 2019], что позволило

выявить видоспецифичные компоненты у некоторых видов из родов *Elymus* L. и *Hedysarum* L. [Агафонова и др., 1996; Агафонова (Дорогина), Агафонова, 2004].

Относительная приспособленность организма зависит не только от генотипа, но и от среды, с которой он взаимодействует, что сказывается на преимущественном типе опыления популяции, вида и способности адаптироваться к данным условиям. Связь между характером белковой варибельности и способом опыления растения отмечена В. Г. Конаревым [Конарев и др., 1985] при анализе электрофоретических спектров запасных белков семян у растений, где критерием сорта – перекрестника злака, является совокупность большого числа различающихся по компонентному составу типов спектра. Позднее Э. Э. Егги и Е. К. Потокина [1998] показали возможности электрофореза как тест-метода для прогнозирования характера опыления у культурных и некоторых дикорастущих видов бобовых по величине коэффициента варибельности ($K_{\text{вар}}$), а на примере природных популяций *Hedysarum theinum* Krasnob. можно заключить, что преобладающими типами опыления для исследованных популяций является перекрестный и разнохарактерный (включая самоопыление), что подтвердилось искусственным самоопылением и анализом способности к завязываемости семян [Агафонова, Карнаухова, 2008].

Поскольку временная и пространственная изменчивость средовых факторов может порождать изменение ряда признаков у особей, связанных с адаптацией и приспособленностью во времени и пространстве, то определение типа опыления является важной биологической характеристикой для растения.

ДНК-МАРКЕРЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

В ходе исследований выяснились и ограничения в применении запасных белков семян: анализ белков позволяет исследовать полиморфизм только белок-кодирующих последовательностей и только у экспрессирующихся генов; если учесть, что у высших эукариот небольшую часть генома составляют белок-кодирующие последовательности, очевидно, что от внимания исследователей ускользает оставшаяся часть генома.

Более перспективным представляется использование в качестве маркерных систем полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, позволяющих тестировать генетический полиморфизм непосредственно на уровне генов, а не на уровне продуктов генов, как в случае использования метода белкового полиморфизма [Mahelka et al., 2013; Zhang et al., 2013; Shmakov et al., 2015].

Преимущества ДНК-маркеров заключаются в следующем:

- позволяют решить проблему насыщения генома маркерами и маркировать практически любые участки ДНК, в том числе некодирующие (нейтральные);
- маркерная система дает возможность использовать для анализа любые ткани и органы, а не только семена;
- возможность определения на любых стадиях развития;
- более высокая длительность хранения образцов ДНК;
- возможность использования гербарного материала, ископаемых остатков и т. д.

Основными методами молекулярно-генетического анализа являются секвенирование, мультилокусный фрагментный анализ (фингерпринт, RAPD, RFLP, ISSR-PCR, Inter-SINE PCR), монолокусный микросателлитный анализ, использование микрочипов, однонуклеотидных полиморфных ядерных сайтов (SNPs). Согласно данным Е. К. Хлесткиной [2011], эти методы с нашими дополнениями сгруппированы в таблицу.

ISSR-метод широко используется в популяционных и таксономических исследованиях, так как ISSR-маркеры обладают большой вариабельностью [Marghali et al., 2012; Chen et al., 2014]. Данный метод хорошо воспроизводим, менее трудоемок и более прост в исполнении по сравнению с другими методами изучения полиморфизма ДНК. Использование межмикросателлитных маркеров (ISSR-метод) позволяет обнаруживать большее число полиморфных локусов по сравнению с другими методами. ISSR-маркеры относятся к маркерам доминантного типа наследования, они дешевы в использовании, не требуют предварительных данных о последовательности ДНК и, вместе с тем, дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-маркеры [Marghali et al., 2012]. Эти маркеры широко используют-

ся в настоящее время в практике современных отечественных и зарубежных экологов, так как позволяют проводить исследования, не уступающие мировому уровню, и использовать признаки, не зависящие от внешних условий произрастания и маркирующие генотип растения.

Новый класс перспективных маркеров, который удовлетворяет этим критериям, появился недавно в результате геномных исследований. Это класс функциональных геномных маркеров на основе ПЦР: амплифицированные районы с охарактеризованной нуклеотидной последовательностью Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) или Sequence Tagged Sites (STS), а также маркерная экспрессирующаяся последовательность Expressed Sequence Tags (ESTs).

Генетическая изменчивость данных маркеров представлена полиморфизмом однонуклеотидных последовательностей ДНК: single nucleotide polymorphisms – (SNP), которые в основном являются двуаллельными и хорошо поддаются высокопроизводительному генотипированию в больших популяционных объемах [Kim et al., 2010; McCouch et al., 2010]. Помимо высокой плотности, SNPs имеют очень низкий уровень мутаций на поколение (~10⁻⁸), что делает их удобными маркерами молекулярной эволюции.

Маркерные технологии эволюционируют, и на смену микросателлитам приходят перспективные SNP-маркеры, характеризующиеся большим числом в геноме и возможностью их использования для автоматизации анализа и генотипирования.

ВЫЯВЛЕНИЕ, АНАЛИЗ И ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ЭКОЛОГИИ

Экологические взаимоотношения организмов с биотической и абиотической средой – суть естественного отбора. Они определяют приспособленность фенотипов и лежащих в их основе генотипов к данной среде. С одной стороны, экологическая структура популяций влияет на генетическую изменчивость популяций, с другой, генетическая изменчивость популяции по экологически важным признакам влияет на скорость и направление ответа популяции на отбор в результате экологических взаимоотношений.

Основные моно- и мультилокусные ДНК-маркеры, наиболее часто используемые при изучении генома растений
(по: [Хлёткина, 2011; Чесноков и др., 2016] с изменениями)

Метод	Маркеры	
	Монолокусные	Мультилокусные
Основанный на блот-гибридизации	RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов [Botstein et al., 1980], применяется для оценки генетической variability растений, маркирования генов, в том числе генов устойчивости	Минисателлиты [Jeffreys et al., 1985]
Основанный на ПЦР	<p>SSR (simple sequences repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) [Tautz, Renz, 1984], применяются для оценки генетического разнообразия и выявления гибридов</p> <p>STS (sequences tagged site) – последовательности, характеризующие локус [Olson et al., 1989]</p> <p>ПЦР-амплификация последовательности ДНК со специфичными праймерами</p> <p>SCAR (sequence characterized amplified region) – последовательность, характеризующая амплифицированную область [Paran, Michelmore, 1993]</p> <p>SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК [Orita et al., 1989], применяется для оценки полиморфизма в контексте эволюции</p> <p>CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности [Kopieczny, Ausubel, 1993], применяются для оценки полиморфизма в контексте эволюции</p>	<p>RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК [Williams et al., 1990; Welsh et al., 1992], применяется для оценки генетического полиморфизма по всему геному в растениях и маркирования генов, в том числе генов устойчивости</p> <p>ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности [Zietkiewicz et al., 1994], применяются для идентификации генотипов, изучения генетического разнообразия, при анализе филогенетических взаимоотношений и таксономической принадлежности</p> <p>IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами [Kalendar, Schulman, 2006], характеризуется высоким уровнем стандартизации, поддается автоматизации; применяется для оценки генетического полиморфизма, эффективен для изучения эволюции и филогении</p> <p>AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов [Vos et al., 1995], используется в качестве высокоинформативного ДНК-фингерпринта; применяется для оценки генетического полиморфизма, эффективен для изучения эволюции и филогении</p> <p>S-SAP (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей [Waugh et al., 1997], имеет высокий уровень полиморфизма и стабильную воспроизводимость спектров продуктов амплификации</p>
Основанный на секвенировании и ДНК-чипировании	SNP (single nucleotide polymorphism) – одонуклеотидный полиморфизм [Wang et al., 1998], применяется для оценки полиморфизма в контексте эволюции	DArT (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия [Jaccoud et al., 2001]

ДНК-маркеры особенно привлекательны тем, что с их помощью можно выявлять различия между двумя особями одного или разных видов [Flores-Olvera et al., 2016], что за-

частую не удается сделать с помощью иных типов маркеров; а также гибридогенные [Князев, 2011] и полиплоидные [Gaál et al., 2018; Badaeva et al., 2019] виды и популяции. На ос-

нове секвенирования хлоропластной ДНК проведена дифференциация видов и гибридов карельской березы [Баранов и др., 2019]. Показаны пути горизонтального переноса генов и геномов ДНК из клеточных органелл (митохондрий, хлоропластов) между несовместимыми видами [Stegemann et al., 2012].

Основой возникновения изменчивости являются следующие процессы: рекомбинации, гибридизация, интрогрессия, мутация, трансгенез и др. Все это формирует резерв наследственной изменчивости.

Для идентификации вида и популяции необходимы генетические полиморфные системы. Полиморфизм таких систем обусловлен аллельной изменчивостью и наилучшим образом раскрывается электрофорезом [Chen et al., 2014; Abraham et al., 2015; Liu et al., 2016]. Так, впервые охарактеризована последовательность интрона пластидного гена *trnL* у 16 видов бобовых и выявлен высокий уровень полиморфизма как между родами семейства Fabaceae, так и между видами одного рода [Дьяченко и др., 2014].

Безусловно, генетическая изменчивость влияет на приспособленность организмов, и это находит свое отражение как в естественном, так и в искусственном отборе [Шнеер, Коцера, 2014].

Когда увеличение приспособленности становится возможным, генетическое разнообразие может обеспечить уровень роста популяции, но только если популяция не регулируется другими факторами и находится под действием направленного отбора. Следует отметить, что генетическое разнообразие является основой биоразнообразия, т. е. общего числа генетических признаков, обеспечивающих или составляющих изменчивость внутри видов и способствующих их адаптации. Генетическое разнообразие среди особей отражает присутствие различных аллелей в генофонде и отсюда – в различных генотипах внутри популяции. В частности, в результате исследования генетической изменчивости клоновых потомств плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. по 7 ISSR-маркерам обнаружено 152 полиморфных локуса, причем среднее эффективное число аллелей составило 1,634 [Милютин и др., 2013].

С эволюционной точки зрения генетическое разнообразие является критическим парамет-

ром для реализации биологического потенциала и выживания видов [Noreen, Webb, 2013]. Научные программы, касающиеся изучения генетической структуры популяций, привносят в это понятие эволюционное значение путей развития различных организмов [LaBar, Adami, 2016].

Генетические методы уже сейчас могут позволить извлечь как экономическую, так и экологическую выгоду. Среди других возможностей молекулярно-генетических методов в лесном хозяйстве можно отметить такие направления экологической направленности, как:

- проведение мониторинга генетической структуры и разнообразия популяций основных лесообразующих пород;
- таксономическое определение растений, уточнение филогенетических схем;
- определение истинных границ распространения инфекции при обнаружении очага поражения;
- определение факторов, снижающих генетический потенциал популяций.

Таким образом, молекулярно-генетические методы могут стать одним из инструментов обеспечения качественного мониторинга лесов России, их надежной охраны и устойчивого использования [Шилкина, 2017].

Экологической проблемой во всем мире являются инвазивные виды растений, в том числе древесных пород, поэтому молекулярно-генетический анализ является в данном случае незаменимым для выявления новых нежелательных инвазивных генотипов [Gaskin, 2016].

Важной проблемой молекулярной экологии является взаимодействие фенотипов и среды с генотипами. В связи с этим в качестве основных недостатков традиционных молекулярно-генетических маркеров целесообразно отметить отсутствие знаний о характере генетической изменчивости (кодирующие или некодирующие локусы, синонимичные или несинонимичные нуклеотидные замены, за исключением аллозимов и dCAP), отношение к фенотипической изменчивости и селективное значение аллелей и генотипов. Мы практически ничего не знаем об адаптивном значении наблюдаемой генетической изменчивости.

Поэтому желательно, чтобы маркеры, используемые для оценки адаптивной изменчивости, были непосредственно вовлеченными в генетический контроль адаптивных призна-

ков с определенной функцией, с известными последовательностью ДНК и положением в геноме. Необходимым условием является также возможность с их помощью легко идентифицировать аллельную изменчивость.

Новый класс перспективных маркеров (о которых упоминалось выше), появившийся недавно в результате геномных исследований, соответствует большинству из этих критериев.

ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОПУЛЯЦИЙ

По современным данным пятая часть видов мировой флоры в естественных условиях находится под угрозой исчезновения [Maschinskia, Matthew, 2017]. В последние десятилетия начаты исследования, позволяющие раскрыть генетические основы сохранения экологического равновесия в естественных популяциях растений. Популяции растений в ненарушенных местообитаниях представляют собой уникальный источник для исследования процессов, происходящих в природных экосистемах. Их изучение дает представление об эволюционных механизмах, которые формируют фенотипы в естественных популяциях и освещает эволюционную генетику видов, отличающихся продолжительностью жизни (многолетники или однолетники), системами размножения (самоопылители или перекрестники), жизненной формой (травянистые или древесные) и другими важными, в том числе экологическими, характеристиками [Anderson et al., 2011].

Согласно основам популяционной генетики растения в природных популяциях адаптируются к определенным местообитаниям в течение неопределенно долгого времени [Жученко, 2004]. Поэтому для поддержания естественного экологического равновесия необходима устойчивость видов в конкретных популяциях, что обеспечивается сохранением высокого генетического разнообразия растений. Популяции растений в ненарушенных местообитаниях могут представлять собой основу для сохранения информации об уровнях естественного генетического разнообразия видов. Поэтому для успешного сохранения экологического равновесия экосистем осново-

полагающее значение имеют генетические исследования. Они влияют на выбор источников семян и обеспечивают генетический контроль компонентов экосистем, так как индивидуальные генотипические характеристики имеют с ними опосредованную связь [Gustafson, Gibson, 2019].

Согласно исследованиям J. R. Neale [2012] изучение естественного генетического разнообразия и экологической приуроченности популяции в идеале должно предварительно проводиться в ненарушенных местообитаниях (контроль) и служить научной основой для последующей реинтродукции видов. В этом случае основу для базы данных о потенциальных возможностях сохранения генетического разнообразия популяций могут составить нейтральные генетические маркеры, хотя их адаптивное значение не всегда хорошо известно. Согласно проведенным автором исследованиям последствия низкого генетического разнообразия популяций пока изучены не в полной мере, но, возможно, такие популяции хуже адаптируются к изменениям окружающей среды. Кроме того, реинтродуцированные популяции с низкой генетической гетерогенностью могут скрещиваться с близлежащими естественными популяциями, что может увеличивать у них риск развития инбридинга [Neale, 2012].

Снижение генетического разнообразия может приводить к исчезновению вида по ряду причин. Это биологические особенности (медленный рост, нерегулярное плодоношение, узкая экологическая пластичность). Популяции с уменьшенным генетическим разнообразием могут не иметь вариации для решения ключевых экологических проблем, таких как, например, засухоустойчивость и т. д. [Jump, Reñuelas, 2006]. Полипептидные спектры у видов с узкой эдафической специализацией и небольшим ареалом менее изменчивы, чем у широко распространенных видов. У изученных редких видов в основном внутривидовая изменчивость меньше или приближалась к межвидовой изменчивости [Särkinen et al., 2011; Lopes et al., 2014]. Тем не менее, несмотря на высокий уровень генетической вариативности редкого вида, Алтае-Саянского эндемика *Hedysarum theinum*, но принимая во внимание незначительную величину популяционной дифференциации, для его сохра-

нения *in situ* можно рекомендовать исключение из хозяйственного использования и охрану даже наиболее полиморфных популяций [Звягина, Дорогина, 2013]. Уровень генетической изменчивости у таких видов может снижаться в результате антропогенного воздействия и уменьшения численности особей на ограниченной территории [Zvyagina et al., 2016].

Переход растений от перекрестного типа опыления к самоопылению приводит к инбридингу в популяциях, уменьшению фертильности и, как следствие, при определенных условиях внешней среды – к исчезновению популяций. Поэтому для редких и исчезающих видов растений особенно важна разработка подходов, позволяющих исследовать преимущественный тип опыления (о чем говорилось выше) [Li et al., 2012]. В этом случае потеря генетического разнообразия и, соответственно, нарушение экологического равновесия в следующем поколении обратно пропорциональны числу родителей. Для эффективного поддержания таких видов наиболее важно осуществлять сбор семян с возможно большего числа родительских особей, даже при меньшем количестве семян с каждой из них [Ivetić et al., 2016].

Поскольку экологические факторы влияют на популяционно-генетическую структуру эндемичных и редких видов, то анализ генетической вариабельности, проведенный с помощью запасных белков семян и ДНК-маркеров, позволяет установить уровень генетической дифференциации видов и предложить рациональные методы их охраны. С эволюционной точки зрения генетическое разнообразие является критическим параметром для реализации биологического потенциала и выживания видов.

Уменьшение количества и частоты наиболее редких аллелей вида снижает его адаптивный потенциал, что вызвано, как правило, климатическими изменениями и антропогенным воздействием (вырубка леса, сельскохозяйственное освоение земель, выпас скота и т. д.). При антропогенных воздействиях в природных популяциях может нарушаться эволюционно сложившееся соотношение компонент, характеризующих внутри- и межпопуляционную изменчивость [Жмудь и др., 2012]. Если при этом генетический материал перераспределяется таким образом, что внутрипопуляционная компонента уменьшается,

а межпопуляционная нарастает, то это может привести к деградации популяций.

К достаточно серьезной причине снижения генетического разнообразия также относится фрагментированность современных ландшафтов, в которых виды подвергаются экологическим стрессам из-за изменения климата, увеличения числа инвазивных видов и деградации местообитаний. Вследствие фрагментации среды обитания уменьшается средний размер популяций и может увеличиваться степень их географической изоляции [Anderson et al., 2011]. Генетический дрейф, инбридинг и снижение потока генов могут разрушить генетическое разнообразие в небольших фрагментированных популяциях, что приводит к увеличению гомозиготности, депрессии, вымиранию популяций (и видов) и нарушению экологического равновесия. ДНК-маркеры в этом случае обычно показывают низкую гетерозиготность, в то время как количественные признаки – снижение наследуемости только в самых маленьких и наиболее инбредных популяциях. Вариации количественных признаков могут даже возрастать в малочисленных популяциях, хотя этот эффект вряд ли увеличит их адапционный потенциал. В небольших популяциях особи часто имеют также более низкие морфологические характеристики из-за воздействия стрессовых условий окружающей среды и генетических проблем, таких как инбридинг, что может существенно увеличить вероятность исчезновения популяций в изменяющихся условиях [Willi et al., 2006]. Даже у долгоживущих ветроопыляемых видов деревьев наблюдается сокращение генетического разнообразия и увеличение инбридинга из-за фрагментации местообитаний и других экологических стрессов, что может существенно сдерживать адаптивную эволюцию [Jump, Peñuelas, 2006].

Международный союз охраны природы и природных ресурсов (МСОП) признал важность исследования генетической составляющей при планировании и проведении природоохранных мероприятий наряду с изучением видового разнообразия и разнообразия экологических систем [World Database...]. Для популяций редких видов величина внутрипопуляционной изменчивости, а также сопоставление с межпопуляционной изменчивостью являются важным крите-

рием устойчивости популяций, позволяющим выявлять процессы, либо приводящие к деградации, либо нет [Kaljund, Jaaska, 2010; Gordon et al., 2012; Zhao et al., 2012].

Исследования по восстановлению окружающей среды охватывают различные уровни организации – от генов до экосистем. Генетические проблемы, связанные с динамикой в пределах небольшой популяции, потоком и экспрессией генов, влияющими на структуру сообщества и функции экосистем, могут повлиять на успех мероприятий по восстановлению окружающей среды [Gustafson, Gibson, 2019]. В настоящее время приоритетными объектами для реконструкции в России являются популяции видов, включенных в Российскую и региональные Красные книги. Целесообразно восстанавливать природные популяции таких видов с сокращающейся численностью.

Целью реинтродукции растений является экологическая реставрация, т. е. обеспечение сохранения уникального вида в естественном контексте в виде самодостаточной популяции, где он может претерпевать эволюцию в пределах своего исторического ареала [Maschinskia, Matthew, 2017]. Согласно литературным данным, существует ряд ситуаций, при которых необходимо проведение предварительных генетических исследований для контроля генетической гетерогенности используемых для этого семян. Эти исследования могут быть проведены при помощи маркеров, измеряющих даже нейтральную генетическую изменчивость и предлагающих преимущества быстрого, недорогого и минимально инвазивного отбора данных (например, из нескольких листьев) [Neale, 2012].

Согласно современным представлениям генетическая информация важна перед началом реконструкции популяций растений, если присутствует любое из следующих условий: 1) популяция насчитывает менее 50 плодоносящих особей; 2) популяция сильно фрагментирована и изолирована; 3) нет соответствующих опылителей; 4) нет жизнеспособного набора семян; 5) особи вида имеют разную морфологию в разных эколого-географических условиях; 6) популяции имеют различную экологию; 7) виды трудно различимы; 8) неясна таксономия вида; 9) существует опасение гибридизации на участке реципиен-

та. Если генетический анализ показывает, что популяции генетически сходны, то смешивать популяции безопасно. Более высокая вероятность выживания у популяций, которые восстановлены посредством посадки более чем 50 саженцев по сравнению с использованием меньшего количества посадочного материала. Вероятно, при восстановлении семенами потребуется гораздо больше материала, так как всхожесть семян даже в 1 % не является редкостью. Кроме того, для создания искусственных популяций при их реконструкции необходим не только генетический контроль гетерогенности используемых семян, но и контроль полученных результатов. В идеале реинтродукция должна проводиться с использованием генетически близкородственных особей с высокой гетерогенностью, иначе прогноз их приспособленности может быть отрицательным [Maschinskia, Matthew, 2017]. Известно, например, что использование семенного материала неизвестного происхождения и с неясным генетическим статусом создает угрозу для адаптации и/или адаптивного потенциала у древесных насаждений, и последствия этого могут выходить далеко за пределы их локальных местообитаний [Ivetic et al., 2016].

Для создания экологически устойчивых популяций, способных самостоятельно функционировать в естественных условиях, необходима предварительная идентификация и разработка технологии массового получения микроразмножаемых редких и эндемичных видов. При разработке методологии размножения и сохранения редких видов *in vitro* особое внимание должно уделяться высокой репрезентативности и поддержанию генетической чистоты таксонов. У *Hedysarum austrosibiricum* B. Fedtsch., *H. chajracanicum* Kurbatsky, *H. theinum*, *As-tragalus sericeocanus* Gontsch. впервые проведен анализ на идентичность по ISSR-маркерам родительских генотипов и полученных путем микроразмножения регенерантов, а также анализ изменчивости полученных регенерантов для адекватной оценки генетического разнообразия исходного материала и контроля полученных результатов [Эрст и др., 2015; Мурасева и др., 2017]. Например, введение в культуру *in vitro* методом длительного культивирования каллуса вызывало значительные измене-

ния генома *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L., что не позволило сохранять первоначальное исходное состояние генотипов и кариотипов и могло отразиться впоследствии на их экологической устойчивости [Скапцов и др., 2015].

Таким образом, для оценки генетической дивергенции в популяциях и между видами в настоящее время существуют достаточно эффективные инструменты. Это электрофорез запасных белков семян в сочетании с маркерами молекулярной ДНК, таких как полиморфизм с ограниченной длиной фрагмента (RFLP), случайная амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD), полиморфизм амплифицированной длины фрагмента (AFLP), микросателлиты (SSR) и однонуклеотидный полиморфизм (SNP) с использованием системы маркеров iPBS-ретротранспозонов [Kalendar et al., 2011; Hamouda, 2019; Karik et al., 2019]. Эти новые инструменты генотипирования и анализа позволяют в настоящее время решать ключевые экологические вопросы и проблемы с точностью, которая была невозможна еще десять лет назад [Rose et al., 2013].

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ВИДОВ И ПОПУЛЯЦИЙ

Описание морфологических характеристик вида – элемент классического генетического анализа, первый этап генетической паспортизации. Второй этап связан с разработкой и использованием биохимических и молекулярно-генетических маркеров. По сравнению с другими методами идентификации, они позволяют оптимизировать характеристики генотипов редких и исчезающих видов растений с учетом показателей генетического разнообразия, установленных по результатам молекулярного маркирования множественных геномных участков, а также с обязательным учетом уровней внутри- и межпопуляционного разнообразия. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация генотипов редких и исчезающих видов растений дают возможность проведения отбора в природных условиях популяций и их групп как с наиболее типичными, так и со специфичными характеристиками. Это необходимо для оптимизации сохранения генетического разнообразия и экологического статуса популяций и позволяет на основании оценок полилокусного со-

четания моно- и полиморфных участков ДНК составить молекулярно-генетическую формулу, штрих-код популяций и обобщить данные в виде генетического паспорта [Калаев и др., 2012]. Методы, которые являются перспективными для генотипирования растений, – это полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), случайная амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD), микросателлиты или простой повтор последовательности (SSR) и полиморфизм одиночных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphism – SNP). Вместе с тем можно согласиться с утверждением, что RAPD, AFLP и микросателлиты не следует считать подходящими для филогенетического анализа выше уровня видов [Arif et al., 2010; Naeem, 2014].

Разработка методик генетической паспортизации растений в настоящее время находится на первоначальном этапе развития. Так, С. В. Боронниковой [2009] разработана методика молекулярно-генетической паспортизации редких и нуждающихся в охране видов на примере природных популяций травянистых (*Adonis sibirica* Patr. ex Ledeb. и *A. vernalis* L.) и некоторых древесных видов растений. Автором предложена запись фрагмента ДНК в виде молекулярно-генетической формулы, где указывается род и вид растения, длина фрагмента ДНК и праймер (нижним индексом), с помощью которого амплифицирован фрагмент. Помимо буквенно-цифровой записи молекулярно-генетической формулы ею предложена запись в виде штрих-кода [Боронникова, 2009]. Для генетической паспортизации природных популяций древесных видов растений в молекулярно-генетическую формулу и штрих-код, помимо идентификационных фрагментов ДНК разного размера, амплифицированных в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР), вносят и другие структурные изменения геномов, такие как делеции, дубликации, однонуклеотидные замены (SNP), выявленные при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей после секвенирования геномной ДНК. Это изобретение позволяет эффективно идентифицировать древесные виды растений на нуклеотидном уровне. В этом случае используют сочетания как полиморфных идентификационных фрагментов ДНК, выявленных методом

ПЦР, так и изменения в последовательностях ДНК, выявленных методом секвенирования [Боронникова, Бобошина, 2013].

Для идентификации ДНК и штрих-кодирования близкородственных видов растений в настоящее время появилась возможность использования нанопорового геномного секвенирования в полевых условиях в реальном времени (RTnS). Это относительно новый метод секвенирования ДНК, который обеспечивает быструю идентификацию видов при относительно низких затратах и с минимальным оборудованием. Данный метод относится к семейству высокоэффективных способов определения последовательности молекул ДНК или РНК с использованием белковых или твердотельных пор диаметром в несколько нанометров. Нанопористые секвенаторы увеличивают емкость штрих-кодирования, так как могут считывать более длинные нити ДНК с меньшим количеством пробоподготовки (амплификация ПЦР или химическая маркировка образца) [Parker et al., 2017]. Таким образом, молекулярно-генетическая формула и штрих-кодирование позволяют определить принадлежность отдельных особей не только к роду и виду, но и к определенной популяции, что обеспечивает их идентификацию в базах данных и в недалеком будущем позволит составлять “портреты” экологически устойчивых экосистем.

СОЗДАНИЕ ГЕНБАНКОВ РАСТЕНИЙ. ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ

Создание генбанков представляет собой чрезвычайно важную часть экологических исследований, так как оно направлено на сохранение информации о генетическом разнообразии растений из местных условий различных регионов мира. Вопрос о хранении и использовании ДНК впервые поставлен в 2004 г. Международным Институтом генетических ресурсов растений (IPGRI) среди международных и национальных генетических научно-исследовательских институтов, ботанических садов и университетов [Andersson et al., 2006]. Коллекции генетических ресурсов существуют в виде очищенных образцов ДНК, замороженных жизнеспособных клеточных культур или лиофилизированных

тканей, и представляют ценные компоненты комплексной экологической и ресурсной стратегии хранения [Brown, 2011]. Образцы сохраняются в виде сухих (лиофилизированных) или замороженных тканей, семян или выделенной ДНК [Dulloo et al., 2006]. Наиболее предпочтительно герметичное хранение ДНК для защиты от воды и кислорода, при комнатной температуре [Bonnet et al., 2010].

В настоящее время банки ДНК расположены во многих ботанических садах и Гербариях ведущих университетов мира [Rice et al., 2006; Волкова, 2016]. Их сайты содержат список геномной ДНК местных видов с акцентом на редкие, находящиеся под угрозой исчезновения из местных природных условий, и информацию о ваучерах (этикетку об экологической и географической приуроченности, образец и фотографии растений). Часто предоставляется информация штрих-кода ДНК для молекулярной идентификации. По состоянию на начало 2018 г. образцы тканей, как правило, высушиваются в силикагеле, а образцы геномной ДНК растений хранятся при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Это банки ДНК в Корее, Ботаническом саду Кью (Англия) или Музее естественной истории Осло (Норвегия) [Plant DNA... Korea; The DNA... Kew; The DNA Bank... Oslo (NHMO)]. Банк ДНК в Берлине (BGVM) – один из основателей Глобальной сети по биоразнообразию генома (GGBN). Он содержит образцы ДНК хорошего качества, с высокой молекулярной массой и концентрацией, подходящей для амплификации на основе ПЦР [The DNA Bank... Berlin]. В Ботаническом саду Миссури (США) или Южноафриканском банке ДНК (ACDB) коллекции высушенных в силикагеле листьев, доступных для выделения ДНК, являются новыми проектами, которые находятся еще в стадии разработки [Missouri... DNA Bank; ACDB DNA Bank]. Созданы интернет-ресурсы, объединяющие сведения о базах данных ДНК для увеличения их доступности [The Top 10...]. В литературе отмечается, что в наших знаниях остаются значительные пробелы в отношении доступных типов генетических ресурсов, а также их физического местонахождения [DNA Banks... United States] и подчеркивается необходимость создания гибкого руководства по приоритетам, например, для сохранения наиболее генетически различающихся

видов, для своевременного сохранения угрожаемых видов и привлечения международного сообщества к выработке единых протоколов по сбору и хранению тканей и других репрезентативных образцов [Gemeinholzer et al., 2010; Brown, 2011].

Таким образом, в настоящее время в мировом масштабе начата активная работа по созданию исчерпывающих списков банков ДНК, хранилищ генетических ресурсов и доступных коллекций тканей, что может служить эффективным инструментом для сохранения генетического разнообразия видов, популяций и, в конечном счете, экосистем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевая проблема молекулярной экологии – это генетическая стабильность популяций. Решение этой проблемы связано с изучением биоразнообразия, его поддержанием и рациональным использованием, осуществление которого возможно с применением комплекса методов, включая научные и социально-экономические. В последние годы биологи все яснее осознают недостатки изучения только морфологических особенностей организма, поэтому там, где это целесообразно при решении ряда экологических задач, в частности, вопросов таксономии, филогении, эволюции, сохранения редких и исчезающих видов растений и т. д., используют молекулярно-генетические методы.

Полученные рядом авторов результаты подтверждают, что наиболее удобными маркерами в этом отношении являются как электрофоретические спектры многокомпонентных или множественных и генетически полиморфных белков семян, так и ДНК с хорошо выраженной внутривидовой изменчивостью.

Идентификация видов и оценка внутривидового генетического полиморфизма являются важнейшими задачами современной экологии, ботаники и генетики растений. Для решения этих задач разработано большое число разнообразных методов поиска и исследования таксономически значимых участков ДНК, которые получили название молекулярных или ДНК-маркеров.

Наиболее популярными методами для изучения популяций с использованием ДНК-маркеров являются технологии ПЦР, ДНК-чи-

пирования и секвенирования. Из методов, основанных на ПЦР, наибольшее распространение получили ISSR, RAPD, SSR, AFLP, IRAP и REMAP, причем они применяются как для оценки внутривидового генетического разнообразия, так и при идентификации видов. Более эффективным для изучения внутривидового полиморфизма является относительно новый SNP-анализ, который обычно проводится методом ДНК-чипирования. Значительное увеличение исследований, связанных с SNP-анализом, возможно, приведет к тому, что эта группа методов в скором времени вытеснит классические методы ПЦР-фингерпринтинга.

В настоящее время проблема генетической идентификации дикорастущих видов и популяций растений является чрезвычайно актуальной и находится на начальном этапе развития. Число полностью расшифрованных геномов растений невелико, поэтому вопросы идентификации вида и паспортизации (штрих-кодирования) популяций или групп популяций разработаны в значительно меньшей степени.

Особое значение для создания экологически устойчивых экосистем приобретает паспортизация редких генотипов, популяций, видов и использование белковых и молекулярно-генетических формул для составления баз данных редких, исчезающих и ресурсных видов. Сохранение, защита и управление биологическими ресурсами и экологическая реставрация зависят в основном от стабильного и устойчивого воспроизводства популяций. Поэтому мониторинг интродукционных, природных и искусственно созданных популяций с целью контроля генетической стабильности популяций является необходимым этапом в экологических исследованиях.

Наилучшей стратегией для долговременной защиты биологического разнообразия является сохранение природных сообществ, а также поддержание и восстановление популяций и видов в их естественной среде. Несмотря на это биоконсервация в настоящее время рассматривается как один из важных способов защиты генетического и видового биоразнообразия, так как наличие в генетических банках растительного материала редких и исчезающих видов растений предусматривает в дальнейшем при необходимости их восстановление.

Благодаря наличию банков ДНК и отдельных клонированных генов становится возможным определение молекулярно-генетических и других механизмов взаимодействия особей с окружающей средой, а также генов как качественных, так и количественных признаков, определяющих устойчивость растений к различным абиотическим и биотическим неблагоприятным факторам окружающей среды.

Таким образом, генетические методы исследования являются неотъемлемой и важной частью современной экологии. Благодаря их применению сформировалась современная отрасль знаний – молекулярная экология, новое направление в экологии, открывающее дополнительные перспективы и позволяющее получать более совершенную информацию о составе и состоянии биотических систем и механизмах взаимодействия “генотип – среда”.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов А. В., Агафонов О. В., Саломон Б., Лу Б.-Р. Репродуктивная совместимость биотипов Пырейника длинноколосого (*Elymus macrourus*) и П. якутского (*E. jacutensis*) и генетический анализ диагностического признака остистости // Сиб. экол. журн. 1996. Т. 3, № 6. С. 527–533.
- Агафонов (Дорогина) О. В., Агафонов М. А. Идентификация близкородственных видов *Hedysarum theinum*, *H. neglectum*, *H. austrosibiricum* (Fabaceae) с помощью запасных глобулинов семян // Ботан. журн. 2004. Т. 89, № 10. С. 1637–1645.
- Агафонов О. В., Карнаухова Н. А. Антэкология и прогнозирование типа опыления по электрофоретическим спектрам полипептидов семян в популяциях редкого вида *Hedysarum theinum*, произрастающего в Горном Алтае // Раст. мир Азиатской России. 2008. № 1. С. 54–59.
- Асбаганов С. В., Кобозева Е. В., Агафонов А. В. Применение электрофореза запасных белков семядолей и ISSR-маркеров для идентификации гибридов между *Sorbus sibirica* Hedl. и *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2014. Т. 18 (3). С. 486–496.
- Бадаева Е. Д., Фисенко А. В., Суржииков С. А., Янковская А. А., Чижида Н. Н., Зоцук С. А., Белоусова М. X., Драгович А. Ю. Генетическая гетерогенность диплоидного злака *Aegilops tauschii*, выявленная методами хромосомного анализа и электрофореза запасных белков зерна (глиадинов) // Генетика. 2019. Т. 55, № 11. С. 1263–1278.
- Баранов О. Ю., Кирьянов П. С., Пантелеев С. В., Можаровская Л. В., Падутов А. В., Разумова О. А., Падутов В. Е. Анализ структурно-функциональной организации хлоропластного генома карельской березы на основании данных высокопроизводительного секвенирования // Докл. НАН Беларуси. 2019. Т. 63, № 3. С. 312–316.
- Боронникова С. В. Генетическая паспортизация популяций редких видов рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров // Изв. ТСХА. 2009. Вып. 1. С. 82–88.
- Боронникова С. В., Бобошина И. В. Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений. Патент: RU 2 505 956 С 2. Опубл. 20.11.2013.
- Вишнякова М. А., Гончаров Н. П. Институционализация генетики и отдаленной гибридизации растений в 1920–1930-е гг. в ВИРе // Генетика. 2019. Т. 55, № 11. С. 1241–1252.
- Волкова Н. Е. Банки ДНК рослин для збереження генетичних ресурсів (огляд) // Plant varieties studying and protection. 2016. № 4 (33).
- Губарева Н. К., Гаврилюк И. П., Конарев А. В. Идентификация сортов сельскохозяйственных культур по электрофоретическим спектрам запасных белков // Всерос. ин-т генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР). 2015. № 11. С. 21–27.
- Дьяченко Е. А., Филюшин М. А., Кочиева Е. З. Вариативность интрона пластидного гена *trnL* у видов Faboideae (сем. Fabaceae) // ВЖГиС. 2014. Т. 18, № 4/1. С. 724–731.
- Егги Э. Э., Потокина Е. К. Перекрестник или самоопылитель? Электрофоретическое разделение полипептидов семян для определения способа опыления у бобовых // Ботан. журн. 1998. Т. 83, № 12. С. 77–83.
- Есимбекова М. А., Булатова К. М., Кушанова Р. Ж., Мукин К. Б. Биоразнообразие дикорастущих видов из рода *Aegilops* L. в Казахстане для селекции пшеницы // Изв. ТСХА. 2015. Вып. 6. С. 5–17.
- Жмудь Е. В., Елисафенко Т. В., Кривенко Д. А., Верхозина А. В., Звягина Н. С., Дорогина О. В. Состояние ценопопуляций *Astragalus sericeocanus* (Fabaceae) – эндемика восточного побережья озера Байкал // Ботан. журн. 2012. Т. 97, № 10. С. 1310–1320.
- Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений и проблемы агрофлоры (теория и практика). Т. 1. М.: ООО “Издательство Агрорус”, 2004. 690 с.
- Звягина Н. С., Дорогина О. В. Генетическая дифференциация Алтае-Саянского эндемика *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae), по данным межмикросателлитного анализа геномной ДНК // Генетика. 2013. Т. 49, № 10. С. 1183–1189.
- Калаев В. Н., Землянхуина О. А., Карпеченко И. Ю., Карпеченко К. А., Кондратьева А. М., Вепринцев В. Н., Карпеченко Н. А., Карпова С. С., Моисеева Е. В., Баранова Т. В. Использование методов молекулярно-генетического анализа для изучения полиморфизма ДНК растений рода *Rhododendron* с целью их паспортизации // Фундамент. исследования. 2012. № 6 (2). С. 323–328.
- Князев М. С. Новый гибридогенный вид *Hedysarum* из Восточной Европы // Ботан. журн. 2011. Т. 96, № 8. С. 1122–1126.
- Конарев А. В., Цикало Н. В., Жиров Е. Г. Анализ геномного состава амфидиплоидов по белкам зерна // Бюл. ВИР. 1985. Вып. 149. С. 751–757.
- Милютин Т. Н., Шейкина О. В., Новиков П. С. Молекулярно-генетические исследования изменчивости клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* по ISSR-маркерам // Хвойные бореальной зоны. 2013. № 1-2 (XXXI). С. 102–105.

- Мурасева Д. С., Звягина Н. С., Новикова Т. И., Дорогина О. В. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonninkovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2017. № 21. С. 554–560.
- Поморцев А. А., Рубанович А. В., Ковалева О. Н., Лялина Е. В. Аллельное разнообразие гордеин-кодирующих локусов *Hrd A* и *Hrd B* у дикого (*Hordeum spontaneum* С. Koch) и культурного (*Hordeum vulgare* L.) ячменя в Израиле и Палестине // Генетика. 2019. Т. 55, № 11. С. 1298–1311.
- Скапцов М. В., Белкин Д. Л., Смирнов С. В., Куцев М. Г. Соматональная изменчивость девясила британского – *Inula britannica* L. в культуре *in vitro* // Turczaninovia. 2015. Vol. 8 (4). С. 41–48.
- Тарвердян А. П., Меликян А. Ш., Арутюнян М. Г., Оганесян М. Ц. Результаты использования генофонда диких сородичей зерновых культур Армении как средства для создания новых продуктивных сортов // Изв. ТСХА. 2013. Вып. 1. С. 71–78.
- Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2011. Т. 15, № 4. С. 757–768.
- Чесноков Ю. В., Косолапов В. М. Генетические ресурсы растений и ускорение селективного процесса. М.: ООО “Украинская типография”, 2016. 172 с.
- Шилкина Е. А. Генетические методы в мониторинге сибирских лесов. ЛПК “Сибири”. 2017. № 4. URL: <https://lpk-sibir.ru/forest-management/protection-of-forests/geneticheskie-metody-v-monitoringe-sibirskih-lesov/>
- Шнеер В. С., Коцеруба В. В. Криптические виды растений и их выявление по генетической дифференциации популяций // Экол. генетика. 2014. Т. 12, № 3. С. 12–31.
- Эрст А. А., Звягина Н. С., Новикова Т. И., Дорогина О. В. Клональное микроразмножение редкого вида *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) и оценка генетической стабильности регенерируемых растений с помощью ISSR-маркеров // Генетика. 2015. Т. 51, № 2. С. 188–193.
- Abraham E. M., Ganopoulos I., Giagourta P., Osathanunkul M., Bosmali I., Tsiftaris A., Papaioannou A., Madesis P. Genetic diversity of *Lotus corniculatus* in relation to habitat type, species composition and species diversity // Biochem. Syst. Ecol. 2015. Vol. 63. P. 59–67.
- ACDB DNA Bank <https://www.acdb.co.za/acdb-dna-bank/> view accessed: 12.2019
- Anderson J. T., Mitchell-Olds T. Ecological genetics and genomics of plant defenses: Evidence and approaches // Funct. Ecol. 2011. Vol. 25 (2). P. 312–324.
- Anderson J. T., Willis J. H., Mitchell-Olds T. Evolutionary genetics of plant adaptation // Trends Genet. 2011. Vol. 27 (7). P. 258–266.
- Andersson M. S., Fuquen E. M., de Vicente M. C. (eds). State of the art of DNA storage: results of a worldwide survey. DNA banks – providing novel options for genebanks? Topical Reviews in Agricultural Biodiversity / Int. Plant Genet. Res. Institute, Rome, Italy, 2006. P. 6–11.
- Arif I. A., Bakir M. A., Khan H. A., Farhan A. H., Homaïdan A. A., Bahkali A. H., Sadoon M., Shobrak M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity // Int. J. Mol. Sci. 2010. Vol. 11 (5). P. 2079–2096.
- Badaeva E. D., Surzhikov S. A., Agafonov A. V. Molecular-cytogenetic analysis of diploid wheatgrass *Thinopyrum bessarabicum* (Savul. and Rayss) A. Löve // Comp. Cytogen. 2019. Vol. 13, N 4. P. 389–402.
- Baum B. R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A. V. A taxonomic revision of the genus *Campeitostachys* Drobov // J. Syst. Evol. 2011. Vol. 49, N 2. P. 146–159.
- Bonnet J., Colotte M., Coudy D., Couallier V., Portier J., Morin B., Tuffet S. Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, N 5. P. 1531–1546.
- Botstein D., White R. L., Scolnick M., Davis R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
- Brown W. Invest in a DNA bank for all species // Nature. 2011. Vol. 476. P. 399.
- Chen L., Chen F., He S., Ma L. High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers // Electr. J. Biotechnol. 2014. Vol. 17. P. 268–274.
- Dewey D. R. Genomic and phylogenetic relationships among North American Triticeae grasses / Eds. J. E. Estes et al. Grasses and Grasslands. Univ. of Oklahoma Press, 1984. P. 51–80.
- DNA Banks and Genetic Resources Repositories in the United States. <https://www.idigbio.org/genetic-resources> view accessed: Vol. 12. 2019.
- Dulloo E., Nagamura Y., Ryder O. DNA storage as a complementary conservation strategy. State of the art of DNA storage: results of a worldwide survey // Agricultural Biodiversity. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. DNA storage as a complementary conservation strategy, 2006. P. 12–22.
- Flores-Olvera H., Zumaya S., Borsch T. Two new species of *Iresine* (Amaranthaceae: Gomphrenoideae) from Mexico supported by morphological and molecular characters // Willdenowia. 2016. Vol. 46. P. 165–174.
- Gaál E., Valárik M., Molnár I., Farkas A., Linc G. Identification of COS markers specific for *Thinopyrum elongatum* chromosomes preliminary revealed high level of macrosyntentic relationship between the wheat and *Th. elongatum* genomes // PLoS One. 2018. Vol. 13. P. e0208840.
- Gantait S., Debnath S., Nasim A. M. Genomic profile of the plants with pharmaceutical value // J. Biotech. 2014. Vol. 4, N 6. P. 563–578.
- Gaskin J. F. The role of hybridization in facilitating tree invasion // AoB Plants. 2016. Vol. 9 (1). plw079.
- Gemeinholzer B., Rey I., Weising K., Grundmann M., Muellner A. N., Zetzsche H., Droege, G., Seberg O., Petersen G., Rawson D., Weigt L. Organizing specimen and tissue preservation in the field for subsequent molecular analyses // Abc Taxa. 2010. Vol. 8. P. 129–157.
- Gordon S. P., Sloop C. M., Davis H. G., Cushman J. H. Population genetic diversity and structure of two rare vernal pool grasses in central California // Conserv. Gen. 2012. Vol. 13 P. 117–130.
- Grigoreva E., Ulianich P., Ben C., Gentzbittel L., Potokina E. First insights into the Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) genome of the ‘Vavilovskij 130’ accession, using second and third-generation se-

- quencing technologies // Генетика. 2019. Т. 55, № 11. С. 1299–1305.
- Gustafson D. J., Gibson A. Genetic considerations in plant ecological restoration. 2019.
- Hamouda M. Molecular analysis of genetic diversity in population of *Silybum marianum* (L.) Gaertn in Egypt // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2019. Vol. 17, N 1. P. 12.
- Ivetić V., Devetaković J., Nonić M., Stanković D., Šijačić-Nikolić M. Genetic diversity and forest reproductive material – from seed source selection to planting // iForest – Biogeosciences and Forestry. 2016. Vol. 9, N 5. P. 801–812.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping // Nucl. Acids Res. 2001. Vol. 29. P. e25
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. Hypervariable ‘mini-satellite’ regions in human DNA // Nature. 1985. Vol. 314. P. 67–73.
- Jensen K. B. Cytology, fertility and morphology of *Elymus kengii* (KENG) Tzvel and *E. grandiglumis* (KENG) A. Love (Triticeae: Poaceae) // Genome. 1990. Vol. 33. P. 563–570.
- Jump A. S., Pecuelas J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 8096–8100.
- Kalendar R., Flavell A. J., Ellis T. H., Sjakste T., Moisy C., Schulman A. H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers // Heredity. 2011. Vol. 106, N 4. P. 520–530.
- Kalendar R., Schulman A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1. P. 2478–2484.
- Kaljudn K., Jaaska V. No loss of genetic diversity in small and isolated populations of *Medicago sativa* subsp. *falcata* // Biochem. System. Ecol. 2010. Vol. 38. P. 510–520.
- Karık Ü., Nadeem M. A., Habyarimana E., Erciqli S., Yildiz M., Yilmaz A., Yang S. H., Chung G., Faheem S. B. Exploring the Genetic Diversity and Population Structure of Turkish Laurel Germplasm by the iPBS-Retrotransposon Marker System // Agronomy. 2019. Vol. 9, N 10. P. 647.
- Kim J. S., Ahn S. G., Kim C. K., Shim C. K. Screening of rice blast resistance genes from aromatic rice germplasms with SNP markers // Plant. Pathol. J. 2010. Vol. 26. P. 70–79.
- Kloet A. H. de, Kerski A., Kloet S. R. de. Diagnosis of *Avian bornavirus* infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami // J. Veterinary Diagnostic Investigation. 2011. Vol. 23, N 3. P. 421–429.
- Konieczny A., Ausubel F. M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotypespecific PCR-based markers // Plant J. 1993. Vol. 4. P. 403–410.
- LaBar T., Adami C. Different evolutionary paths to complexity for small and large populations of digital organisms // PLoS Comput Biol. 2016. Vol. 12, N 12. P. e1005066.
- Li Y. Y., Guan S. M., Yang S. Z., Luo Y., Chen X. Y. Genetic decline and inbreeding depression in an extremely rare tree // Conserv. Gen. 2012. Vol. 13. P. 343–347.
- Liu L., Chen W., Zheng X., Li J., Yan D.-T., Liu L., Liu X., Wang Yi-L. Genetic diversity of *Ulmus lamellosa* by morphological traits and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers // Biochem. Syst. Ecol. 2016. Vol. 66. P. 272–280.
- Lopes M. S., Mendonc D., Bettencourt S. X., Borba A. R., Melo C., Baptista C., Machado A. Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from inter-simple sequence repeat markers // AoB PLANTS. 2014. Vol. 6. plu034.
- Mahelka V., Kopecky D., Baum B. R. Contrasting patterns of evolution of 45S and 5S rDNA families uncover new aspects in the genome constitution of the agronomically important grass *Thinopyrum intermedium* (Triticeae) // Mol. Biol. Evolut. 2013. Vol. 30, N 9. P. 2065–2086.
- Marghali S., Zitouna N., Gharbi M., Chennaoui-Kourda H., Trifi-Farah N. Evaluation of genetic diversity in *Sulula coronaria* from different geographical populations in Tunisia by inter simple sequence repeat (ISSR) // Afr. J. Biotechnol. 2012. Vol. 11. P. 12158–12166.
- Maschinskia J., Matthew A. A. Center for Plant Conservation’s Best Practice Guidelines for the reintroduction of rare plants // Plant Diversity. 2017. Vol. 39, N 6. P. 390–395.
- McCouch S. R., Zhao K., Wright M., Tung C. W., Ebana K., Thomson M., McClung A. Development of genome wide SNP assays for rice // Breed. Sci. 2010. Vol. 60, N 5. P. 524–535.
- Missouri Botanical Garden DNA Bank. <https://www.missouribotanicalgarden.org/plant-science/plant-science/william-l-brown-center/wlbc-resources/wlbc-databases/dna-bank.aspx> view accessed: 12. 2019.
- Naeem R. Molecular markers in plant genotyping // Journal of Bio-Molecular Sciences (JBMS). 2014. Vol. 2, N 3. P. 78–85.
- Neale J. R. Genetic considerations in rare plant reintroduction: practical application (or how are we doing?) / Eds. J. Maschinski, K. E. Haskins // Plant Reintroduction in a Changing Climate. Washington: Promises and Perils, Island Press, 2012. P. 71–88.
- Noreen A. M. E., Webb E. L. High genetic diversity in a potentially vulnerable tropical tree species despite extreme habitat loss // PloS One. 2013.
- Olson M., Hood L., Cantor C., Dotstein D. A common language for physical mapping of the human genome // Science. 1989. Vol. 245. P. 1434–1435.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electro-phoresis as single-strand conformation polymorphisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 2766–2770.
- Paran I., Michelmore R. W. Development of reliable PCRbased markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce // Theor. Appl. Genet. 1993. Vol. 85. P. 985–993.
- Parker J., Helmstetter A. J., Devey D., Wilkinson T., Papadopoulos A. S. Field-based species identification of closely-related plants using real-time nanopore sequencing // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, N 1. P. 8345. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-08461-5> view accessed: 12.2019.
- Plant DNA Bank in Korea: <http://pdbk.korea.ac.kr/> view accessed: 12.2019.
- Rice N., Cordeiro G., Shepherd M., Bundock P., Bradbury L., Pacey-Miller T., Furtado A., Henry R. DNA Banks and their role in facilitating the application of

- genomics to plant germplasm // Centre for Plant Conservation Genetics Papers, 2006. N 4.
- Rose L. A., Bernatchez L., Bonin A., Buerkle C. A., Carstens B. C., Emerson B. C., Garant D., Giraud T., Kane N. C., Rogers S. M., Slate J., Smith H., Sork V. L., Stone G. N., Vines T. H., Waits L., Wildmer A., Risenberg L. H. Invited reviews and meta-analyses. A road map for molecular ecology // *Mol. Ecol.* 2013. Vol. 22. P. 2605–2626.
- Särkinen T. E., Marcelo-Peña J. L., Yomona A. D., Simon M. F., Pennington T. P., Hughes C. E. Underestimated endemic species diversity in the dry inter-Andean valley of the Rio Marañon, northern Peru: an example from *Mimosa* (Leguminosae, Mimosoideae) // *Taxon.* 2011. Vol. 60, N 1. P. 139–150.
- Shmakov N. A., Afonnikov D. A., Belavin P. A., Agafonov A. V. The suitability of the *BMY 2* and *WAXY* genes and internal transcribed spacers of *RRNA* as markers for studying genetic variability in *Elymus* species // *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015. Vol. 5, N 3. P. 300–307.
- Stegemann S., Keuthe M., Greiner S., Bock R. Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species // *PNAS.* 2012. Vol. 109, N 7. P. 2434–2438.
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes // *Nucl. Acids Res.* 1984. Vol. 12. P. 4127–4138.
- The DNA and Tissue Bank at Kew <http://data.kew.org/dnabank/homepage.html> view accessed: 12. 2019.
- The DNA Bank of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin (BGBM) <https://www.bgbm.org/en/dna-bank> view accessed: 12. 2019.
- The DNA Bank of the Natural History Museum of Oslo (NHMO) <https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/dna-bank/> view accessed: 01. 2020.
- The Top 10 Plant Genome Databases <http://www.global-engage.com/agricultural-biotechnology/best-plant-genome-database/> view accessed: 12. 2019.
- Torabinejad J., Mueller R. J. Genome constitution of the Australian hexaploid grass, *Elymus scabrus* (Poaceae: Triticeae) // *Genome.* 1993. Vol. 36. P. 147–151.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee van de T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucl. Acids Res.* 1995. Vol. 23. P. 4407–4414.
- Wang D. G., Fan J. B., Siao C. J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M. S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T. J., Lipshutz R., Chee M., Lander E. S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome // *Science.* 1998. Vol. 280. P. 1077–1082.
- Waugh R., McLean K., Flavell A. J., Pearce S. R., Kumar A., Thomas B. B., Powell W. Genetic distribution of *Bare-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. Vol. 253. P. 687–694.
- Welsh J., Chada K., Dalal S. S., Cheng R., Ralph D., McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA // *Nucl. Acids Res.* 1992. Vol. 20. P. 4965–4970.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 6531–6535.
- Willi Y., Buskirk J. V., Hoffmann A. A. Limits to the adaptive potential of small populations // *Ann. Rev. Ecol. Evol. System.* 2006. Vol. 37. P. 433–458.
- World Database on Key Biodiversity Areas <https://www.iucn.org/resources/conservation-tools/world-database-on-key-biodiversity-areas> view accessed: 12. 2019
- Zhang W., Zhang R., Feng Y., Bie T., Chen P. Distribution of highly repeated DNA sequences in *Haynaldia villosa* and its application in the identification of alien chromatin // *Chin. Sci. Bul.* 2013. Vol. 58, N 8. P. 890–897.
- Zhao X. F., Ma Y. P., Sun W. B., Wen X., Milne R. High genetic diversity and low differentiation of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic in southeast Yunnan, China // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. P. 4396–4411.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* 1994. Vol. 20. P. 176–183.
- Zvyagina (Nuzhdina) N. S., Dorogina O. V., Catalan P. Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae) // *Biochem. Syst. Ecol.* 2016. Vol. 69. P. 176–187.

Molecular genetic methods in plant ecology

O. V. DOROGINA, E. V. ZHMUD

*Central Siberian Botanical Garden of SB RAS
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101
E-mail: olga-dorogina@yandex.ru*

Molecular genetic analysis widely used in various fields of science currently. Molecular ecology for environmental assessment is the basis of the modern methodological base. Different species and populations contain a large supply of genetic variation. This which plays a major role in the adaptation of species to certain environmental conditions. A significant part of this variation does not have a clear phenotypic expression and constitutes a hidden stock of genetic variation, which greatly complicates the study of the huge genetic potential of genera, species, and populations.

More convenient markers for studying these issues are seed proteins and DNA, which are characterized by significant intraspecific polymorphism and independence from the external conditions of plant growth, and electrophoresis of storage seed proteins and all methods of PCR amplification of genomic DNA.

This review shows the role of molecular genetic methods in solving traditional environmental problems related to taxonomy, phylogeny, evolution, the study of genetic variability and the identification of inbreeding depression in natural and artificially created populations of endemic, rare and endangered species, as well as their certification (by stroke – coding) and the creation of DNA banks.

Key words: biodiversity, seed storage proteins, DNA markers, populations, species, intra – and inter-population variability, the preservation of the gene pool, rare and endangered species of plants, reconstruction, artificial populations.