

new domestic cultivars with high levels of decorative and economically valuable traits and including them into the State Register of Breeding Achievements of the Russian Federation. The results of breeding of Asiatic lily hybrids in the Federal State Budgetary Scientific Institution I.V. Michurin Federal Research Centre (Russia, Tambov region, Michurinsk) are presented. A new, medium–early cultivar of Asiatic lily hybrids – ‘Lebedinoye Ozero’ has been obtained. In 2016, the new cultivar ‘Lebedinoye Ozero’ was transferred to the State Cultivar Testing of the Russian Federation. The zoned cultivar ‘Accent’ was selected as control. The research was carried out at the breeding site of the Experimental Production Department (Federal State Budgetary Scientific Institution I.V. Michurin Federal Research Centre), based on the Floriculture Laboratory. The soil is a powerful deep-leached chernozem formed on loess-like sandy soil, loamy in mechanical composition; it has a salt extract pH of 5.4 and good physical properties. Landing scheme is 70 × 12 cm, to a depth of 15 cm. The repetition is threefold. ‘Lebedinoye Ozero’ cultivar is characterized by high levels of decorative and economically valuable traits. The plants are 100–110 cm (up to 120 cm) in height. The flowering shoot is green with anthocyanin interspersing; the leaves are green, glossy. The inflorescence is racemose, the number of flowers in the inflorescence is from 5 to 15 pcs. with a flower diameter of 15–16 cm. The flowers are directed upwards, star-shaped, two-tone coloured – pale yellow with red-purple smears and spots on an orange background. It blooms from the beginning of late June. It has an average resistance to botrytiosis and fusarium. The main direction of use is cutting and landscaping. It is recommended for its high decorative effect, medium-early flowering period, winter hardiness and drought resistance. The State Register of Breeding Achievements of the Russian Federation includes a new cultivar of Asian lily hybrids – ‘Lebedinoye Ozero’.

Key words: Asiatic hybrid lilies, cultivar, breeding, cultivar studies.

УДК 57.08:582.681.

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ВИДОВ *HELLEBORUS L.* С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ (ЛИТОБЗОР)

Цатурян Г.А., Маляровская В.И.

Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр РАН»,
г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskay@yandex.ru

Цатурян Г.А. orcid.org/0000-0002-6277-1105
Маляровская В.И. orcid.org/0000-0003-4213-8705

В статье представлен обзор по применению молекулярно-генетических методов, которые используются для изучения генетического разнообразия видов относящихся к роду *Helleborus L.* Кратко обоснована актуальность и необходимость сохранения редкого, эндемичного вида *Helleborus caucasicus* А. Вр. природной флоры Северо-Западного Кавказа. Вид занесён в Красную

книгу Краснодарского края, имеет категорию и статус 3 «Редкие» – 3, РД. Редкие виды растений имеют фрагментарный характер, встречаются на ограниченном числе местообитаний. Сохранение множества генетически отличных локальных популяций, это основная задача, позволяющая предотвратить вымирание вида и сохранить его эволюционный потенциал. В данной статье приведено описание успешного применения молекулярно-генетических маркеров, монолокусных и мультилокусных, AFLP, RAPD, ISSR, SSR и др. в изучении генетического разнообразия видов рода *Helleborus* L.: *H. odoratus* subsp. *cyclophyllus*, *H. bocconeii*, *H. viridis*, *H. lividus*, *H. argutifolius*, *H. vesicarius*, *H. niger*, *H. foetidus*, *H. thibetanus*, *H. dumetorum*, *H. abruzzicus* и *H. liguricus*. Метод маркирования оказался достаточно информативным и даёт достоверную оценку внутри- и межпопуляционному разнообразию редких видов этого рода. Обзор также рассматривает успешность использования метода проточной цитометрии в изучении кариотипов видов морозника. В связи с этим кариотипические и цитогенетические признаки растений, включая полиплоидию и размер хромосом, могут быть полезны для изучения филогенетического родства и таксономической классификации видов. В статье также представлен современный метод статистического анализа, который представляет собой важный исследовательский инструмент при изучении характеристик распределений растительности в сообществах и анализе их динамики. В настоящее время генетическое разнообразие *Helleborus caucasicus* не изучено, поэтому методы, описанные в научной литературе, позволят нам разработать оптимальные условия для его изучения, и наметить стратегию сохранения редкого вида природной флоры Западного Кавказа.

Ключевые слова: *Helleborus* L., *Helleborus caucasicus*, редкий вид, молекулярные-маркеры, ДНК, проточная цитометрия, статистический анализ, сохранение биоразнообразия.

Северо-Западный Кавказ – один из центров флористического биоразнообразия, который занимает одно из первых мест в ряду региональных флор Кавказа. Здесь насчитывается свыше 2 000 видов растений, значительное количество которых (272) вида являются эндемичными, а 145 – относятся к редким видам. Редкие виды растений, имеют весьма ограниченный ареал обитания, а их популяции нередко бывают небольшими по площади. Это происходит из-за деятельности человека, вырубки лесов, разрушения мест их обитания, фрагментации и деградации, изменения климата. Глобальный рост спроса на лекарственные растения также привёл к чрезмерной эксплуатации природных популяций. К этому необходимо добавить и распространение инвазивных видов, которые являются серьёзными угрозами и приводят к сокращению численности многих редких видов растений [45]. Все эти причины ведут к снижению уровня генетического разнообразия во фрагментированных популяциях. Если генетическое разнообразие станет слишком низким, некоторые виды могут исчезнуть и быть потеряны навсегда [9].

Сохранение генетического разнообразия имеет большое значение для поддержания диверсификации биологических видов и экосистем, что обеспечивает основу для выживания и развития видов и способствует их долгосрочной адаптивной эволюции к изменениям окружающей среды, снижая риск исчезновения [12, 14, 41]. Оценка уровней генетического разнообразия на основе интегрированных популяционных структур является важнейшей предпосылкой для защиты видов [35]. Для популяций наземных растений «источник-приёмник» генетические структуры и дивергенции определяются не только их собственными видами и популяционными характеристиками, такими как скорость роста, эффективный размер популяции и способность к расселению, но также тесно связаны с их демографической реакцией на внешние пространственные факторы и временную изменчивость окружающей среды [17, 32, 43]. Факторы изоляции расстоянием, викариантность и неоднородность ландшафта влияют на эволюционные процессы видов (эффекты дрейфа генов, обмен генами, естественный отбор и локальная адаптация), тем самым определяют модели генетического разнообразия популяций [17, 32, 43].

Анализ генетического разнообразия природных популяций, находящихся под угрозой исчезновения, является основным аспектом стратегии сохранения биоразнообразия. Редкие реликтовые и исчезающие виды растений с меньшим генетическим разнообразием более подвержены угрозе исчезновения из-за изменений условий окружающей среды и воздействия антропогенных факторов [1, 16].

Понимание моделей и распределения генетической изменчивости внутри и между популяциями имеет важное значение для обеспечения эффективного управления сохранением и устойчивого использования генетических ресурсов растений. Более того, Reed D.H. и Frankham R. считают, что поддержание достаточного генетического разнообразия является важным фактором сохранения видов, поскольку генетическое разнообразие необходимо для эволюции популяций в ответ на изменения окружающей среды [34]. Szczecińska M. с соавторами показали, что при уменьшении количества разнообразия появляется инбредная депрессия и более высокая гомозиготность, что подрывает адаптивный потенциал популяций [40].

Frankham R. с соавторами (2002) считают, что внутривидовая генетическая изменчивость является наиболее фундаментальным уровнем биоразнообразия и обеспечивает основу для любых эволюционных изменений, имеющих решающее значение для поддержания способности видов адаптироваться к новым условиям окружающей среды. Также есть мнение, что климатические изменения воздействуют на внутривидовое генетическое разнообразие посредством двух основных процессов: либо заставляя растения сокращать или расширять свой ареал, либо стимулируя изменения посредством адаптации к локальному режиму отбора [20].

Поэтому изучение генетической характеристики необходимо для понимания взаимосвязей и оценки разнообразия внутри и между видами. В настоящее время на помощь пришли технологии молекулярных маркеров, основанные на анализе ДНК, которые предоставляют мощные инструменты для изучения биоразнообразия на разных уровнях. Одним из самых больших преимуществ молекулярных маркеров является то, что на них не влияют окружающая среда и стадии развития растений, а также отсутствие плейотропных или эпистатических эффектов. Среди ДНК-маркеров повторы Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) являются доминирующей системой маркеров, на которую не влияет присутствие оргanelлярной ДНК, часто используемой в генетике сохранения растений и исследованиях разнообразия, благодаря их высокой воспроизводимости, низкой стоимости и универсальности, которые они демонстрируют [28, 33].

Другой метод AFLP также позволяет обнаруживать одновременно различные полиморфизмы в разных областях генома растений. Данная технология обладает надёжностью, высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и не требует знания первичной последовательности ДНК. Она широко используется в филогении, систематике растений, в селекционных процессах для выявления хозяйственно-ценных признаков [21, 42].

Следующий метод, который используется с 1990 гг. это RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). По данным Гостимского С.А. и соавторов (2005) он представляет собой амплификацию фрагментов ДНК с применением случайных коротких праймеров, длиной около 10-11 п.н. [3]. Метод RAPD успешно используется для анализа полиморфизма редких видов растений [4], а также в генетике растений для построения генетических карт. Необходимо отметить, что данные маркеры наследуются по доминантному пути.

В настоящее время применение существующих методов молекулярно-генетических исследований очень важно при выборе стратегии сохранения редких, реликтовых и исчезающих видов растений, поскольку эти методы позволяют выявить генетическую структуру вида и генетическое разнообразие в популяциях и между ними. Они также позволяют разрабатывать меры по сокращению генетического дрейфа для охраняемых видов растений [2]. В связи с этим, необходим постоянный мониторинг генетического потенциала редких и исчезающих видов растений. Среди мер, которые в первую очередь должны быть включены, это мониторинг анализа внутривидового полиморфизма, генетическая дифференциация популяций, а также изучение морфологии видов и биологическая характеристика популяций [19, 24].

В настоящее время для многих учёных как в России, так и за рубежом представляет научный интерес изучение генетического разнообразия молекулярно-генетическими методами различных видов морозника.

Виды морозника относятся к роду *Helleborus* L. и принадлежат семейству лютиковые Ranunculaceae Juss. На Западном Кавказе произрастает *Helleborus caucasicus* A. Br. – многолетнее травянистое декоративное растение, которое распространено в разных частях Европы, Предкавказья, Кавказа, Северного Ирана и Малой Азии. Растёт в тенистых лесах нижнего и среднего горных поясов, на богатых почвах речных долин. Раннецветущее, цветёт зимой и ранней весной. Занесён в Красную книгу Краснодарского края. Имеет категорию и статус 3 «Редкие» – 3, РД. Кавказско-малоазиатский третично-реликтовый вид, находящийся в крае на границе ареала. Региональные популяции относятся к категории редкости «Находящиеся в состоянии, близком к угрожаемому» [6]. Эколого-биологические особенности *H. caucasicus* в сочинском Причерноморье изучены достаточно полно [5]. В настоящее время генетическая характеристика этого вида не изучена, однако за рубежом по другим видам рода *Helleborus* L. имеется много научной информации.

Так, Fassou G. в соавторстве (2020) с помощью ISSR-маркеров проведено изучение *Helleborus odorus* subsp. *cyclophyllus* – лекарственного, эндемичного растения южной части Балканского полуострова и различных горных районов Греции [10]. Ими исследованы факторы, формирующие его генетический состав и определяющие настоящее и будущее распространение. Они обнаружили в популяциях этого вида высокое разнообразие геномов (0,2239–0,3319), умеренную популяционную дифференциацию (0,0317–0,3316) и повышенную миграцию генов ($Nm = 1,3098$). По их прогнозам, согласно комбинации базы данных GCM/RCP/климата, к 2070 г. *Helleborus odorus* subsp. *cyclophyllus* может потерять значительную часть своего нынешнего распространения и будет наблюдаться тенденция генетической гомогенизации. Предположительно, это в основном связано с географическими/топографическими факторами и их взаимодействием, четвертичными климатическими колебаниями, а также экологическими ограничениями, которые могут оказать негативное влияние на будущее распространение вида и его генетический состав [10].

Известно, что таксономия рода *Helleborus* довольно сложна из-за изменчивости диакритических признаков и наличия переходных форм. В настоящее время среди авторов существуют некоторые разногласия относительно систематического положения видов *Helleborus*, характеризующихся зелёными цветками. Поэтому для исследователей представляет научный интерес изучение потенциала некоторых молекулярных маркеров в качестве диагностических признаков этих объектов. Так Fico и другие (2005) в исследовании различных видов *Helleborus* итальянской флоры использовали RAPD-маркеры. Они их применяли для характеристики восьми популяций морозника, произрастающих

в центральной и северной Италии, которые относятся к следующим видам: *H. bocconeii*, *H. viridis* и *H. odoratus* (зелёные цветки) и *H. niger* (белые цветки). Авторами установлено, что RAPD и кластерный анализ позволили уточнить таксономическое положение критических объектов. Например, популяции из северо-восточной Италии (отнесенные к *H. odoratus*) на самом деле чётко отличаются от популяций, собранных в Пьемонте и Ломбардии и приписываются к виду *H. viridis*. [11].

Для *H. multifidus* Vis., который является эндемичным иллирийско-адриатическим видом с ареалом распространения в Италии, Словении, Хорватии, Боснии, Герцеговине, Черногории и Албании впервые проведено исследование, в котором используются молекулярно-генетические маркеры (область trnL и matK хлоропластной ДНК и ядерные области ITS1 и ITS2). Генетические особенности *H. multifidus* авторы изучали на растениях, произрастающих на территории Боснии и Герцеговины [23]. Исследователи показали, что ПЦР- PDRF на интроне trnL не информативна для тестирования меж- или внутривидового разнообразия. В то же время, анализ последовательностей matK, ITS1 и ITS2 выявил различия между популяциями из региона Требинье и Купрешко Поле, что указывает, по их мнению, на необходимость включения дополнительных анализов для подтверждения этих результатов [23].

В рамках рода *Helleborus* филогенетический анализ на основе хлоропластных маркеров trnL-F и matK и рибосомной последовательности ITS ДНК также был проведен Sun с соавторами (2001) [38]. Исследователи использовали алгоритм парсимонии, который не включает оценку расстояния между таксонами и рассчитали консенсусное дерево, которое объединило всю информацию о последовательностях по критерию Фитча. Ими показано, что род *Helleborus* получил сильную поддержку (100 %), как монофилетический род. Так, они установили, что вид *Helleborus vesicarius* проявляет родство с остальными видами только на 55 %. *Helleborus foetidus*, *H. niger* и *H. lividus* образовали кладу, но только с 52 % поддержкой, при этом *H. niger* и *H. lividus* как родственные таксоны были слабо поддержаны между собой. Авторами на основе морфологии чётко идентифицирован род *Helleborus* как естественная группа, а относительно длинная ветвь, ведущая к роду, указывает на долгую его историю. Однако низкий уровень дивергенции по молекулам внутри рода указывает на недавнюю мутацию, что затрудняет построение надёжных филогенетических гипотез, показывающих взаимоотношения внутри рода. Все таксоны, которые считались различными до этого исследования, *H. lividus*, *H. argutifolius*, *H. vesicarius*, *H. niger*, *H. foetidus* и *H. thibetanus*, являются таковыми в данном анализе, за исключением *H. thibetanus*, их взаимоотношения с другими таксонами рода здесь чётко не определены [38].

Вместе с тем существует два основных недостатка использования хлоропластных маркеров и ITS-последовательностей: первый заключается в том, что у большинства видов хлоропластные гены наследуются по материнской линии и ITS-последовательности представляют только один или два локуса в геноме. Второй недостаток, когда оба типа последовательностей дают ограниченную информацию с точки зрения длины последовательности [26].

AFLP-маркеры, также как и RAPD-маркеры, распределены по всему геному, но имеют гораздо более высокую воспроизводимость. Есть данные, что в отличие от AFLP, маркеры, основанные на пластидной ДНК или рибосомных последовательностях, иногда не дают филогенетической информации [8]. Després L. и другие (2003) исследовали филогенетические взаимоотношения между интерфертильными видами принадлежащими сем. Ranunculaceae с использованием последовательностей ядерной ДНК (ITS1 + 5.8S рРНК + ITS2), хлоропластной ДНК (интрон trnL и межгенный спейсер trnL–trnF) и маркеров AFLP [8]. Они выяснили, что последовательности ITS не были информативны на внутривидовом уровне, но подтвердили родственные отношения между родами *Trollius* и *Adonis*, и предоставили новую информацию о филогенетических отношениях между пятью родами *Ranunculaceae*. В тоже время они показали, что ДНК хлоропластов была более информативной среди видов *Trollius*, но при этом не соответствовала ранее описанным участкам. По их мнению, AFLP анализ оказался более мощным инструментом для разрешения сложных генетических отношений между целевыми растительными объектами [8].

Поэтому другими исследователями, Meiners с соавторами (2010, 2011), был выбран анализ AFLP для видовой дискриминации и оценки генетических отношений внутри рода *Helleborus* [26, 27]. Ими для оценки генетических связей в пределах изучаемого рода, были проанализированы 19 видов, с использованием 10 комбинаций праймеров AFLP. При этом всего было получено 1 109 маркерных фрагментов по всем генотипам *Helleborus*. Для этого рода были мономорфны только 0,3 %. По их данным, максимальное генетическое расстояние между двумя видами составило 0,330, наблюдаемое между *H. lividus* и *H. liguricus*, а минимальное значение – 0,034, наблюдалось между *H. cyclophyllus* и *H. torquatus*. Как считают авторы, для анализа, проведённого в данном исследовании, AFLP-метод оказался достаточно информативным. Впервые в данном исследовании по содержанию ядерной ДНК и филогенетическому положению были охарактеризованы два недавно описанных вида, *H. abruzzicus* и *H. liguricus*. С учётом полученных результатов это важно для будущих целей селекции, поскольку морфологические характеристики этих видов, включая многократно рассечённые листья (до 200 раз)

и большие желтоватые лепестки, наблюдаемые у *H. abruzzicus*, и крупные бледно-беловатые цветы с сильным приятным ароматом *H. liguricus*, делают их ценными кандидатами для программ гибридизации [26, 27].

Другие учёные из Китая для филогенетического анализа семейства *Ranunculaceae*, включая виды: *Anemone reflexa*, *Anemoclema glaucifolium*, *Clematis terniflora*, *Oxygraphis glacialis*, *Ranunculus macranthus*, применяли метод SSR [37]. Они выяснили, что *H. atrorubens* имеет самое близкое родство с *H. thibetanus*. *H. atrorubens* является экономически важным многолетним садовым растением и представляет лекарственную ценность. Для генотипирования *H. atrorubens* ими идентифицировано 106 хлоропластных SSR-маркеров, длиной от 10 до 18 п.н. Также ими секвенирован полный хлоропластный геном *H. atrorubens*. Их результаты показали, что длина генома хлоропластов составляет 166 695 п.н. Он имеет типичную четырёхчастную структуру, содержащую одну большую однокопийную (LSC) область (84994 п.н.), одну маленькую однокопийную (SSC) область (17825 п.н.) и пару областей инвертированных повторов (IR) (31938 п.н.). Исследователи отмечают, что хлоропластный геном кодирует 130 генов, из которых 85 кодируют белки, 37 – транспортные РНК и 8 – рибосомные РНК. Ими были идентифицированы маркеры простых повторов последовательностей (SSR) и верхние вариабельные кодирующие области. Эти SSR-локусы могут быть использованы для изучения генетического разнообразия и структуры природных популяций и сортов этого вида. Данная работа авторов закладывает основу для дальнейших исследований, таких как видовая дифференциация и филогенетическая реконструкция рода *Helleborus* [37].

Также чрезвычайно важна оценка стабильности эпигенетической изменчивости и трансгенерационной устойчивости эпигенетической структуры в популяциях диких растений. Herrera С.М. и другие (2013) считают, что этот пробел в знаниях препятствует прогрессу в интерпретации естественной эпигенетической изменчивости [18]. Ими изучена эпигенетическая структура, т. е. парные образцы ДНК «растение-пыльца», трёх популяций многолетнего травянистого растения *Helleborus foetidus* с использованием метода полиморфизма длины амплифицированного фрагмента, чувствительного к метилированию (MSAP). Они установили, что однолокусный и мультилокусный анализ выявил обширную эпигенетическую дифференциацию между популяциями спорофитов. При этом по их данным, сравнение статуса метилирования в отдельных спорофитах и потомках гаметофитов по локусам показало, что около 75 % эпигенетических маркеров сохраняются неизменными в течение гаметогенеза. Несмотря на некоторую эпигенетическую реорганизацию, происходившую в ходе гаметогенеза, многолокусная эпигенетическая дифференциация между популяциями

спорофита сохранялась на последующей стадии гаметофита. Авторы также отмечают эффективность применения метода MSAP к парным образцам ДНК растений и пыльцы для исследования эпигенетического гаметического наследования у диких растений, и делают вывод, что эпигенетическая дифференциация между популяциями взрослых растений *H. foetidus*, сохраняется из поколения в поколение [18].

Интересные исследования провела группа авторов, Záveská E. и другие (2021), направленные на то, чтобы пролить свет на малоизученную биогеографическую историю лесной растительности европейских Альп, распутывая пространственно-временную диверсификацию дизъюнктивно распределённого, часто встречающегося и многочисленного растения подлеска *Helleborus niger* (морозник чёрный) [44]. Их интересовал вопрос, ограничено ли распространение этого, предположительно медленно расселяющегося вида, его климатической нишей или потенциальное распространение заметно превышает фактическое, что указывает на неполное заполнение ареала. Для выяснения этого они применили ряд филогеографических анализов, основанных на данных секвенирования ДНК, связанной с сайтом рестрикции (RADseq), и последовательностях пластидной ДНК для выборки популяций по всему диапазону. Ими использован этот исследовательский анализ, чтобы разграничить геномно связанные группы, а затем применили демографическое моделирование, чтобы реконструировать историю этих групп [44]. В результате они выявили, что филогеографическая структура, полученная на основе анализа геномных (RADseq) и генетических (последовательности пластидной ДНК) данных, а также из тестирования явных демографических моделей, предполагает, что *H. niger* пережил ледниковый период не только в крупном рефугиуме буковых лесов на северо-западе Балканского полуострова, что подтверждают и другие авторы [25]. Но исследователями также подтверждено как генетическими/геномными данными, так и смоделированным распространением вида, его выживание в трёх непересекающихся районах Альп [25].

Современные статистические подходы представляют собой важный исследовательский инструмент при изучении характеристик распределений растительности в сообществах и анализе их динамики [21].

Так, A. Susek с соавторами (2005) проведён статистический анализ для вида *Helleborus niger* L. (морозник чёрный или рождественская роза), который был направлен на оценку фенотипического разнообразия среди отдельных диких популяций, произрастающих в Словении и Хорватии [39]. Оценка изменчивости включала десять морфологических признаков (шесть количественных и четыре качественных): пигментацию черешка листа, окраску чашелистиков (адаксиальная и абаксиальная сторона), форму цветка, длину черешка, число листьев, длину цветоноса, количество

плодолистика, средний диаметр прижатого/сплющенного цветка и количество соцветий на растении. Авторами показано, что изменчивость была более выражена внутри популяций, чем между популяциями. При этом сравнительно высокая изменчивость выражена среди таких признаков, как например, количество листьев и соцветий на растении. Ими выявлено, что наиболее ценными популяциями по морфологическим признакам, а именно по длине цветоноса, диаметру цветка и наибольшему количеству соцветий на одно растение, являются популяции происхождения из Хорватии.

В изучении кариотипа видов *Helleborus* имеются данные успешного использования цитологического метода (проточной цитометрии). Методом проточной цитометрии можно измерить содержание клеточной ДНК с целью выявления распределения клеток в пределах основных фаз клеточного цикла, оценки частоты апоптотических клеток с частичным содержанием ДНК и/или выявления ДНК пloidности измеряемой клеточной популяции [7].

По данным Meiners Ju. и соавторов (2011), в роде *Helleborus* содержание ядерной ДНК варьировало от 18,3 пг/2С – у *H. argutifolius* до 33,2 пг/2С – у *H. thibetanus* [27], что сходно с данными, полученными Zonneveld (2001) [46], который сообщил о размерах генома этих видов в 19 пг/2С и 35,7 пг/2С, соответственно. В целом, по сравнению с данными Meiners Ju. в работе Zonneveld (2001) показано более высокое содержание ядерной ДНК [27, 46]. По мнению Greilhuber (2005) различия в измерениях могут быть результатом инструментально-технической и внутривидовой вариации [15]. Ещё причиной вариаций могут быть различия в возрасте листового материала и используемых генотипов. Кроме того, на определение содержания ядерной ДНК может влиять внутренний эталон. Так, Meiners Ju. и др. (2011), в своих исследованиях в качестве внутренних референтных стандартов использовали *S. cereale* и *V. faba* для сравнения измерений содержания ядерной ДНК видов *H. argutifolius*, *H. lividus*, *H. dumetorum* и *H. thibetanus*, при этом показатели у трёх видов были ниже 0,2 пг. В то же время Zonneveld (2001) в качестве внутреннего стандарта использовал *Agave americana* (15,9 пг) и получил для *H. thibetanus* выше показатель – 1 пг [27]. Meiners Ju. с соавторами (2011) также как Greilhuber (2005) считают, что различия в содержании ядерной ДНК между этими исследованиями могут быть результатом инструментально-технической и межлабораторной вариации в сочетании с внутривидовыми различиями [27]. Есть также мнение, что различия в размере генома между генотипами одного вида могут быть результатом повторяющихся элементов ДНК [22] или ретротранспозонов [36], однако для видов рода *Helleborus* пока это не подтверждено. Кроме того, из литературных источников известно, что

вариации могут коррелировать с факторами окружающей среды, как показано на примере других видов растений, таких как *Helianthus* [31] и *Zea* [30]. По мнению Meiners Ju. и др. (2011) проточная цитометрия также является хорошим методом для выявления межвидовых гибридов *Helleborus*, таких как *H. × ericsmithii* или *H. × nigercors* [27].

Выводы. Таким образом, на основе проведенного нами обзора научной литературы приведена информация по применению широкого спектра методов исследований для изучения генетического разнообразия видов, относящихся к роду *Helleborus* L., среди которых молекулярно-генетические, проточной цитометрии и статистического анализа. Оценивая результаты, полученные с помощью мультилокусных молекулярно-генетических маркеров: AFLP, RAPD, ISSR и SSR, можно сказать, что они были достаточно информативны для видов морозника. Поэтому применение любого из использованных методов даст вполне достоверную оценку внутри- и межпопуляционному разнообразию редких видов рода *Helleborus*. Кариотипические и цитогенетические признаки растений, включая полиплоидию и размер хромосом могут быть полезны для изучения филогенетического родства и таксономической классификации видов. Генетическое разнообразие *Helleborus caucasicus* в настоящее время не изучено, поэтому методы, описанные в научной литературе, позволят нам разработать оптимальные условия для изучения редкого вида природной флоры Западного Кавказа, а также наметить стратегию его сохранения в естественных местах произрастания.

Публикация подготовлена в рамках реализации
ГЗ ФИЦ СЦ РАН № FGWR-2021-0008

Список литературы/References

1. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука, 2004, 619 [Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A., Kurbatova O.L. Dynamics of population gene pools under anthropogenic influences. Moscow: Nauka, 2004, 619. (In Rus.)].
2. Гончаров Н.П., Шумный В.К. От сохранения генетических коллекций к созданию национальной системы хранения генофондов растений в вечной мерзлоте, Вестник ВОГиС, 2008; 12(4) : 509-523. [Goncharov N.P., Shumnyi V.K. From preservation of genetic collections to creation of national system of plant gene pool storage in permafrost, Vestnik VOGiS. 2008; 12(4) : 509-523. (In Rus.)].
3. Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров, Генетика. 2005; 41(4) : 480-492. [Gostimsky S.A, Kokaeva Z.G, Kononov F.A Studying plant genome variation using molecular markers, Russian Journal of Genetics, 2005; 41(4) : 378-388. (In Rus.)].
4. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализ растительных геномов, Молекулярная генетика, 1997; 33(4) : 443-450. [Dorokhov D.B, Klocke E. Rapid and cost-effective RAPD technology analysis of plant genomes, Russian

- Journal of Genetics. 1997; 33 (4) : 358-365. (In Rus.)].
5. Кирий П.В. Эколого-биологические особенности *Helleborus caucasicus* A. Вр. флоры Сочинского Причерноморья, Автореф. канд. дисс. Краснодар: КГУ, 2006. [Kyrii P.V. Ecological and biological features of *Helleborus caucasicus* A. Br. flora of the Sochi Black Sea coast., Ph. Krasnodar: KSU. 2006. (In Rus.)].
 6. Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. III издание / отв. ред. С.А. Литвинская, Краснодар: Адм. Краснодар. края, 2017, 850. [Red Data Book of Krasnodar Region. Plants and Fungi. III ed. / Ed. by S.A. Litvinskaya, Krasnodar: Krasnodar. krai Administration. 2017, 850. (In Rus.)]. ISBN: 978-5-6040022-6-1.
 7. Darzynkiewicz Z., Huang X., Zhao H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry, Curr Protoc Cytom, 2017; 2(82) : 7.5.1-7.5.20. DOI: 10.1002/cpsy.36.
 8. Després L., Gielly L., Redoutet B., Taberlet P. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability, Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003; 27 : 185-196. DOI: 10.1016/S1055-7903(02)00445-1.
 9. Ellstrand N.C., Elam D.R. Population genetic consequences of small population size implications for plant conservation, Annual Review of Ecology and Systematics. 1993; 24 : 217-242. DOI: 10.1146/annurev.es.24.110193.00124521.
 10. Fassou G., Kougioumoutzis K., Iatrou G., Trigas P., Papanotiropoulos V. Genetic diversity and range dynamics of *Helleborus odorus* subsp. *Cyclophyllus* under different climate change scenarios, Forests. 2020; 11(6) : 620. DOI: 10.3390/f1106062022.
 11. Fico G., Servettaz O., Caporali E., Tomè F., Agradi E. Investigation of *Helleborus* genus (Ranunculaceae) using RAPD-markers as an aid to taxonomic discrimination, Acta Hort. 2005; 675 : 205-209. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.675.30
 12. Frankham R. Genetics and extinction, Biol. Conserv. 2005; 126 : 131-140. DOI: 10.1016/j.biocon.2005.05.002.
 13. Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., McInnes K.H. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press: Cambridge, UK; New York, NY, USA. 2002, 607 p. DOI: 10.1017/CBO9780511808999.
 14. Futuyma D.J. Evolutionary Biology, 2nd ed.; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA. 1986, 589.
 15. Vellend M., Geber M.A. Connections between species diversity and genetic diversity, Ecol. Lett. 2005, 8 : 767-781. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00775.x
 16. Greilhuber J. Intraspecific variation in genome size in Angiosperms: Identifying its existence, Annals of Botany. 2005; 95 : 91-98. DOI: 10.1093 / aob / mci004.
 17. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species, Philosophical Transactions of the Royal Society B. 1996; 351 : 1291-1298. DOI: 10.1098/RSTB.1996.011227.
 18. Heinrichs J.A., Lawler J.J., Schumaker N.H. Intrinsic and extrinsic drivers of source-sink dynamics, Ecol. Evol., 2016; 6 : 892-904. DOI: 10.1002/ece3.2029.
 19. Herrera C.M., Medrano M., Bazaga P. Epigenetic Differentiation Persists after Male Gametogenesis in Natural Populations of the Perennial Herb *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae) Plos one. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0070730.
 20. Hilborn R., Quinn I.P., Schindler D.E., Rogers D.E. Biocomplexity and fisheries Sustainability, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003; 100; 11 : 6564-6568. DOI: 10.1073/pnas.1037274100.
 21. Hoffmann A.A., Sgrò C.M. Climate change and evolutionary adaptation. Nature 2011; 470 : 479-485. DOI: 10.1038 /nature09670.
 22. Jacobsen E. Ploidy levels in leaf callus and regenerated plants of *Solanum tuberosum* determined by cytophotometric measurements of protoplasts, Theor. Appl. Genet., 1983; 65 : 113-118. DOI: 10.1007/BF0026487730.
 23. Kubis S., Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes, Annals of Botany, 1998; 82 : 45-55.

24. Lasić L., Dorić S., Hanjalić Ja., Čakar Ja., Kalamujić Stroil B., Radosavljević G., Pojskić N. Contribution to molecular genetic characterization of *Helleborus multifidus* Vis. in Bosnia and Herzegovina. Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo, 2016; 2 : 26-36. DOI: 10.54652/rsf.2016.v46.i2.71.
25. Luck G.W., Daily G.C., Ehrlich P.R. Population diversity and ecosystem services, Trends in Ecology & Evolution, 2003; 18(7) : 331-336. DOI: 10.1016/S0169-5347(0300100-935.
26. Magri D., Vendramin G.G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Gömöry D.S., et al. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences, New Phytol. 2006; 171 : 199-221. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01740.x.
27. Meiners J., Winkelmann T. Ovule culture of *Helleborus* species, Acta Horticulture. 2010; 855 : 195-200. DOI: 10.17660/ActaHortic. 2010.855.2836.
28. Meiners Ju., Debener T., Schweizer G., Winkelmann T. Analysis of the taxonomic subdivision within the genus *Helleborus* by nuclear DNA content and genome-wide DNA markers, Scientia Horticulturae. 2011; 128 : 38-47. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.12.011.
29. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools, Diversity. 2009; 1 : 19-35. DOI: 10.3390/d1010019.
30. Pauls S.U., Nowak C., Bálint M., Pfenninger M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species, Mol. Ecol. 2012; 22 : 925-946. DOI: 10.1111/mec.12152. 10.1111/mec.12152.
31. Poggio L., Rosato M., Ciavarino A.M., Naranjo C.A. Genome size and environmental correlations in Maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae), Annals of Botany. 1998; 82 : 107-115.
32. Price H.J., Morgan P.W., Johnstons J.S. Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA content measurements in *Helianthus annuus* L., Annals of Botany. 1998; 82 : 95-98.
33. Pulliam R.H. Sources, sinks, and population regulation. Am. Nat. 1988; 132 : 652-661.
34. Reddy M.P., Sarla N., Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, Euphytica. 2002; 128 : 9-17.
35. Reed D.H., Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity, Conservation biology. 2003; 17(1) : 230-237. DOI: 10.1046/j.1523-1739.2003.01236x44.
36. Sakai A.K., Allendorf F.W., Holt J.S., Lodge D.M., Molofsky J., With K.A., Baughman S., Cabin R.J., Cohen J.E., Ellstrand N.C., et al. The population biology of invasive species, Annu. Rev. Ecol. Syst. 2001; 32 : 305-332. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037.
37. Sanmiguel P., Bennetzen J.L. Evidence that a recent increase in Maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons, Annals of Botany. 1998; 82 : 37-44.
38. Shi X., Mao L., Jin L., Ma G. Characterization of the complete chloroplast genome of the *Helleborus atrorubens* Waldst. & Kit. (Ranunculaceae), Mitochondrial DNA B Resour. 2022; 7/7(9) : 1633-1635. DOI: 10.1080/23802359.2022.2119105.
39. Sun H., McLewin W., Fay F. Molecular phylogeny of *Helleborus* (Ranunculaceae), with an emphasis on the East Asian-Mediterranean disjunction, Taxon. 2001; 50 : 1001-1018. DOI: 10.2307/1224717.
40. Susek A., Ivancis A., Lemonie M. Variability of Christmas rose (*Helleborus niger* L.) populations and its potential use in genetic breeding, Acta biologica Cracoviensia. Series botanica. 2005; 472(2) : 129-135.
41. Szczecińska M., Sramkó G., Wołosz 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 : e0151730.
42. Vellend M., Geber M.A. Connections between species diversity and genetic diversity, Ecol. Lett. 2005; 8 : 767-781. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00775.x
43. Vos P., Hogers R., Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Research. 1995; 23(21) : 4407-4414. DOI: 10.1093/gar/23.21.4407.

44. Walters S. Landscape pattern and productivity effects on source-sink dynamics of deer populations, *Ecol. Model.* 2001; 143 : 17-32. DOI: 10.1016/S0304-3800(01)00352-0.
45. Závěská E., Kirschner P., Frajman B., Wessely J., Willner W., Gatringer A., Hülber K., Lazić D., Dobeš C., Schönswetter P. Evidence for Glacial Refugia of the Forest Understorey Species *Helleborus niger* (Ranunculaceae) in the Southern as Well as in the Northern Limestone Alps, *Front Plant Sci.* 2021; 10(12) : 683043. DOI: 10.3389/fpls.2021.683043.
46. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics.* 1994; 20(2) : 176-183.
47. Zonneveld B.J.M. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions, *Plant Systematics and Evolution.* 2001; 229 : 125-130. DOI: 10.1007/s006060170022.

**STUDYING THE DIVERSITY OF *HELLEBORUS* L. SPECIES.
USING MOLECULAR GENETIC METHODS
(LITERATURE REVIEW)**

Tsaturyan G.A., Malyarovskaya V.I.

*Federal Research Centre
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Sochi, Russia, e-mail: malyarovskay@yandex.ru*

The paper presents a review on molecular genetic methods used to study the genetic diversity of various species belonging to the genus *Helleborus* L. It also briefly explains the significance and necessity for preserving rare, endemic species of natural flora in North-West Caucasus called *Helleborus caucasicus* A. Br. This species is listed in the Red Book of Krasnodar Territory and has a category and status: 3 "Vulnerable". Rare plant species have a fragmentary character, occurring in a limited number of habitats. Preservation of multiple genetically distinct local populations is the main task to prevent extinction of the species and to preserve its evolutionary potential. This paper describes the successful use of molecular genetic markers, as well as monolocus and multilocus, AFLP, RAPD, ISSR, SSR, etc. in studying the genetic diversity of the following species from the genus *Helleborus* L: *H. odoratus* subsp. *cyclophyllus*, *H. bocconei*, *H. viridis*, *H. lividus*, *H. argutifolius*, *H. vesicarius*, *H. niger*, *H. foetidus*, *H. tibetanus*, *H. dumetorum*, *H. abruzzicus* and *H. liguricus*. The marking method proved to be quite informative and reliably assesses intra- and interpopulation diversity of rare species from this genus. The review also considers the success of the flow cytometry method in the study of karyotypes of hellebore species. Thus, karyotypic and cytogenetic traits of plants, including polyploidy and chromosome size, can be useful for the study of genetical affinity and taxonomic classification of species. The paper also provides a modern method of statistical analysis, which is an important research tool when studying the characteristics of vegetation distributions in communities and analyzing their dynamics. Currently, the genetic diversity of *Helleborus caucasicus* has not been studied, so the methods described in the scientific literature will allow us to develop optimal conditions for its study and outline a strategy for preserving rare species of the natural flora in Western Caucasus.

Key words: *Helleborus* L., *Helleborus caucasicus*, rare species, molecular markers, DNA, flow cytometry, statistical analysis, biodiversity preservation.