

© А.А Трифонова¹, Е.З Кочиева²,
А.М. Кудрявцев²

¹ Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова» РАН, Москва;

² Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Москва

Впервые проведен ISSR-анализ 93 образцов редкого эндемичного вида *Allium regelianum*, произрастающего в Волгоградской области. С использованием шести праймеров было получено 109 фрагментов, из которых 87 (79,8 %) оказались полиморфными. Дана оценка внутри- и межпопуляционному разнообразию *A. regelianum*. Наиболее высокие показатели внутривидового разнообразия отмечены для популяций из хутора Красноярский, Серафимовичского района, и лимана Хреноватый, Николаевского района. Анализ межпопуляционных различий выявил достаточно высокий уровень сходства между популяциями и низкий уровень подразделенности.

✿ **Ключевые слова:** *Allium regelianum*; редкие и исчезающие растения; генетическое разнообразие; ISSR-анализ.

НИЗКИЙ УРОВЕНЬ ПОДРАЗДЕЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКОГО ВИДА *ALLIUM REGELIANUM* А.К. ВЕККЕР EX *ILJIN* ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ISSR-АНАЛИЗА

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение растительного разнообразия включает не только создание механизмов, предотвращающих сокращение численности редких видов, но и их изучение и мониторинг. Характеристика состояния популяций редких эндемичных видов растений, наряду с изучением возрастной структуры, особенностей биологии и репродукции, предполагает оценку генетического разнообразия вида и его популяционно-генетической структуры [1, 2]. Генетическое разнообразие можно рассматривать в качестве одного из важных параметров, определяющих адаптацию вида к изменяющимся условиям среды [3]. Именно данные об уровне генетической вариативности должны лежать в основе разработки стратегии сохранения видов, находящихся под угрозой исчезновения [4, 5].

В настоящее время существуют программы по изучению и сохранению редких эндемичных видов растений, которые предполагают разработку основ природоохранной деятельности с учетом необходимости сохранения генетического разнообразия. Так, сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада разработана комплексная программа и план мероприятий по изучению и сохранению редкого эндемичного вида *Allium regelianum* (лук регелевский) на территории области.

A. regelianum А.К. Веcker ex Iljin — многолетнее травянистое луковичное растение. Включен в Красную книгу РФ, где ему присвоен наивысший статус редкости 1(Е) — вид, находящийся под угрозой полного исчезновения [6]. Лук регелевский является перекрестноопыляемым растением, размножается семенами и вегетативно и произрастает на сухих солонцеватых и солончаковых лугах в поймах рек, по окраинам степных лиманов, на солонцеватых степных склонах. Основными лимитирующими факторами распространения вида являются высокая пастбищная нагрузка, ежегодное сенокошение, распашка и мелиорация лугов [6].

Помимо работы, заключающейся в определении современного состояния популяций *A. regelianum* в регионе (установление их точного географического местонахождения, площади и численности, возрастной структуры, характера и степени антропогенного воздействия), изучении биологических особенностей развития и размножения *A. regelianum*, предполагается исследование генетической структуры вида в пределах региона. Это станет основой для создания и поддержания генетического резерва вида *ex situ* (в виде генетического банка семян, образцов ДНК), отражающего его генетическое разнообразие [7].

Дать характеристику генетическому разнообразию редких видов растений, а также получить данные о межпопуляционном и внутривидовом полиморфизме и генетической структуре популяций позволяет применение молекулярно-генетических методов [8–10]. В частности, для характеристики полиморфизма редких видов растений, геном которых практически не изучен, применяют методы мультилокусного анализа, которые позволяют оценить вариативность большей части генома. До настоящего времени генетическое разнообразие *A. regelianum* было оценено лишь с помощью микросателлит-

Поступила в редакцию 14.01.2017
Принята к публикации 24.03.2017

ных локусов [11], а исследования с помощью мультилокусных методов не проводились.

Одним из молекулярно-генетических методов, достаточно часто применяющихся для анализа генетического разнообразия, является ISSR-анализ (Inter Simple Sequence Repeats) — это анализ участков ДНК, амплифицированных между близко расположенными микросателлитными последовательностями [12]. Данный мультилокусный метод анализа не требует предварительного знания последовательности анализируемой ДНК, высокопроизводим и прост в исполнении, поэтому его часто используют для анализа генетического разнообразия, в том числе малоизученных редких видов растений [13–15].

Целью данной работы стала оценка генетического разнообразия и определение популяционно-генетической структуры *A. regelianum* с помощью ISSR-маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ было взято 93 образца *A. regelianum* из 11 точек сбора в Волгоградской области (табл. 1, рис. 1).

Образцы собраны в ходе экспедиций сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада.

ДНК выделяли из свежих растительных тканей СТАВ-методом [16].

Реакцию ПЦР проводили согласно следующему протоколу: 500 нМ ISSR-праймера (Евроген), 0,25 мМ каждого дезоксинуклеотида (Диалат ЛТД), 1,5 мМ MgCl₂ (Диалат ЛТД), 1-кратный ПЦР-буфер (Диалат ЛТД), 1 единицу Taq-полимеразы (Диалат ЛТД) и 20 нг ДНК, общий объем реакционной смеси — 15 мкл. Амплификацию фрагментов проводили на приборе ABI GenAmp-9700, используя следующую программу: 94 °С — 5 мин; 40 циклов: 94 °С — 45 с, T_{отж} — 45 с, 72 °С — 1 мин; 72 °С — 7 мин. Продукты амплификации разделяли в 2 % агарозном геле и окрашивали раствором бромистого этидия.

Для оценки генетического полиморфизма образцов *A. regelianum* были протестированы 14 праймеров (Primer Set № 9 University of British Columbia): UBC807, UBC810, UBC811, UBC815, UBC816, UBC826, UBC834, UBC835, UBC841, UBC855, UBC857, UBC861, UBC873, UBC880, отобранных по литератур-

Таблица 1

Образцы *Allium regelianum*, взятые для анализа Accessions of *Allium regelianum* taken for analysis

Точка сбора	Административный район	Количество образцов	Номер образцов	Географические координаты сбора образцов	
				широта N	долгота E
№ 1	Волгоградская область, Быковский район, 4,5 км восточнее поселка Демидов, лиман Тажи	6	1–6	49° 12' 28"	45° 26' 05"
№ 2	Волгоградская область, Николаевский район, 9 км севернее поселка Красный Мелиоратор, лиман Хреноватый	20	7–26	50° 5' 60"	46° 2' 44"
№ 3	Волгоградская область, Николаевский район, 3 км южнее поселка Красный Мелиоратор, лиман Медвежий	5	27–31	49° 59' 49"	46° 4' 35"
№ 4	Волгоградская область, Николаевский район, 6 км юго-восточнее поселка Красный Мелиоратор, лиман Богатырев	11	32–42	49° 59' 49"	46° 10' 16"
№ 5	Волгоградская область, Иловлинский район, 4,5 км восточнее хутора Ерецкий	1	43	49° 14' 09"	43° 53' 24"
№ 6	Волгоградская область, Фроловский район, 2 км южнее хутора Выездинский	2	44–45	49° 30' 34"	43° 27' 53"
№ 7	Волгоградская область, Серафимовичский район, 7,5 км западнее хутора Дружилинский	4	46–48	50° 12' 22"	42° 7' 40"
№ 8	Волгоградская область, Серафимовичский район, 1 км западнее хутора Красноярский	30	49–78	49° 27' 60"	42° 52' 50"
№ 9	Волгоградская область, Серафимовичский район, 4 км севернее хутора Буерак-Поповский	6	79–84	49° 35' 26"	42° 37' 13"
№ 10	Волгоградская область, Серафимовичский район, 2 км южнее хутора Новоалександровский	4	85–88	49° 37' 23"	42° 42' 40"
№ 11	Волгоградская область, Алексеевский район, 3 км северо-западнее станицы Усть-Бузулукская	5	89–93	49° 21' 11"	43° 4' 58"

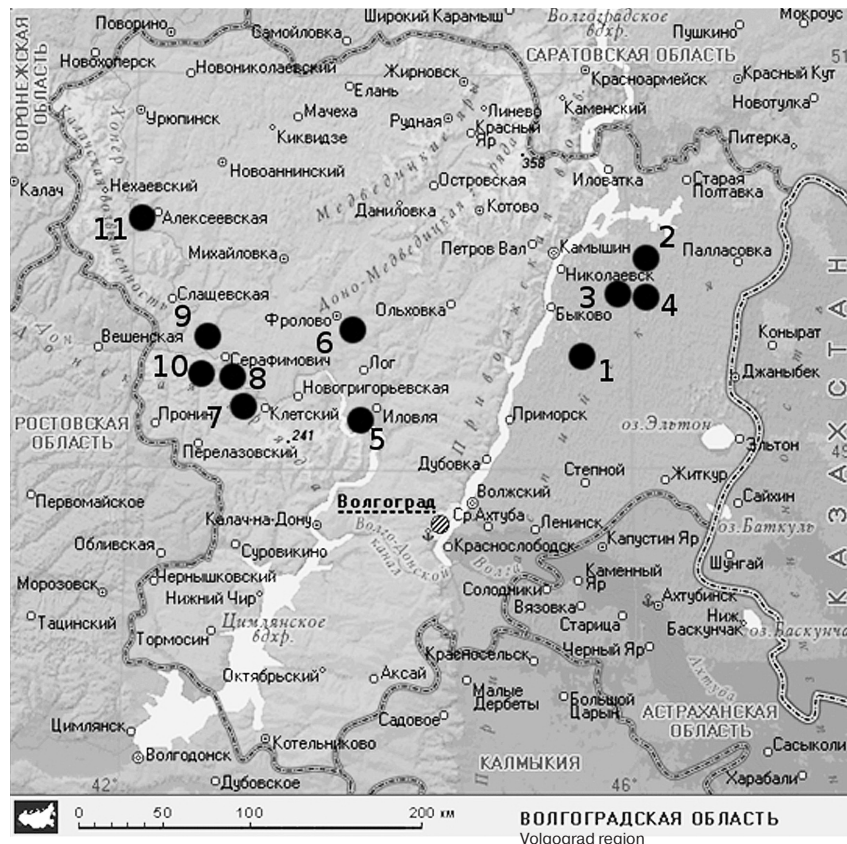


Рис. 1. Расположение точек сбора образцов *A. regelianum* на карте. Номера точек сбора соответствуют представленным в табл. 1
 Fig. 1. Sampling locations of *A. regelianum*. Numbers of sampling locations corresponds to the numbers in Table 1

Таблица 2

Праймеры, использованные для анализа
Primers used in the study

Праймер	Последовательность	$T_{отж}$	Число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Процент полиморфных локусов
UBC807	(AG) ₈ T	45	17	13	76,5
UBC810	(GA) ₈ T	45	20	16	80,0
UBC811	(GA) ₈ C	50	17	15	88,2
UBC826	(AC) ₈ C	50	18	12	66,7
UBC841	(GA) ₈ YC	50	22	18	81,8
UBC873	(GACA) ₄	45	15	13	86,7
Всего			109	87	79,8
Среднее значение			18,2	14,5	79,9

ным данным [17–19]. Из них было выбрано 6 праймеров, которые позволяли детектировать максимальное число полиморфных фрагментов (табл. 2).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью макроса GenAlEx 6.41, программ POPGEN1.32 и PAST 3.11 [20–22]. Для описания генетической структуры популяции была использована G_{ST} -статистика Ней [23], которая является эквивалентом F_{ST} -статисти-

ки Райта и оценивает следующие параметры: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей популяции как мера общего генного разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в субпопуляции как мера ее внутривидового разнообразия; доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций (G_{ST}).

Кроме того, был проведен анализ популяционной структуры с помощью алгоритма Байеса в программе STRUCTURE 2.3.1 [24]. Для анализа использовали модель, предполагающую смешение генетического материала (admixture model), а также корреляционные модели, предполагающие наследование аллелей от общего предка путем дрейфа генов. Анализ производился в десятикратной повторности для числа субпопуляций $k = 1$ до $k = 15$, при количестве повторов 10^6 и burn in — 10^6 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ISSR-анализа 93 образцов *A. regelianum* было идентифицировано 109 фрагментов, из которых 87 (79,8 %) оказались полиморфными. Число фрагментов ДНК, амплифицируемых одним праймером, составило от 15 (UBC873) до 22 (UBC841) (рис. 2).

Максимальное число полиморфных фрагментов получено с помощью праймера UBC841 (18), минимальное — UBC826 (12). Уровень полиморфизма, выявляемого одним праймером, колебался в пределах от 66,7 % (для праймера UBC816) до 88,2 % (для праймера UBC811) (см. табл. 2).

Определение уровней внутривидового полиморфизма. В связи с тем что *A. regelianum* относится к редким растениям, не во всех точках было найдено достаточное количество образцов для анализа внутривидового полиморфизма. Популяции, для которых количество собранных образцов превышало пять, были

взяты в анализ: это популяция из Быковского района (6 образцов), две популяции из Николаевского района (лиман Богатырев (11 образцов), лиман Хреноватый (20 образцов)), две популяции из Серафимовичского района (хутор Красноярский (30 образцов) и хутор Буерак-Поповский (6 образцов)). Для каждой популяций были рассчитаны основные показатели внутривидового генетического разнообразия (табл. 3).

Наиболее высокий уровень полиморфизма был выявлен для популяций из хутора Красноярский, Серафимовичского района (68,8 %), и лимана Хреноватый, Николаевского района (65,1 %), у последней также были наиболее высокие показатели эффективного числа аллелей, информационного индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Наиболее генетически однородной была популяция из хутора Буерак-Поповский, Серафимовичского района. Интересно, что популяция лимана Хреноватый оказалась наиболее разнообразной и при проведенном ранее микросателлитном анализе *A. regelianum* [11]. В целом же показатели внутривидового разнообразия, полученные методом SSR-анализа, были выше, чем те же показатели, полученные при ISSR-анализе. Это можно связать с тем, что SSR-анализ позволяет идентифицировать гетерозиготы.

Определение уровней межпопуляционных различий. Анализ межпопуляционной вариабельности *A. regelianum* выявил достаточно высокие значения индекса генетического сходства. Так, его значения варьиро-

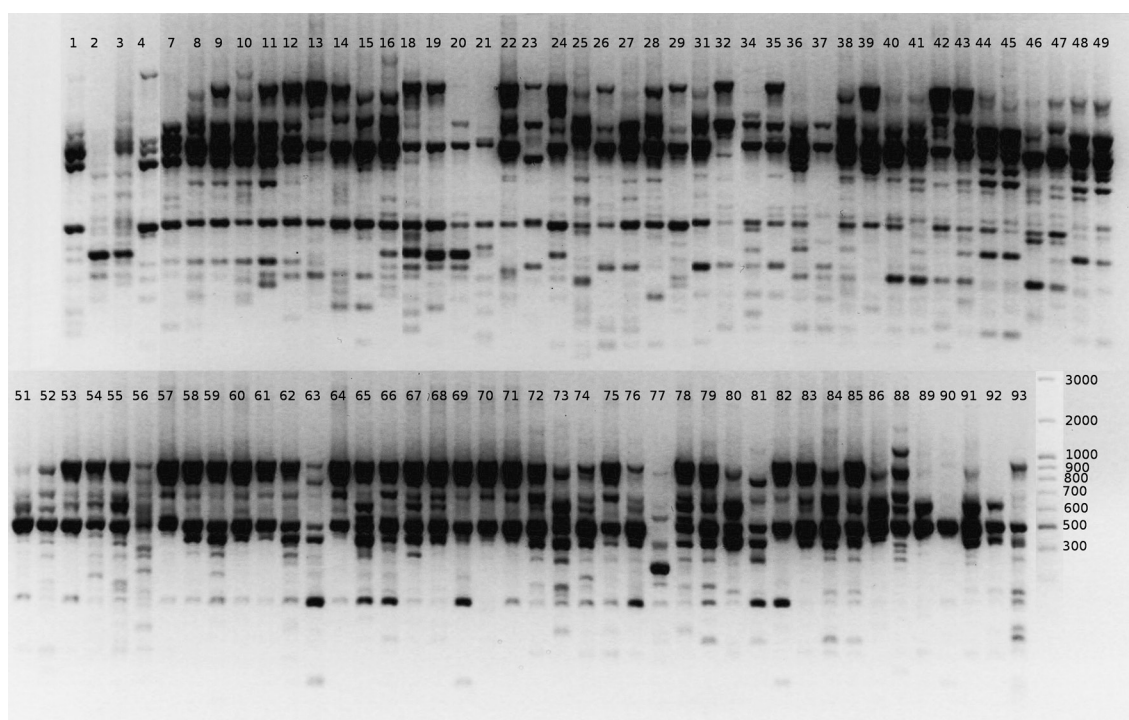


Рис. 2. ISSR-спектр образцов *A. regelianum* с праймером UBC841

Fig. 2. ISSR profiles of accessions of *A. regelianum* with primer UBC841

Таблица 3

Значения основных показателей генетического разнообразия в популяциях *A. regelianum*
Values of the main genetic diversity indices in the populations of *A. regelianum*

Показатель	Популяция				
	лиман Тажи, Быковского района	лиман Хреноватый, Николаевского района	лиман Богатырев, Николаевского района	хутор Красноярский, Серафимовичского района	хутор Буерак-Поповский, Серафимовичского района
Процент полиморфизма	41,3	65,1	54,1	68,8	33,9
Эффективное число аллелей	1,284 ± 0,037	1,433 ± 0,039	1,355 ± 0,037	1,399 ± 0,037	1,210 ± 0,033
Информационный индекс Шеннона	0,236 ± 0,028	0,357 ± 0,028	0,301 ± 0,028	0,347 ± 0,028	0,182 ± 0,026
Ожидаемая гетерозиготность	0,161 ± 0,020	0,243 ± 0,020	0,204 ± 0,020	0,231 ± 0,019	0,122 ± 0,018

вали от 0,88 (между популяциями из Быковского района (лиман Тажи) и Серафимовичского района (хутор Буерак-Поповский)) до 0,96 (между популяциями из Николаевского района (лиман Хреноватый) и Серафимовичского района (хутор Красноярский)). В то время как, например, для другого редкого вида лука *A. hirtifolium* (эндемик Ирана) коэффициенты генетического сходства между 17 популяциями, рассчитанные по результатам RAPD-анализа, варьировали от 0,49 до 0,73 [25].

Анализ генетической структуры пяти изученных популяций *A. regelianum* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам (H_s) составила 0,192, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку (H_t) не превышала 0,247. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) был равен 0,22, что говорит о том, что популяции дифференцированы относительно слабо. Для других редких видов луков подразделенность популяций была достаточно сильна. Так, значение F_{ST} для популяций эндемика Восточного Тибета *A. wallichii* составило 0,80 (по данным анализа участков хпДНК) и 0,74 (по данным анализа ITS-региона) [26], а для популяций *A. munzii*, произрастающих на территории Калифорнии, данный показатель достигает единицы (по данным анализа двух участков хпДНК) [27].

Анализ молекулярной варiances (AMOVA) показал, что в составе общей генетической гетерогенности вида лишь 17 % генетического разнообразия *A. regelianum* приходится на межпопуляционные различия и 83 % составляет доля внутривидового полиморфизма. Для других редких видов рода *Allium* именно межпопуляционные различия составляют большую часть изменчивости. Так, RAPD-анализ популяций редкого вида *A. aaseae*, собранных на территории штата Айдахо (США), показал, что доля межпопуляционной изменчивости составляет 84,5 % от общей изменчивости [27]. У видов *A. munzii* и *A. wallichii* доля межпопуляционных различий также была высока и составляла 87,7 и 74 % соответственно [26, 27].

Уровень межпопуляционных различий *A. regelianum*, полученный с помощью SSR-анализа, оказался еще меньше, чем в данном исследовании [11]. Так, при использовании SSR-анализа уровень подразделенности популяций составил 0,08, а анализ AMOVA показал, что всего 7 % генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия.

Значения генетических расстояний между образцами были использованы для проведения анализа методом главных координат в программе PAST 3.11. На PCoA-графике (рис. 3) нет четкой дифференциации популяций по местам сбора, хотя большая часть образцов из трех популяций Николаевского района и из популяции Быковского района группируются вместе и несколько обособлены от образцов из четырех популяций Серафимовичского района. Стоит отметить, что согласно молекулярным данным образцы из популяций Иловлинского, Фроловского, Алексеевского районов ближе к группе популяций Николаевского и Быковского районов, хотя географически больше отдалены от них, чем от популяций Серафимовичского района. Для подтверждения этих данных необходима большая выборка, что достаточно проблематично из-за малой численности этих популяций.

Кроме того, был проведен анализ популяционной структуры *A. regelianum* в программе STRUCTURE 2.3.1. Наилучшие результаты апостериорной вероятности ($\ln\text{Like} = -7211,8$) были получены для $K = 2$. Так же как и в случае PCoA-анализа, не выявлено соответствия между кластерами генотипов и изученными популяциями или группами популяций из одного района (рис. 4).

Такая структура популяций *A. regelianum*, вероятно, обусловлена существованием в прошлом единой популяции, которая с течением времени разделилась на субпопуляции, дифференциация которых связана в основном с их географическим положением.

Проведенный ISSR-анализ позволил выявить и оценить уровень генетического разнообразия популяций *A. regelianum* и проанализировать их генетическую

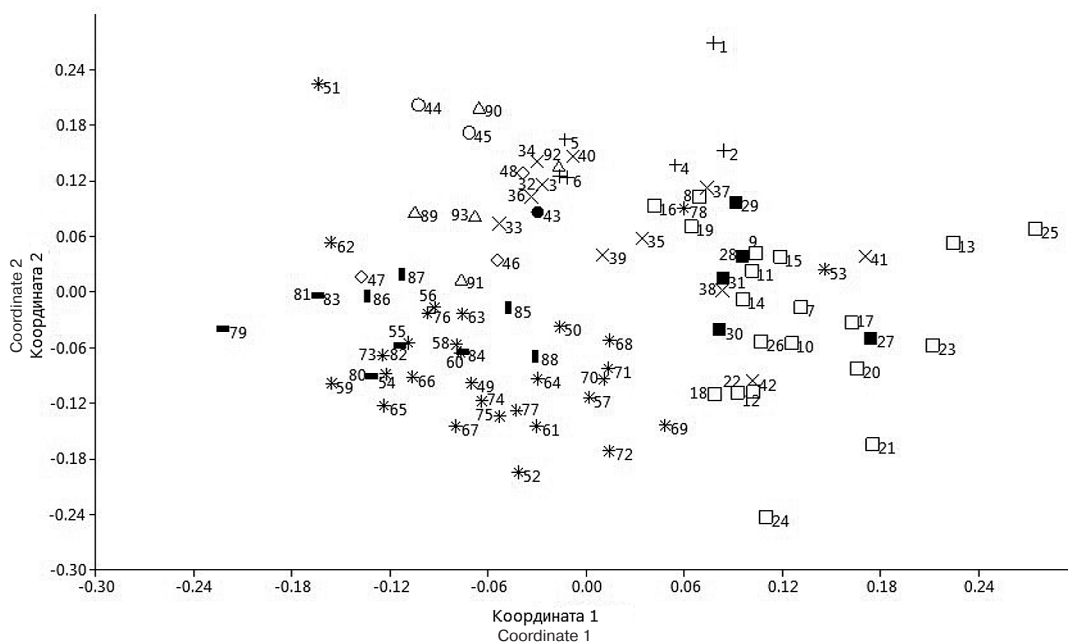


Рис. 3. Дифференциация изучаемых образцов *A. regelianum*, выявленная по данным ISSR-анализа с использованием метода главных координат. Одинаковыми символами обозначены образцы из одной популяции: + — Быковский район, лиман Тажи (№ 1–6); □ — Николаевский район, лиман Хреноватый (№ 7–26); ■ — Николаевский район, лиман Медвежий (№ 27–31); × — Николаевский район, лиман Богатырев (№ 32–42); ● — Иловлинский район, хут. Ерецкий (№ 43); ○ — Фроловский район, хут. Выездинский (№ 44–45); ◇ — Серафимовичский район, хут. Дружилинский (№ 46–48); * — Серафимовичский район, хут. Красноярский (№ 49–78); ■ — Серафимовичский район, хутор Буерак-Поповский (№ 79–84); ▨ — Серафимовичский район, хут. Новоалександровский (№ 85–88); △ — Алексеевский район, станция Усть-Бузулукская (№ 89–93)

Fig. 3. Differentiation of 93 individuals of *A. regelianum* based on principal coordinates analysis. Populations symbols: + — Bykovskii administrative region, liman Tazhi (No 1-6); □ — Nikolaevskii administrative region, liman Khrenovatyi (No 7-26); ■ — Nikolaevskii administrative region, liman Medvezhii (No 27-31); × — Nikolaevskii administrative region, liman Bogatyrev (No 32-42); ● — Ilovinskii administrative region, khutor Eretskii (No 43); ○ — Frolovskii administrative region, khutor Vyezinskii (No 44-45); ◇ — Serafimovichskii administrative region, khutor Druzhilinskii (No 46-48); * — Serafimovichskii administrative region, khutor Krasnoyarskii (No 49-78); ■ — Serafimovichskii administrative region, khutor Buerak-Popovskii (No 79-84); ▨ — Serafimovichskii administrative region, khutor Novoaleksandrovskaia (No 85-88); △ — Alekseevskii administrative region, stanitsa Ust'-Buzulukskaya (No 89-93)

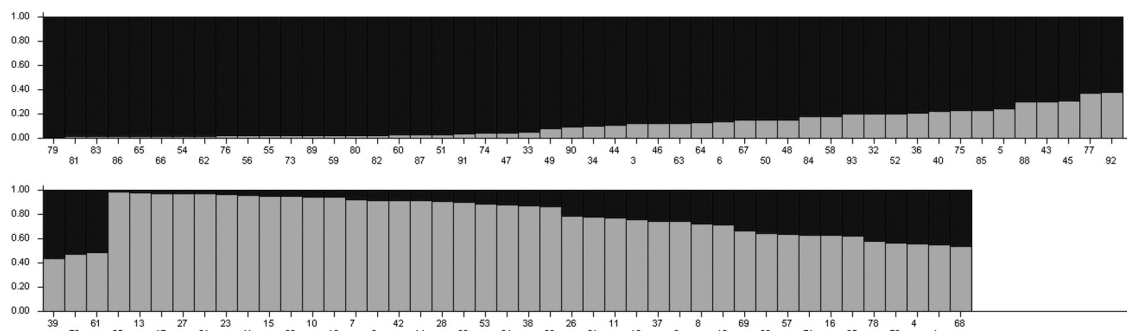


Рис. 4. Вероятность отнесения исследованных образцов *A. regelianum* к одной из групп по результатам анализа в программе Structure с числом субпопуляций $\kappa = 2$. Вертикальная ось — доля частот аллелей соответствующего кластера; горизонтальная ось — анализируемые образцы (номера соответствуют представленным в табл. 1)

Fig. 4. Probability of assignment of *A. regelianum* to groups identified by hierarchical STRUCTURE analysis, with the number of subpopulations $\kappa = 2$. Vertical axis — the proportion of allele frequencies of the corresponding cluster; the horizontal axis — the analyzed samples (numbers of samples corresponds to the numbers in Table 1)

структуру. Следует отметить высокий уровень генетического сходства между популяциями и низкий уровень их подразделенности.

В случае *A. regelianum*, когда нет существенных различий между популяциями, можно выбрать для сохранения несколько наиболее разнообразных популяций, так как они и будут отражать почти все генетическое разнообразие вида на данной территории. Кроме того, на основании нашего исследования можно выделить наиболее генетически отдаленные образцы, интересные генотипы и сохранять их в банке семян.

ЛИТЕРАТУРА

- Haig SM. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. 1998;79(2):413-425.
- Frankham R. Genetics and conservation biology. *C. R. Biologies*. 2003;(326):22-29. doi: 10.1016/S1631-0691(03)00023-4.
- Soule ME, Simberloff D. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? *Biological Conservation*. 1986;35(1):9-40.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim SC, Crawford DJ. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany*. 2000;87(7):909-919.
- Rottenberg A, Parker JS. Conservation of the critically endangered *Rumex rothschildianus* as implied from AFLP diversity. *Biological Conservation*. 2003;(114):299-303. doi: 10.1016/S0006-3207(03)00049-1.
- Красная книга Российской Федерации (Растения и грибы). — М.: Министерство природных ресурсов и экологии РФ и Росприроднадзор, 2008. — С. 46–47. [The Red Book of the Russian Federation (Plants and Fungi). Moscow: Ministerstvo Prirodnykh Resursov i Ekologii Rossiiskoi Federatsii, Rosprirodnadzor; 2008. P. 46-47. (In Russ.)]
- Агеев С.Е., Коротков О.И., Гребенников К.А., и др. Опыт изучения и сохранения вида *Allium regelianum* A. Becker Волгоградским региональным ботаническим садом на территории Волгоградской области // Вестник удмуртского университета. — 2012. — № 3. — С. 34–40. [Ageeva SE, Korotkov OI, Grebennikov KA, et al. The experience of studying and preserving the species *Allium regelianum* A. Becker has regional Botanical Garden in the territory of the Volgograd region. *The Bulletin of Udmurt University Biology & Earth Sciences*. 2012;(3):34-40. (In Russ.)]
- Bian F, Pang Y, Wang Z, et al. Genetic diversity of the rare plant *Anemone shikokiana* (Makino) Makino (Ranunculaceae) inferred from AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution*. 2015;301(2):677-684. doi: 10.1007/s00606-014-1105-x.
- Walisch TJ, Colling G, Bodenseh M, Matthies D. Divergent selection along climatic gradients in a rare central European endemic species, *Saxifraga sponhemica*. *Annals of Botany*. 2015;115(7):1177-1190. doi: 10.1093/aob/mcv040.
- Szczecińska M, Sramko G, Wolosz K, Sawicki J. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PLoS One*. 2016;11(3): e0151730. doi: 10.1371/journal.pone.0151730.
- Трифонова А.А., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М. Анализ вариабельности микросателлитных локусов у редкого эндемичного вида *Allium regelianum* A.K. Becker ex Iljin // Генетика. — 2017. — Т. 53. — № 2. — С.192–200. [Trifonova AA, Kochieva EZ, Kudryavtsev AM. Analysis of microsatellite loci variability in rare and endemic species *Allium regelianum* A.K. Becker ex Iljin. *Russian Journal of Genetics*. 2017;53(2):213-220. (In Russ.)] doi: 10.1134/S1022795417010124.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994;20(2):176-183.
- Liu J, Shi S, Chang E, et al. Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(7):14860-14871. doi: 10.3390/ijms140714860.
- Bentley L, Barker NP, Dold AP. Genetic diversity of the endangered *Faucaria tigrina* (Aizoaceae) through ISSR “fingerprinting” using automated fragment detection. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2015;(58):156-161. doi: 10.1016/j.bse.2014.11.012.
- Crema S, Cristofolini G, Rossi M, Conte L. High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae) using ISSR fingerprinting. *Plant Systematics and Evolution*. 2009;280(1):29-36. doi: 10.1007/s00606-009-0167-7.
- Doyle J. DNA Protocols for Plants. *Molecular Techniques in Taxonomy NATO ASI Series*. 1991;(57):283-93.
- Samiei L, Kiani M, Zarghami H, et al. Genetic diversity and interspecific relationships of some *Allium* species using inter simple sequence repeat markers. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*. 2015;22(2):67-75. doi: 10.3329/bjpt.v22i2.26029.
- Son JH, Park KC, Lee SI, et al. Species relationships among *Allium* species by ISSR analysis. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2012;53(3):256-62. doi: 10.1007/s13580-012-0130-3.
- Mukherjee A, Sikdar B, Ghosh B, et al. RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus *Allium* (Alliaceae). *Turkish Journal of Botany*. 2013;(37):605-618. doi: 10.3906/bot-1208-18.
- Peakall R, Smouse PE. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and

- research-an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-9. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
21. Yeh FC, Young RC, Mao J, et al. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Edmonton: Alta; 1999.
 22. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 2001;4(1):1-9.
 23. Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 1972;106(949):283-292.
 24. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
 25. Ebrahimi R, Zamani Z, Kashi A. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*. 2009;(119):345-351. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.032.
 26. Huang D, Li Q, Zhou C, et al. Intraspecific differentiation of *Allium wallichii* (Amaryllidaceae) inferred from chloroplast DNA and internal transcribed spacer fragments. *Journal of Systematics and Evolution*. 2014;52(3):341-354. doi: 10.1111/jse.12050.
 27. Mashayekhi S, Columbus TJ. Genetic diversity of *Allium munzii* (Amaryllidaceae), a rare southern California species and implication for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2015;(59):91-99. doi: 10.1016/j.bse.2014.12.025.
 28. Smith JF, Pham VT. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany*. 1996;83(6):717-726. doi: 10.2307/2445848.

LOW LEVEL OF GENETIC DIFFERENTIATION AMONG POPULATIONS OF THE RARE SPECIES *ALLIUM REGELIANUM* A.K. BECKER *EX ILJIN* FROM THE VOLGOGRAD REGION DETECTED BY ISSR-ANALYSIS

A.A. Trifonova, E.Z. Kochieva, A.M. Kudryavtsev

For citation: *Ecological genetics*. 2017;15(1):30-37

✿ **SUMMARY: Background.** Knowledge of genetic diversity within and among populations of rare and endangered plants species is practically important for conservation management. Molecular markers are useful tools for analysis of genetic diversity. In this study ISSR-analysis of rare endemic species *Allium regelianum* which grows in the Volgograd region was performed for the first time. **Materials and Methods.** A total of 93 samples from the 11 populations were collected and used in analysis. Six primers used in ISSR-analysis. Data analysis was performed using the GenAEx 6.41, POPGEN 1.32, PAST 3.11 and STRUCTURE 2.3.1 programs. **Results.** A total of 109 ISSR-fragments were scored of which 87 (79.8%) were polymorphic. Comparatively high level of intrapopulation diversity was estimated for the population of the area near Krasnoyarskii khutor, Serafimovichskii administrative region, and for the population of Khrenovatyi Liman, Nikolaevskii administrative region of Volgograd Oblast. Genetic similarity index among populations ranged from 0.88 to 0.96. Genetic differentiation among populations of *A. regelianum*, GST was 0.284, only. Analysis of molecular variance showed that genetic heterogeneity of *A. regelianum* 83% was attributed to differences within populations and 17% occurred among populations. Principal coordinate analysis and analysis of populations structure (with the used of STRUCTURE program) found no clear differentiation among populations. **Conclusion.** The estimation of intra- and interpopulation diversity of *A. regelianum* was performed. ISSRs detected high levels of genetic similarity within the populations of *A. regelianum* and low level of genetic differentiation among populations.

✿ **KEYWORDS:** *Allium regelianum*; rare and endangered species; genetic diversity; ISSR-analysis.

✿ Информация об авторах

Ая Арслановна Трифонова — аспирант, лаб. генетики растений. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва. E-mail: aichka89@mail.ru.

Елена Зауровна Кочиева — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаб. системной биологии растений. ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва. E-mail: ekochieva@yandex.ru.

Александр Михайлович Кудрявцев — д-р биол. наук, ВРИО директора, лаб. генетики растений. ФГБНУ «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва. E-mail: kudryav@vigg.ru.

✿ Information about the authors

Aya A. Trifonova — Postgraduate student, Laboratory of Plant Genetics. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: aichka89@mail.ru.

Elena Z. Kochieva — Dr. Biol. Sci., Researcher, Laboratory of Plant System Biology. Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: ekochieva@yandex.ru.

Alexander M. Kudryavtsev — Dr. Biol. Sci, Acting Director, Laboratory of Plant Genetics. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: kudryav@vigg.ru.