

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.М. МАЩЕРОВА»

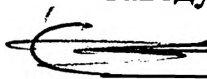
Факультет химико-биологических и географических наук

Кафедра зоологии и ботаники

Допущена к защите

«7» апреля 2021 г.

Заведующий кафедрой

 С.А. Дорофеев

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ИНВАЗИВНЫХ ВИДОВ РОДОВ
ЗОЛОТАРНИК И БАЛЬЗАМИН

Специальность – 1-31 80 01 «Биология»

Леонов Александр Юрьевич,
магистрант 2 года обучения

Руководитель:

Колмаков Павел Юрьевич,
доцент кафедры зоологии и ботаники,
кандидат биологических наук

Витебск 2021

Реферат

Магистерская диссертация 43 с., 4 табл., 7 рис., 22 источников.

ИНВАЗИВНЫЙ ВИД, ЗОЛОТАРНИК, *SOLIDAGO*, НЕДОТРОГА, *IMPATIENS*, ДНК, RAPD-МАРКИРОВАНИЕ, ПЦР, ПОЛИМОРФИЗМ

Объект исследования: образцы тотальной ДНК *Solidago spp* и *Impatiens spp*.

Предмет исследования: внутривидовые молекулярно-генетические отличия образцов *Solidago spp* и *Impatiens spp*.

Цель работы: дать оценку экологической эврибионтности заносным видам золотарника и недотроги, распространённых в Витебской области, на основании морфологической и генетической разнородности их образцов.

Научная значимость: инвазивные виды обладают высокой морфологической, генетической и экологической пластичностью, что позволяет им внедряться в новые для них экосистемы. Изучение степени эврибионтности чужеродных видов поможет при выстраивании стратегий для борьбы с ними.

Социальная и экономическая значимость: полученные знания позволят эффективно проводить мероприятия по контролю численности инвазивных видов.

Область применения работы: в сельском хозяйстве, в вопросах охраны окружающей среды.

Основные результаты работы:

1. Собраны образцы и создана достоверная выборка.
2. Выделена тотальная ДНК из собранного биоматериала, пригодная для дальнейших молекулярно-генетических исследований.
3. Подобраны условия и проведена реакция амплификации образцов с RAPD-маркерами.
4. Визуализированы RAPD-профили и проведена их статистическая обработка.
5. Сформированы выводы в соответствии с целями работы.

Оглавление

| | |
|--|----|
| Реферат..... | 2 |
| Введение | 4 |
| 1. Аналитический анализ литературы по теме исследования..... | 7 |
| 1.1. Теоретические основы применения полимеразной цепной реакции..... | 7 |
| 1.2. Характеристика инвазий рода Золотарник и Бальзамин..... | 13 |
| 2. Материалы и методы исследования | 16 |
| 2.1. Материал исследования | 16 |
| 2.2. Методы экспериментальных исследований | 16 |
| 2.2.1. Адаптированный протокол выделения нуклеиновых кислот из растительного биоматериала: фенол-хлороформный метод..... | 16 |
| 2.2.2. Стандартный протокол выделения тотальной ДНК: метод выделения ДНК набором «Нуклеосорб С» | 18 |
| 2.2.3. Особенности постановки полимеразной цепной реакции | 21 |
| 2.2.4. Визуализация амплифицированных участков ДНК в агарозном геле и Gel Doc XR+ BIO RAD..... | 23 |
| 2.2.5. Статистическая обработка результатов | 23 |
| 3. Результаты и их обсуждение | 25 |
| 3.1. Сбор гербарного материала и морфологическое сравнение..... | 25 |
| 3.2. Результаты подготовки образцов для выявления генетической разнородности..... | 28 |
| 3.3. Результаты проведения RAPD-ПЦР | 31 |
| 3.4. Статистический анализ данных. | 35 |
| Заключение..... | 39 |
| Список использованных источников..... | 41 |

Введение

В настоящее время одной из самых актуальных экологических проблем является внедрение чужеродных видов растений и животных в естественные экосистемы [1]. Эти виды ввиду своих биологических особенностей хорошо натурализовались и прочно вошли в состав естественных растительных сообществ, тем самым нарушив их состав и внутренние ценотические связи. Всё это приводит к значительному экономическому и экологическому ущербу, а нередко представляет угрозу для здоровья населения [2, 3].

Под генетическим полиморфизмом понимается состояние длительного разнообразия генотипов, когда частота даже наиболее редко встречающихся генотипов в популяциях превышает 1%. Генетический полиморфизм поддерживается за счёт мутаций и рекомбинаций генетического материала. Как показывают многочисленные исследования, генетический полиморфизм широко распространён [4].

Чем больше запас генетического полиморфизма в данной популяции, тем легче ей адаптироваться к новой среде и тем быстрее протекает эволюция. Однако, оценить количество полиморфных аллелей посредством традиционных генетических методов практически невозможно, поскольку сам факт присутствия какого-либо гена в генотипе устанавливается путём скрещивания особей, обладающих различными формами фенотипа, определяемого этим геном. Зная, какую долю в популяции составляют особи с различными фенотипами, можно выяснить, сколько аллелей участвуют в формировании данного признака [5].

В методологии исследования молекулярно-генетического полиморфизма растений за последнее время сделан шаг вперёд, благодаря использованию ДНК-маркеров и, в частности, маркеров, полученных на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Быстрота получения результатов и относительная дешевизна полимеразной цепной реакции – это то, что особенно прельщает в этом методе [4].

Наибольшее развитие в исследовании молекулярно-генетического полиморфизма получил вариант полимеразной цепной реакции с единичным коротким произвольным праймером (ПП-ПЦР или RAPD – Random Amplified DNA). Первые работы по использованию ПП-ПЦР были проведены на сое и микроорганизмах где данный метод показал себя как наиболее эффективный способ дифференциации организмов и их идентификации. Сегодня уже сложно найти в молекулярной генетике область, где не использовался бы данный метод. Сложно найти и организмы, геномы которых бы не исследовали с помощью полимеразной цепной реакции. Это особенно заметно по тем мировым проектам, которые сегодня используют ДНК-маркёры для наиболее детального исследования особо ценных в народном хозяйстве организмов [5].

Данный подход состоит в амплификации нескольких участков всей ДНК клетки (тотальной ДНК), включая ДНК митохондрий, или хондриом, посредством коротких праймеров, в результате которой получают набор фрагментов, или RAPD – маркеров. Степень родства между индивидами оценивают по наличию или отсутствию конкретных фрагментов и степени интенсивности полос на электрофореграмме [5].

Цель работы – дать оценку экологической эврибионтности заносным видам золотарника и недотроги, распространённого в Витебской области, на основании морфологической и генетической разнородности их образцов.

Задачи исследования:

1. Сбор образцов *Solidago spp.* и *Impatiens spp.* из районов Витебской области.
2. Адаптирование методики и выделение тотальной ДНК из растительных образцов приемлемой чистоты для дальнейших исследований.
3. Подбор оптимальных условий для проведения RAPD-ПЦР при помощи неканонических RAPD-праймеров.
4. Разделение и визуализация продуктов RAPD-ПЦР.

5. Статистическая обработка полученных данных и формирование выводов.

Объект исследования – образцы тотальной ДНК *Solidago spp.* и *Impatiens spp.*

Предмет исследования – внутривидовые молекулярно-генетические отличия образцов *Solidago spp.* и *Impatiens spp.*

Результаты исследования применимы при экологическом мониторинге очагов растительных инвазий, планировании землепользования, в других природоохранных и производственных мероприятиях.

Достоверность результатов работы подтверждается корректностью и высокой специфичностью методов исследования; исследования осуществлялись с использованием сертифицированного оборудования.

Актуальность: инвазии чужеродных видов растений наносят всё больший экологический и экономический ущерб. Изучение гетерогенности заносных видов поможет давать оценку степени эврибионтности популяций/изоформ для контроля распространённости инвазии.

Социальная и экономическая значимость: полученные знания позволят эффективно проводить мероприятия по контролю численности инвазивных видов золотарника и недотроги.

Список использованных источников

- 1 Семенченко, В.П. Проблема чужеродных видов в фауне и флоре Беларуси / В.П. Семенченко, А.В Пугачевский // Наука и инновации. – 2006. – № 10. – С. 15-20.
- 2 Виноградова, Ю.К. Чёрная книга флоры Средней России (Чужеродные виды растений в экосистемах Средней России) / Ю.К. Виноградова, С.Р. Майоров, Л.В. Хорун. – М.: ГЕОС, 2009. —494 с.
- 3 Бурда, Р.И. Антропогенная трансформация флоры / Р.И. Бурда. – Киев: Наук. думка, 1991. – 169 с.
- 4 Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. – 1994. – 127 с.
- 5 Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство / В.А. Великов. – 2013. – 156 с.
- 6 Юрченко, Е.О., Синявская М.Г. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК / Е.О. Юрченко, М.Г. Синявская. – 2007. – 176 с.
- 7 Ежова, Т.А. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. Учебно–методическое пособие по генетике растений / Т.А. Ежова, О.В. Лебедева, О.А. Огаркова, А.А. Пенин, О.П. Солдатова, С.В. Шестакова. – М.: Макс-Пресс. – 2003. – 198 с.
- 8 Коничев, А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова –2008. – 279 с.
- 9 Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрик. – 1984. – 201 с.
- 10 Сиволоп, Ю.М. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus*) / Ю.М. Сиволоп, А.Е. Солоденко, В.В. Бурлов // Генетика. – 1998. – С. 28 – 37.
- 11 Сиволоп, Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (Научно-методическое руководство) / Ю.М. Сиволоп, Р.Н. Календарь, Т.Г. Вербицкая и др. – 1998. – 227 с.

- 12 Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг – 1998. – 376 с.
- 13 Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб. - справ. Пособие / С.Н. Щелкунов. – 2004. – 179 с.
- 14 Масловский, О.М., Романенко Я.А., Чумаков Л.С., Сысой И.П., Шевкунова А.В. // Современное состояние, тенденции развития, рациональное использование и сохранение биологического разнообразия растительного мира: материалы Медрунар. науч. конф. (Минск-Нарочь, 23-26 сентября 2014 г.) Минск, 2014. с. 100-102
- 15 Национальная система мониторинга окружающей среды Республики Беларусь: результаты наблюдений, 2011 / под общ. ред. С.И. Кузьмина, И.В. Комоско. Минск: «Бел НИЦ «Экология», 2012. с. 201-205.
- 16 Поликсёнова, В.Д., Джус М.А., Храмцов А.К., Сауткина Т.А., Тихомиров В.Н., Черник В.В., Карпук В.В., Лемеза Н.А., Сидорова С.Г., Федорович М.Н., Стадниченко М.А., Савицкая К.Л. // Вестник БГУ. Сер. 2. 2016. №3. с. 60-67.
- 17 Масловский, О.М. Экспансия и особенности пространственного распределения наиболее опасных видов инвазивных растений на территории Республики Беларусь. / О.М. Масловский, Л.С. Чумаков, Ю.С. Подрез, И.П. Сысой, А.В. Левкович, Р.В. Шиманович / БОТАНИКА (ИССЛЕДОВАНИЯ) сборник научных трудов. Национальная академия наук Беларуси, Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича. Минск, 2016. с. 129-144.
- 18 Инструкция на наборы по выделению ДНК «НУКЛЕОСОРБ» типы А, В, С, G, P
- 19 Леонов, А.Ю. Экстракция ДНК и выявление генетического полиморфизма чужеродных видов растений с помощью RAPD-диагностики / П.Ю. Колмаков, Г.Г. Пирханов, А.Ю. Леонов, Ю.И. Высоцкий // Веснік ВДУ, 2018, № 1 (98). – С. 16 – 25.
- 20 Электронный ресурс «Пример использования кластерного анализа STATISTICA...» <http://statistica.ru/local-portals/actuaries/example/1573/>

21 Электронный ресурс «Excel кластерный анализ»

<https://excelka.ru/vba/excel-klasternyj-analiz.html>

22 Соловьева, А.И. Выявление полиморфизма борщевика

Сосновского (*Heracleum sosnowskyi*) с помощью RAPD, ISSR, REMAP / А.И.

Соловьева, Ю.И. Долгих, Е.С. Осипова, А.Ю. Степанова, О.Г. Яворская //

Биология растений и биотехнология. – Белая Церковь, 2011. – С. 64.