

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ
***COLCHICUM BULBOCODIUM* KER GAWL.**
НА УРОВНЕ ПЛАСТИДНОЙ ДНК

Автореферат бакалаврской работы

Студента 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Жуковой Валерии Даниловны

Научный руководитель:

д. б. н., профессор.

07.06.24



А.С. Кашин

Зав. кафедрой:

д. б. н., доцент,

07.06.24



О. И. Юдакова

Саратов 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Известно, что одной из основных экологических проблем современности является сохранение биоразнообразия. Сокращение видового и генетического разнообразия представляет реальную угрозу для биосферы, поскольку устойчивость воспроизводства природных экосистем непосредственно связана с их генетически обусловленным потенциалом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, а сам этот потенциал определяется исключительно совокупностью генофондов всех живых компонентов экосистемы. Потеря любой части из них является невозполнимой и непредсказуемой по последствиям для экосистемы. В современных условиях уязвимости экосистем и отдельных их составляющих единственным выходом является постоянный мониторинг биоразнообразия (генетического, видового, биоценотического).

Одним из таких видов является брандушка разноцветная (*Colchicum bulbocodium* Ker Gawl.). Вид занесён в Красную книгу Российской Федерации. Является реликтом послеледникового времени средиземноморского происхождения с дизъюнктивным ареалом. Популяции *C. bulbocodium* в настоящее время представлены изолированными участками, некоторые из которых значительно уменьшаются в своей численности.

В пределах российской части ареала вида такие аспекты, как внутривидовое разнообразие и генетическая изменчивость, ранее не изучались. Поэтому совершенно неопределённым остаётся вопрос об уязвимости генофонда вида и степени риска потери его биоразнообразия при исчезновении отдельных популяций. При этом очевидно, что часть местонахождений вида к настоящему времени уже утрачена и продолжает утрачиваться в связи с антропогенной трансформацией его местообитаний.

Цель работы заключалась в выявлении внутривидового генетического полиморфизма популяций *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* на уровне пластидной ДНК в пределах европейской части России и оценке их

филогенетических отношений с западноевропейскими популяциями *C. bulbocodium*

Для достижения цели решались следующие задачи:

1) проанализировать сиквенсы регионов хлоропластной ДНК у растений разных популяций *C. bulbocodium* subsp. *versicolor*, выявить полиморфизм на уровне хлоропластной ДНК;

2) провести филогенетический анализ информативных регионов методом максимальной экономии, дополнительно проанализировать матрицу методом Байеса, выявить количество гаплотипов у вида *C. bulbocodium* subsp. *versicolor*;

3) провести филогеографический анализ гаплотипов хлДНК *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* в пределах европейской части России и других видов *Colchicum*, включенных в анализ, выявить корреляцию между гаплотипами и местом их распространения.

Структура и объём работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка использованных источников и содержит 7 рисунков и 3 таблицы. Общий объем работы составляет 51 страницу. Количество использованных литературных источников составило 97 шт., из них 70 шт. на иностранном языке. Дополнительно были составлены приложения, в количестве 6 шт. Общий объем приложений составляет 43 страницы.

Научная новизна и значимость работы. Впервые получены данные о последовательностях 6 пластидных регионов у популяций *C. bulbocodium*, произрастающих на европейской части России. Выявлена генетическая консервативность *C. bulbocodium* на уровне хлДНК. Обнаружен дублированный фрагмент размером 19 п.н. в гене *rpS16*, по наличию/отсутствию которого популяции разделились на две группы с четкой географической приуроченностью. Отличий между *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* и *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium* не выявлено. *C. bulbocodium* и *C. vernum* также оказались идентичны и не разделились ни одним методом.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Ботанико-географическая характеристика *C. bulbocodium*. В главе представлен обзор литературных данных о систематическом положении, морфологических, биологических и экологических особенностях и распространении *Colchicum bulbocodium* Ker Gawl.

2 Материал и методы. Материалом служили листовые пластинки образцов из 35 популяций *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* из Белгородской, Волгоградской, Воронежской, Ростовской, Саратовской и Тамбовской областей.

Исследование пластидной ДНК проводили после ее выделения с использованием коммерческого набора «NucleoSpin® Plant II» (Macherey-Nagel, Германия), амплификации по стандартной методике, очистке в агарозном геле с использованием коммерческих наборов NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Германия) и секвенирования согласно протоколу производителя на базе компании ООО «НПФ Синтол» (Москва, Россия).

Для секвенирования использовали регионы *atpB-rbcL*, *trnL-trnF*, *trnY-trnD*, *trnH-psbA*, *rbcL* и *rpS16* хлоропластной ДНК (хлДНК). Прямые и обратные последовательности собирались и выравнивались вручную в программе BioEdit 7.0.5.3.

Статистическая обработка была произведена с помощью метода максимальной экономии и метода Байеса.

3 Результаты и их обсуждение

3.1 Полиморфизм на уровне хлоропластной ДНК. Матрица выравнивания последовательностей межгенного спейсера *atpB-rbcL* состояла из 902 позиций. В матрицу также включили образцы из GenBank: *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium* (JF933951) из Франции и *C. vernum* subsp. *vernum* (EU237025, место сбора не указано). Последовательности не содержали замен или инделов как на уровне видов *C. bulbocodium*, так и между

C. bulbocodium и *C. vernum*.

Выравнивание последовательностей межгенного спейсера *psbA-trnH* состояло из 402 позиций и включало последовательности из GenBank *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* (JF934078) из Украины и *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium* (JF933951) из Франции. Выявлено две замены в последовательностях 6 особей.

Матрица выравнивания последовательностей межгенного спейсера *trnL-trnF* состояла из 1053 позиций. Выравнивание было дополнено секвенированными образцами видов, относящихся ранее к роду *Merendera*, *C. eichleri* (Regel) K. Perss. и *C. trigynum* (Steven ex Adams) Stearn из Дагестана, и последовательностью *C. vernum*, загруженной из GenBank (AJ551348, место сбора не указано). Выявлено пять замен, отличающих *C. eichleri* и *C. trigynum* от *C. bulbocodium* и *C. vernum*, что могло бы соответствовать различиям между родами *Merendera* и *Bulbocodium* по старой классификации. В пределах изученной нами выборки *C. bulbocodium* обнаружены единичные замены.

Выравнивание последовательностей межгенного спейсера *trnY-trnD* состояло из 410 позиций и включало последовательности из GenBank: *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* (JF934581) из Украины, *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium* (JF934580) из Франции и *C. vernum* (AY622767, место сбора не указано). Обнаружен индел длиной 19 п.н. во всех секвенированных последовательностях *C. bulbocodium* subsp. *versicolor*. Последовательность *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* из Украины содержала индел, отличающий её от всех остальных образцов в матрице, длиной 3 п.н. Последовательности *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium* и *C. vernum* оказались идентичными

Матрица выравнивания последовательностей гена *rbcL* состояла из 700 позиций. Выравнивание было дополнено секвенированными образцами видов *C. eichleri* и *C. trigynum* из Дагестана и последовательностями *C. vernum* (JQ404748, место сбора не указано) и *C. robustum* (KC899460, место сбора не указано), загруженными из GenBank. Обнаружена одна замена, уникальная для

Merendera (*C. eichleri* и *C. trigynum*). Две замены отличают *C. robustum* от остальных образцов в матрице. В пределах *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium* регион оказался неинформативным.

Наиболее информативными оказались последовательности гена *rpS16*. Выравнивание состояло из 842 позиций и охватывало всю выборку *C. bulbocodium*, включая западноевропейские образцы из GenBank (JF934203 и JF934204). Выравнивание было дополнено секвенированными образцами видов *C. eichleri* и *C. trigynum* из Дагестана, *C. laetum* из Калачёвского р-на Волгоградской области (klch) и последовательностью *C. vernum*, загруженной из GenBank (AJ551202). У части (30.38%) исследованных нами особей выявлен дублированный фрагмент размером 19 п.н. (AGAAAGAAAGAAAAAAAAA), который присутствует в последовательностях некоторых популяций других видов *Colchicum*: *C. bivonae* Guss. (JF934200, Халхидики, Греция), *C. macedonicum* Košanin (JF934252, Струмица, Македония), *C. parnassicum* Sart., Orph. & Heldr. (JF934266, Беотия, Греция), *C. szovitsii* Fisch. & С.А.Мей. (JF934291, Стара Загора, Болгария) и *C. trigynum* (JF934295, Эрзурум, Турция). При этом в других популяциях *C. bivonae* (JF934199, о. Сицилия, Италия), *C. szovitsii* (JF934293, Армения) и *C. trigynum* (JF934296, Грузия) этот индел отсутствует. А в некоторых случаях (*C. szovitsii* – JF934294, Турция; *C. imperatoris-friderici* Siehe ex K.Perss. – JF934238, Турция) встречается частично (5–7 п.н. вместо 19). У западноевропейских образцов *C. bulbocodium*, доступных в GenBank, указанный дублированный фрагмент отсутствует. Помимо индела обнаружены уникальные замены у части образцов Балашовского р-на Саратовской области, Даниловского и Нехаевского р-нов Волгоградской области, отличающие их от всех остальных популяций вида.

3.2 Филогенетический анализ. В результате анализа методом максимальной экономии все исследованные последовательности гена *rpS16* были объединены в 15 гаплотипов, четыре из которых принадлежали образцам *C. bulbocodium*. Все гаплотипы были объединены в одну сеть, в пределах которой образцы *C. bulbocodium* составили отдельную группу из центрального

внутреннего гаплотипа А и дочерних по отношению к нему концевых гаплотипов А1, А2 и А3. Так как при анализе учитывались только нуклеотидные замены, а инделы рассматривались, как пропущенные данные, особи с интересующим нас дублицированным фрагментом объединились в те же гаплотипы, что и особи без него.

Гаплотип А1 содержит замену С на Т в позиции 590 общего выравнивания и обнаружен лишь у одной особи *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* из популяции Даниловского р-на Волгоградской области. В гаплотип А2 вошли отдельные особи из популяций Балашовского р-на Саратовской области и одна из популяций Нехаевского р-на Волгоградской области, отличающиеся наличием замены G на T в позиции 282. Гаплотип А3 содержит замену С на А в позиции 756 и обнаружен у особей из двух популяций Балашовского р-на Саратовской области, не вошедших в гаплотип А2. Самый многочисленный гаплотип А объединил все остальные особи *C. bulbocodium*, включая западноевропейские образцы и *C. vernum*, что поддерживает предположение об их синонимичности.

В результате анализа методом Байеса построено 1502 дерева, из них 1487 имели достоверность 99%, 15 остались неразрешенными. На консенсусном филогенетическом дереве образцы *C. bulbocodium* образовали такое же количество генетических групп, что и результате методом максимальной экономии. В корневую кладу со 100% бутстреп-поддержкой вошли неразделившиеся гаплотипы А и А1, при этом гаплотип А1 на дереве имеет заметно более длинную ветвь по сравнению с остальными образцами, несущими гаплотип А. Образцы с гаплотипами А2 и А3 образовали дочерние субклады по отношению к кладе А+А1. Топология дерева и сети полностью соответствуют друг другу, при этом в качестве корневого выделен гаплотип А как самый близкий к, по-видимому, вымершему общему предку *C. bulbocodium* и *C. trigynum*. Расположение *C. bulbocodium* относительно остальных внешних групп топологически согласуется с филогенетическими обобщениями, сделанными ранее другими исследователями.

3.3 Филогеографический анализ. При нанесении полученных результатов на географическую карту популяции, содержащие дублированный фрагмент в гене *rpS16*, образуют четкий паттерн на восточной границе ареала. При этом они располагаются как на левом, так и на правом берегу р. Волги, из чего можно сделать вывод о том, что река не является географическим барьером для потока генов.

Картирование гаплотипов других видов *Colchicum*, включенных в анализ, показало, что особи, несущие полный дублированный фрагмент AGAAAGAAAGAAAAAAAAA, произрастают преимущественно на Балканском полуострове (*C. bivonae*, *C. macedonicum*, *C. parnassicum* и *C. szovitsii*). Популяции, в которых обнаружен частичный индел (5–7 п.н. вместо 19), расположены на юге Турции (*C. imperatoris-friderici* и *C. szovitsii*). Учитывая то, что дублированный фрагмент обнаружен у особей *C. trigynum*, чей генотип близок к корневому для рода *Colchicum* в целом, и то, что *C. macedonicum* и *C. parnassicum* являются узколокальными реликтовыми эндемиками, есть основания предполагать, что гаплотипы с ним являются более древними, чем гаплотипы без него.

В пределах европейской части России наблюдаемый паттерн может быть связан с палеогеографической историей этого района. Большинство популяций, несущих дублированный фрагмент, объединяющий их со средиземноморскими видами *Colchicum*, расположены в Левобережье Волги и приурочены к понижениям рельефа ≤ 50 м н.у.м., что совпадает с очертаниями границ Раннехвалынского бассейна (~ 30–12 тыс. лет назад) Каспийского моря в позднем плейстоцене.

Раннехвалынское море и прилегающая к нему зона древесной растительности могли стать естественным барьером для расселения доминирующего гаплотипа *C. bulbocodium* (без дублированного фрагмента) в направлении от Средиземноморья на северо-восток. Освободившаяся после Енотаевской регрессии Каспия территория могла быть вторично заселена более древним гаплотипом *C. bulbocodium* со стороны Балканского полуострова,

включенного в современный ареал вида, но не попавшего в выборку. Либо со стороны Северного Кавказа, где в настоящее время встречаются оба гаплотипа (с дублированным фрагментом и без него) *C. trigynum*, а *C. bulbocodium*, по-видимому, исчез.

ВЫВОДЫ

1. У популяций *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* из шести потенциально высоко вариабельных регионов хлДНК информативным оказался лишь *rpS16*.

2. Образцы вида *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* разделились на четыре гаплотипа. Топология филогенетического дерева и эволюционной сети полностью соответствуют друг другу. Особи с дублированным фрагментом объединились в те же гаплотипы, что и особи без него.

3. Отличий между *C. bulbocodium* subsp. *versicolor* и *C. bulbocodium* subsp. *bulbocodium*, а так же *C. bulbocodium* и *C. vernum* не выявлено.

4. По наличию/отсутствию дублированного фрагмента в гене *rpS16* популяции разделились на две группы с чёткой географической приуроченностью, образуя паттерн на восточной границе ареала.

5. Картирование гаплотипов других видов *Colchicum* включенных в анализ, показало, что особи, несущие полный дублированный фрагмент, произрастают преимущественно на Балканском полуострове.

