

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ *TULIPA GESNERIANA* L. НА
ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета

Панишевой Анастасии Борисовны

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук

03.06.19.  А.С. Кашин

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук

03.06.19.  О.И. Юдакова

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нет однозначного представления о таксономической структуре рода *Tulipa* L. В роде выделяют от 40 [Stork, 1984] до 100 и более [Hall, 1940] видов. В последних по времени таксономических обработках число признаваемых видов рода также сильно варьирует: от 78 до 87 [Zonneveld, 2009]. Центрами происхождения и наибольшего генетического разнообразия рода считают Южную Европу, Северную Африку, Ближний Восток и Среднюю Азию, включая Китай, Тянь-Шань и горные цепи Средней Азии. При этом Кавказ считается вторичным центром происхождения.

Сохраняется неоднозначность представлений и в отношении объема вида *T. gesneriana* L. Современный естественный его ареал охватывает юго-восток Украины, Крымский полуостров, юг и юго-восток России, северный Иран, юг Азербайджана, северо-западный Казахстан и провинцию Xinjiang (Синьцзян) в Западном Китае [Everett, 2013]. Вид занесен в Красные книги РФ, Украины, Казахстана (как *T. schrenkii* Regel) и Азербайджана (как *T. gesneriana* L.). В Российской ботанической литературе этот вид более известен под названием *T. schrenkii* [Литвинская, 2008]. Первоначально считалось, что лектотип вида представляет собой старый сорт культурного тюльпана, например, красно-желтая форма из группы сортов Duc van Tol, так как его описание было сделано не по образцам природного вида. Но по результатам исследования размера генома и ряда морфологических признаков *T. schrenkii* и *T. suaveolens* оказались идентичны, поэтому во всемирной литературе в настоящее время считается приоритетным название *T. suaveolens* с признанием в качестве синонимичного названия *T. schrenkii*. Однако при обработке рода *Tulipa* для «Flora Partis Europaeae URSS» сравнение типового материала видов *T. schrenkii* и *T. gesneriana* вызвало у Мордак (1979) сомнения в самостоятельности первого из них. На этом основании автор посчитала, что описанный Линнеем (1753) *T. gesneriana* и есть исходный природный вид, которому впоследствии Regel (1873) присвоил название *T. schrenkii*.

Считается, что многие из описаний предков нельзя увязать ни с одной из реально существующих популяций, поэтому неизвестно, к какому из трёх перевезенных в Средиземноморье видов подрода *Tulipa* (*T. agenensis* DC, *T. gesneriana*, *T. suaveolens*) относились их прототипы. Положение ещё более усложняется тем, что в более позднее время в селекцию садовых тюльпанов были вовлечены *T. armena* Boiss., *T. lanata* Regel, и другие виды рода из Центральной Азии. Ещё Холл (1940) предполагал, что турецкие игловидные тюльпаны возникли из гибридизации между *T. gesneriana* и *T. suaveolens*. Однако высказывается и предположение о том, что сам *T. gesneriana*, скорее всего, представляющий собой сложный садовый гибрид, возможно, происходит от последнего.

В качестве рабочей гипотезы о степени родства *T. suaveolens* (= *T. shrenkii*) и культурного *T. gesneriana* мы принимаем представление Мордак (1990) о том, что это – синонимичные виды с приоритетным названием *T. gesneriana*.

Цель работы: провести анализ популяционного разнообразия сокращающегося в численности вида *Tulipa gesneriana* L.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить внутривидовой генетический полиморфизм *T. gesneriana* в пределах европейской части ареала с использованием пластидных (cpDNA) последовательностей
2. Выявить внутривидовой генетический полиморфизм *T. gesneriana* в пределах европейской части ареала с использованием ядерных (ITS) последовательностей;

Материалы исследований. Объектом исследования являются популяции *Tulipa gesneriana* L.

Структура работы. Диплом изложен на 62 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Введение, Основная часть, Выводы, Список использованных источников, Приложение. В свою очередь основная часть содержит следующие главы:

1. Популяционные исследования редких и исчезающих видов растений как основа разработки мер по их сохранению и восстановлению численности, в которой рассматривались способы сохранения биоразнообразия вида,

2. Материалы и методы исследований, в которой рассматриваются материалы исследований и использованные в работе методы исследований.

3. Результаты исследований, в которой рассматриваются степень родства *T. suaveolens* (= *T. shrenkii*) и культурного *T. gesneriana* мы принимаем представление Мордак (1990) о том, что это – синонимичные виды с приоритетным названием *T. gesneriana*.

Научная новизна. Впервые изучен генетический полиморфизм *Tulipa gesneriana* по данным секвенирования пластидной и ядерной ДНК.

Положение, выносимое на защиту:

Tulipa gesneriana в пределах исследованной части ареала имеет сложную генетическую структуру популяций, отражающую особенности расселения вида по исследованной территории.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Сохранение биоразнообразия как одна из основных экологических проблем современности. Необходимость сохранения биологического разнообразия была осознана уже столетия назад. В Северной Америке, Европе и некоторых других регионах мира во многих культурах обнаруживаются религиозные и философские воззрения, подчеркивающие важность сохранения видов и уголков дикой природы. Многие религии предписывают человеку жить в гармонии с природой и защищать живой мир, поскольку это творение Божие. В США философы Ральф Уолдэ Эмерсон и Хенри Дэвид Торо рассматривали дикую природу как важный элемент человеческой морали и духовного [Камелин, 2008]

Основные направления изучения биологических особенностей редких видов растений на популяционном уровне. Охрана живой природы заключается в таком сохранении режимов экологических факторов, при

котором не разрушаются экологические ниши, обеспечивается нормальное функционирование популяций живых организмов, соответствие их состава и структуры конкретным условиям местообитания [Акимова, 1994].

Сложность представления о популяции определяется ее местом в иерархии биологических систем, а точнее, двойственностью ее положения в рядах иерархически соподчиненных систем, отражающих различные уровни организации живой материи.

Оценка уровня генетического разнообразия природных популяций.

Известно, что отбор образцов охраняемых видов растений с целью сохранения генофонда целесообразно проводить с учетом данных об уровне и характере генетического разнообразия вида. Наиболее перспективными для оценки генетического полиморфизма в популяциях растений являются методы молекулярной биологии. Более приемлемыми для этих целей представляются подходы, базирующиеся на анонимном полиморфизме длин амплифицированных фрагментов. В частности, использование методов ПЦР, ISSR позволяет за короткое время сразу получить большое количество информации о структуре различных областей генома [Лебедева, 2003]. При рутинных исследованиях новых, ранее не изученных объектов, это является большим плюсом.

Решение проблемы сохранения биоразнообразия растений флоры Саратовской области. Саратовская область находится на юго-востоке Русской равнины и занимает почти треть Нижневолжского региона. Ее площадь составляет 100,2 тыс. км². Протяженность территории с запада на восток 500 км, с севера на юг 150 км в западной части и 330 км в восточной части. Более половины территории находится в бассейне реки Волги – самой большой водной артерии в Европе, разделяющей область на возвышенное Правобережье и Левобережную низменную равнину. Регион занимает Пограничное положение между лесостепями, смешанными лесами Центральной России, полупустынями и пустынями Казахстана и Средней Азии. При этом примерно

78% территории Саратовской области расположено в степной, 17% – в лесостепной зоне и 5% – в северной полупустыне. [Кутлунина, 2013].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Биологические и экологические особенности *T. gesneriana*. Тюльпан Геснера (*Tulipa gesneriana* L. (= *T. Schrenkii* Regel [Zonneveld, 2009], *T. suaveolens* Roth [Литвинская, 2008])) – луковичный поликарпик, эфемероид, является высокодекоративным охраняемым видом, занесенным в Красную книгу РФ и имеющим тенденцию к сокращению численности на территории Российской Федерации, в том числе и в Саратовской области [Бочанцева, 1962]. Вид широко распространен в Южной России, в степях Южного Прикаспия, Крыма, Армении, Кавказа, в Казахстане от восточных до западных границ, на северной границе озер Арал и Балхаш. На территории Саратовской области *T. gesneriana* находится вблизи северной границы своего ареала в европейской части России.

Выделение ДНК и севенирование. ДНК выделяли из листьев, высушенных в силикагеле, с использованием набора (kit) NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Germany) согласно протоколу производителя.

Тринадцать некодирующих и потенциально высоко вариабельных регионов хлДНК (cpDNA): *ndhC-trnV*, *ndhF*, *petA-psbJ*, *psbE-petL*, *rpl32-trnL*, *rps16-trnQ*, *trnT-psbD*, *trnC-petN* и рекомендованные для тюльпанов *trnL* интрон и *trnL-trnF* спейсер, *rpl16* интрон, *rps12-rpl20* межгенный спейсер и *matK* – были амплифицированы с семью образцами *T. suaveolens* с разной окраской околоцветника из наиболее удаленных друг от друга географических локализаций. Была обнаружена вариабельность лишь в регионе *psbE-petL*, который и был взят для окончательного анализа. Весь ITS регион (ITS1, 5.8S и ITS2) был амплифицирован с использованием праймеров NNC-18S10 и C26A.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 50 µl. Реакционная смесь содержала 10 µl готовой реакционной смеси MaGMix (по 200 µM каждого dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 ед. SmarTaqDNA-полимеразы и

буфер; Dialat Ltd., Москва, Россия), 35 µl деионизированной воды, 3.4 µl каждого праймера и 5 µl исходной ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany) по следующему алгоритму: изначальная денатурация в течение 5 минут при 95° С, затем 35 циклов по 30 секунд при 95° С, 30 секунд при 55° С и 2 минуты при 72° С, с финальной элонгацией в течение 10 минут при 72° С. Продукты ПЦР были очищены на агарозном геле и элюированы при помощи NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Germany).

Секвенирование проводили на секвенаторе ABI PRISM 3130 XL с использованием набора реактивов BIG DYE TERMINATOR kit ver. 3.1 согласно протоколу производителя, на базе компании «Синтол» (“Syntol”) (Москва, Россия).

Отбор проб. Сбор материала проводили в 65 естественных популяциях *T. suaveolens* из Астраханской, Волгоградской, Оренбургской, Ростовской, Самарской и Саратовской обл., Краснодарского края, Республик Калмыкия и Дагестан, а также из Крыма и Западного Казахстана. Из каждой популяции отбирали по десять растений. Листья высушивали в силикагеле для дальнейшего молекулярного анализа, а сами образцы растений хранятся в гербарии Ботанического сада Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия, SARBG).

В исследование были также включены 19 гербарных образцов *T. suaveolens*, собранных в Волгоградской, Воронежской, Оренбургской, Ростовской областях РФ, Иране, Центральном Казахстане и Украине, и хранящихся в гербариях Королевского ботанического сада Эдинбурга (RBGE), Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (MW) и Костанайского государственного педагогического университета (KSPI)

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ *TULIPA GESNERIANA* L. ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Анализ cpDNA последовательностей. Выборка разделилась на две достаточно обособленные генетические группы. В первую группу вошли популяции с преобладанием группы А, включая А1 и А2, и гаплотип В, обнаруженный всего у одной особи, во вторую – популяции с преобладанием гаплотипов С, D и Е. Большая часть дисперсии (около 78%) приходится на различия между этими группами. На долю межпопуляционных различий внутри групп приходится менее 2%, на внутривидовую дисперсию – около 21%. Внутривидовая гетерогенность обусловлена присутствием в популяциях единичных особей с гаплотипом из противоположной группы. Картирование географического распространения гаплотипов выявило весьма сложную картину их пространственного распределения, но с определённым, хотя и разнонаправленным паттерном. В самый многочисленный гаплотип А вошли 140 из 219 (т.е. почти 2/3) исследованных образцов.

Производный от него гаплотип А1 обнаружен только у отдельных образцов в двух популяциях Горного Крыма и одной популяции из Р. Калмыкия, а гаплотип А2 – вообще только у 1 образца в популяции из Александрово-Гайского р-на Саратовской обл.

Внутренний гаплотип В также является производным гаплотипа А и обнаружен только у одного образца в популяции из Палласовского р-на Волгоградской обл.

Внутренний минорный гаплотип С, являясь производным гаплотипа В, обнаружен в р-не оз. Аралсор Западного Казахстана, в одной из популяций Горного Крыма и в той же популяции из Р. Калмыкия, что и гаплотип А1. Это указывает на возможную более широкую представленность гаплотипа В (как предшественника гаплотипа С и последующих гораздо более широко представленных производных гаплотипов D и Е).

Гаплотип D распространён по северу Нижнего Поволжья и в Среднем Поволжье вплоть до северной границы ареала. Кроме того, он встречается по Керченскому п-ву, на Северо-Западном Кавказе, центральной части Ростовской обл., вдоль оз. Маныч, Обнаружен также в окр. горы Багдо в Астраханской обл.,

Гаплотип E на европейской части ареала вида распространён на Керченском п-ве Крыма, на севере Северо-Западного Кавказа, в центре Нижнего Поволжья в заволжской его части, а также встречается на юге Оренбургской обл. и в одной из популяций Дагестана.

Анализ ITS последовательностей. Картирование географического распространения ядерных риботипов, так же, как и в случае с пластидными гаплотипами, выявило достаточно определенный пространственный паттерн. Риботипы первой группы распространены преимущественно на Керченском п-ве, на севере Ростовской обл., на северо-востоке ареала в пределах европейской части России. Их нет в Горном Крыму и на Украине, а на Кавказе они представлены преимущественно риботипом 1. Кроме того риботипы этой группы доминируют в Центральном и Юго-Западном Казахстане. При этом риботипы 1a и 1b обнаружены почти исключительно на севере Нижнего Поволжья и в Среднем Поволжье. С юга, запада и востока они окружены риботипами 1 и 1c. В Центральном и Юго-Западном Казахстане риботипы этой группы представлены почти исключительно корневым риботипом 1. Риботип 1d отмечен только у гербарного образца из Ирана.

Риботипы второй группы в основном представлены риботипом 2, доминирующем в Горном Крыму, а также по всему Нижнему Поволжью. Встречается также в Центральном Казахстане. Риботип 3 выявлен в некоторых популяциях центральной части Саратовского Заволжья, по северу Волгоградского Заволжья и по правому берегу Волги. Кроме того, обнаружен в Горном Крыму, Дагестане, на юге Оренбургской обл. и в юго-западном Казахстане.

ВЫВОДЫ

1. Реконструкция эволюционных сетей по принципу максимальной экономии позволили разделить выборку из образцов *Tulipa gesneriana* европейской России и прилегающих территорий также на две клады. Клада 1 также содержит более древние, а кладка 2 - более молодые пластидные гаплотипы. Топология филогенетических деревьев, построенных методом MrBayes, и сетей полностью соответствуют друг другу.

2. Реконструкция эволюционных сетей по принципу максимальной экономии позволили разделить выборку из образцов *Tulipa gesneriana* европейской России и прилегающих территорий на две кладки. Клада 1 содержит более древние, а кладка 2 - более молодые ядерные риботипы. Топология филогенетического дерева, построенная методом MrBayes, и сетей полностью соответствуют друг другу.

Таня