

АННОТАЦИЯ

**диссертационной работы Бейшова Рустама Салтановича на тему:
«Молекулярно-генетические исследования популяций редких видов
растений Северного Казахстана с использованием
межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК»,
представленной на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D060700 – «Биология»**

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа посвящена молекулярно-генетическому исследованию популяций редких видов растений Северного Казахстана с использованием микросателлитного анализа полиморфизма ДНК.

Актуальность темы исследования.

Сохранение биологического разнообразия растительного и животного мира, рациональное использование его генетического потенциала признается приоритетным направлением в мировом уровне.

Сокращение видового и генетического разнообразия представляет реальную угрозу для биосферы, поскольку устойчивость воспроизводства природных экосистем непосредственно связана с их генетически обусловленным потенциалом к адаптации, к меняющимся условиям окружающей среды.

Флористические исследования являются необходимой основой для разработки рекомендаций по охране растительного мира, составления списка редких видов растений. К середине текущего столетия прогнозируется увеличение числа видов растений, находящихся под угрозой исчезновения, с 7 до 60 тысяч. Снижение видового и генетического разнообразия представляет реальную угрозу для биосферы, поскольку устойчивость воспроизводства природных экосистем напрямую связана с их генетически обусловленным потенциалом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды. В комплексной оценке биоразнообразия важную роль играет поддержка генетического разнообразия, т.е. генотипической гетерозиготности, полиморфизма и другой генотипической изменчивости в связи с необходимостью адаптации в природных популяциях.

На сегодняшний день для сохранения генофонда редких растений наряду с традиционными методами исследования необходимо использование современных молекулярно-генетических методов. В настоящее время созданы ДНК-банки ценных, редких видов растений, проводятся исследования по изучению внутривидовой изменчивости охраняемых объектов, уточнению спорных вопросов, возникающих при их систематике и классификации, разработке методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации популяции и изучению генетической устойчивости хранящихся таксонов *in situ*.

Кроме того, эффективность использования традиционных молекулярно-генетических маркеров (структурные гены, мини- и микросателлитные локусы) для исследования генофондов до сих пор остается недостаточной из-за ограниченности количества локусов, пригодных для одновременного генотипирования особей. Поэтому это обстоятельство требует поиска новых путей одновременной молекулярной маркировки многих геномных частей, которые могли бы позволить создать «портрет генома» каждого отдельного индивидуума. В результате появляется возможность объективно оценить специфику генофондов популяций. Разработка новых методов занимает важнейшее место в отборе типичных представителей популяций и разработке генетически обоснованных программ по их сохранению, а также в определении внутривидового генетического разнообразия, оценке гетерезиготности, воссоздании филогенетических взаимосвязей между видами и межгрупповых пространственных взаимосвязей – в решении главной проблемы сохранения биоразнообразия.

Многие ботаники заметили флористические особенности территории. Эта территория относится к степной зоне, однако близость к лесостепной зоне Западно-Сибирской равнины оставляет отпечаток на ее флоре и растительности. Е. И. Рачковская, З. В. Карамышева считают, что здесь была создана укромная местность в низинных горах.

Северный Казахстан уникален не только разнообразием флоры и растительности, но и высокой концентрацией ее редких видов растений.

Выявление и изучение флоры на любой территории занимает важное место в связи с изменениями, происходящими в современной окружающей среде под влиянием усиливающихся неблагоприятных факторов, прежде всего деятельности человека.

Однако эта среда, под влиянием антропогенных факторов, существенно изменяется, что приводит к исчезновению не только локальных популяций, но и целых видов.

Цель диссертационного исследования: изучение биологических особенностей редких видов растений Северного Казахстана, оценка состояния и разработка подходов для сохранения их генофондов с использованием технологии молекулярно-генетической идентификации и паспортизации на основании молекулярного маркирования их геномов.

Задачи исследования:

1. Определение объема полевых работ, маршрутов экспедиций с охватом разнообразных экотопов;
2. Изучение географических, экологических и фитоценологических особенностей местообитаний, популяционных характеристик и параметров особей; отбор биологического материала;
3. Определение возрастного состава эффективного размера популяций; Подсчет общей и эффективной численности популяций;
4. Выделение ДНК из засушенных листьев;
5. Подбор, апробация и выявление эффективности праймеров для полилокусного маркирования растений;

6. Исследование генетического разнообразия популяций редких видов растений на основании данных полилокусного маркирования;

7. Выявление состояния генофондов изученных популяций на основании полилокусного маркирования;

8. Выявление идентификационных молекулярных маркеров; идентификация популяций;

9. Определение параметров и шкалы состояния генофондов популяций редких видов растений на основании полилокусного маркирования;

10. Разработка рекомендаций по сохранению редких видов растений Северного Казахстана.

Объект исследования. Объектами исследований являлись 20 природных ценопопуляций четырех редких видов растений Северной части Республики Казахстан: 5 ценопопуляций *Pulsatilla patens* (L.) Mill., 5 ценопопуляций *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz., 5 ценопопуляций *Adonis vernalis* L. и 5 ценопопуляций *Adonis wolgensis* Stev.

Методы исследования. Полевые исследования проводились в период цветения и плодоношения растений. Исследования проводились детально-маршрутным методом. При выполнении проекта проведено выделение ДНК из образцов растений, определение полиморфизма ДНК ISSR-методом с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Место исследования. Научно-исследовательские работы и эксперименты по диссертации проводились в лаборатории молекулярно-генетических исследований Научно-исследовательского института прикладных биотехнологий Костанайского регионального университета им. А. Байтурсынова и в лабораториях «Пермского государственного национального исследовательского университета» г. Перми.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. *Adonis wolgensis* Stev., *A. vernalis* L., *Pulsatilla multifida* (Pritz.) Juz., *P. uralensis* (Zam.) Tzvel. установлено, что состояние ценопопуляций удовлетворительное.

2. Определена сложная морфологическая и генетическая внутривидовая структура изученных популяций.

3. *Adonis wolgensis*, *A. vernalis*, *Pulsatilla multifida*, *P. uralensis* установлено, что сохранение ценопопуляций способствует снижению антропогенной нагрузки в местах массового произрастания данных видов.

Новизна исследования:

Исследование показало, *Adonis vernalis* L., *Adonis wolgensis* Stev., *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz., что произрастает в Северо-Казахстанской области, изучены места обитания, популяционные характеристики и параметры особей. Определен возрастной состав популяций, эффективный критерий популяций, подсчитана численность популяций. Из фонда гербарных листьев собрано более 600 ботанических материалов. Впервые изучено генетическое разнообразие и генетическая структура изученных ценопопуляций. Им впервые проведена геномная маркировка,

оценено состояние генофонда, разработаны молекулярно-генетические формулы, линейные коды и паспорта для исследуемых ценопопуляций.

Практическая значимость полученных результатов. Сохранение биологического разнообразия является одной из важнейших проблем современного мира. Изучение генетического разнообразия редких видов (межпопуляционный, внутривидовой полиморфизм, генетическая дифференциация популяций), наряду с изучением их биологии и систематики, геоботаническим описанием популяций и определением особенностей их возрастного спектра и ограничивающих факторов, позволяет более полно понять природу и особенности редких видов и, наконец, правильно выбрать механизм сохранения. Сохранение многих генетически отличающихся местных популяций является основной задачей предотвращения вымирания этого вида и сохранения его эволюционного потенциала. Однако не всегда удается сохранить все существующее популяций. Часто для хранения необходимо выделить определенную популяцию или выбрать образцы для хранения в искусственных условиях и/или генетических банках.

Современные молекулярно-генетические методы позволяют определить уровень генетического разнообразия в популяциях и между ними, определить популяционно-генетическую структуру вида, поэтому их применение очень важно при выборе стратегии сохранения редких видов растений.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам. Диссертационная работа выполнялась в рамках научного проекта грантового финансирования Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан под названием «AP05132458 Молекулярно-генетический анализ генофондов популяций редких видов растений Северного Казахстана» (регист.№ 0118PK00404). При подготовке диссертации использованы материалы промежуточных отчетов за 2018, 2019, 2020 годы и итоговый отчет.

Апробация результатов диссертации.

Основные положения диссертации рассмотрены и обсуждены на научно-технических совещаниях сельскохозяйственного института им. В. Двуреченского Костанайского регионального университета, расширенном заседании кафедры биологии и экологии. Основные результаты диссертации по теме опубликованы на международных научно-практических конференциях: XXX международная научно-практическая конференция «Инновационные подходы в современной науке» (Москва, 2018 г.), международная научно-практическая конференция «Методология, теория и практика современной биологии» (Костанай, 2019 г.), Симбиоз-Россия 2019: XI Всероссийский конгресс с участием международных молодых ученых-биологов. (г. Пермь, 2019 г.), международная научно-практическая конференция «Многогранность Великой степи: модернизация общественного сознания, образование и инновации» (г. Костанай, 2019 г.).

Результаты научно-исследовательской работы диссертации включены в промежуточный и итоговый отчет по проекту AP05132458 (2018-2020 гг.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 14 научных статей: 4 статей в журналах, рекомендованных ККСОН МОН РК, 2 статьи в изданиях, входящих в базу данных *Scopus*, получен 1 патент на полезную модель (Патент № 5485 от 11.03.2020 г.) (приложение В), 6 статей в сборниках международных конференций, 2 статьи в электронном журнале выпущен. Издана монография «Редкие виды растений Северного Казахстана», а также рекомендации по сохранению редких видов растений Северного Казахстана.

Научная стажировка. Пройдена научная стажировка в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углекислоты, Сибирского отделения Российской Академии Наук» на базе Кузбасского ботанического сада, г. Кемерово.

Личный вклад соискателя. Автором совместно с научными консультантами проводились работы по отбору объекта, получению биологических образцов, заготовке гербарных трав, постановке экспериментов, структуре и планированию диссертационной работы. Автор лично осуществлял отбор методов исследования, обобщение и интерпретацию 20 ценопопуляций редких видов растений Северо-Казахстанского края с использованием полевых и лабораторных исследований, последующей обработки, анализа, в том числе ряда компьютерных программ. Полученные результаты были опубликованы соавторами в 16 изданиях.

Результаты исследования: По результатам исследований, проведенных в ходе диссертации, были сделаны следующие выводы:

1. В результате исследований получены и систематизированы данные о видовом разнообразии популяций 4-х редких видов растений. Всего исследовано 20 ценопопуляций во время цветения растений.

2. Изучена ценофлора *Pulsatilla patens* (L.) Mill. s.l. в Северном Казахстане, которая насчитывает 168 видов, принадлежащих к 42 семействам и 141 родам. Ценофлора *Adonis wolgensis* включает 119 видов, принадлежащих к 28 семействам и 75 родам. Ценофлора *Adonis vernalis* насчитывает 77 видов, относящихся к 24 семействам. Собрано более 6 тыс. листьев с 595 экземпляров растений.

3. Индекс эффективности ценопопуляций (ЦП) *Pulsatilla* s.p. высокий и находится в узком интервале 0.73–0.88. Различий между видами и промежуточными формами не обнаружено. Индекс эффективности популяции *Adonis wolgensis* Stev. находится в пределах 0.59–0.86, *Adonis vernalis* в пределах 0,70–0,84.

4. При выполнении проекта была выделена ДНК высокого качества из образцов 300 растений, собранных на территории Акмолинской, Костанайской и Павлодарской областей Республики Казахстан.

5. Для молекулярно-генетического анализа с использованием межмикросателлитного метода был произведен подбор ISSR-праймеров по эффективности выявления полиморфизма ДНК.

6. Исследования показали, что изученные виды рода *Pulsatilla* Mill. характеризуются довольно высоким уровнем генетического разнообразия P_{95}

варьирует от 0,728 до 0,904; H_E – от 0,131 до 0,245. Показатели генетического разнообразия выше в изученных ценопопуляциях *P. patens* ($P_{95} = 0,965$, $H_E = 0,162$, $I = 0,373$), чем в ценопопуляциях *P. flavescens* ($P_{95} = 0,904$, $H_E = 0,204$, $I = 0,307$), за исключением показателя ожидаемой гетерозиготности. При этом уровень межпопуляционной дифференциации сопоставим у *P. flavescens* ($G_{ST} = 0,256$) и *P. patens* ($G_{ST} = 0,300$).

Изученные виды рода *Adonis L.* также характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия P_{95} от 0,424 до 0,888; H_E – от 0,171 до 0,300. Показатели генетического разнообразия выше в ЦП *A. wolgensis*, чем в ЦП *A. vernalis*. При этом уровень межпопуляционной дифференциации значительно выше у *A. vernalis* ($G_{ST} = 0,348$), по сравнению с *A. wolgensis* ($G_{ST} = 0,131$).

7. На основании анализа параметров генетического разнообразия установлено, что типичными характеристиками генофондов обладают ценопопуляции Pf1 и Pf2 *P. flavescens* из Костанайской области Северного Казахстана, а специфичными генофондами обладают ценопопуляции Pf3, Pf4 и Pf5 Акмолинской области. Состояние генофондов всех изученных 5 ценопопуляций *P. flavescens* удовлетворительное. Среди ценопопуляций *P. patens* типичными генофондами характеризуются первая и четвертая ценопопуляции (Pr1 и Pr4), а вторая, третья и пятая – специфичными (Pr2, Pr3, Pr5). В первой ценопопуляции *P. patens* Павлодарской области отмечается обеднение генофонда, генофонды остальных изученных ценопопуляций этого вида в удовлетворительном состоянии. Среди ценопопуляций *A. wolgensis* базовыми характеристиками обладают ценопопуляции Aw3 и Aw5, а специфичными – Aw1, Aw2 и Aw4. Состояние всех 5 ценопопуляций *A. wolgensis* удовлетворительное. Среди ценопопуляций *A. vernalis* типичными генофондами обладают первая и третья ценопопуляции (Av1, Av3), а вторая, четвертая и пятая – специфичными (Av2, Av4, Av5). В четвертой ценопопуляции *A. vernalis* Акмолинской области отмечается обеднение генофонда, генофонды остальных ценопопуляций этого вида в удовлетворительном состоянии.

8. Генофонды изученных 20 ценопопуляций были задокументированы в виде формул и штрих-кодов, отражающих состав аллелей в отдельных локусах их геномов. При этом использовался принцип составления и записи молекулярно-генетической формулы и штрих-кода, основанный на выявлении идентификационных маркеров ДНК с использованием ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК, охватывающих большую часть геномов растений и пригодных для генетической паспортизации растений.

9. На основании анализа комплекса основных показателей генразнообразия состояние генофондов 18 из 20 изученных ценопопуляций оценивается как удовлетворительное, причинами этого называют недостаток насекомых опылителей при цветении и фрагментация ареала видов. Обеднение генофонда отмечено в популяции прострела раскрытого, расположенной в Павлодарской области около села Баянаул, и в популяции адониса весеннего Акмолинской области на территории лесничества Мирное.

10. Были разработаны рекомендации по сохранению 4 редких видов растений Северного Казахстана: *Adonis vernalis* L., *Adonis wolgensis* Stev., *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, двух глав, заключения, списка использованной литературы. Работа содержит 235 страницы компьютерного текста, содержит 29 рисунков и 29 таблиц. Список использованной литературы состоит из 167 наименований.

Информация о метрологическом обеспечении диссертационной работы. Исследовательская работа была проведена в лаборатории молекулярно-генетических исследований НИИ прикладной биотехнологии Костанайского регионального университета имени А. Байтурсынова ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» аккредитован в системе аккредитации Республики Казахстан №KZ.T.11.1949 21 августа 2020 г. и приборы и лабораторное оборудование, используемые в научно-исследовательской работе при проведении лабораторных исследований проверена Национальным центром экспертизы и сертификации.