

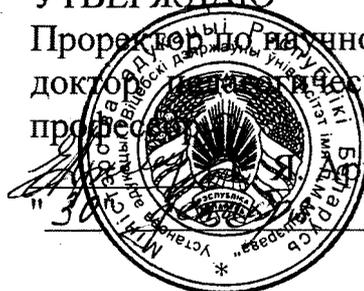
Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»  
(ВГУ имени П.М. Машерова)

УДК 582.998.1:581.5(476.5)

Рег. № 20200656

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе,  
доктор биологических наук,  
профессор



Шанский  
2020 г.

О Т Ч Е Т  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

**Морфологическая и генетическая разнородность образцов заносных  
видов золотарника, как характеристика степени их эврибионтности в  
Витебской области**

(заключительный)

Грант аспирантов, докторантов и студентов  
Министерства образования Республики Беларусь

Научный руководитель НИР, кандидат  
биологических наук, доцент

 30.12.2020 П.Ю. Колмаков

Ответственный исполнитель гранта,  
студент

30.12.2020  А.Ю. Леонов

Нормоконтроль

 30.12.2020 Т.В. Харкевич

Витебск 2020

## Реферат

Отчёт 43 с., 1 кн., 4 рис., 4 табл., 22 источн., 2 приложений

ЗОЛОТАРНИК, SOLIDAGO, ИНВАЗИВНЫЙ ВИД, ДНК, RAPD-МАРКИРОВАНИЕ, ПЦР, ПОЛИМОРФИЗМ

**Объект исследования** – образцы тотальной ДНК *Solidago sp.*

**Предмет исследования** – молекулярно-генетические отличия образцов *Solidago sp.*

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

**Научная значимость** – инвазивные виды золотарника 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 золотарника.

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

### **Основные результаты работы:**

1. Сбор образцов для создания достоверной выборки.
2. Выделение тотальной ДНК из собранного биоматериала пригодной для дальнейших молекулярно-генетических исследований.
3. Подбор условий и последующее проведение реакции амплификации образцов.
4. Визуализация полученных результатов и их статистическая обработка.
5. Формирование выводов в соответствии с целями работы.

## Оглавление

Реферат .....	2
Введение .....	4
Глава 1 Аналитический анализ литературы по теме исследования.....	7
1.1 Теоретические основы применения полимеразной цепной реакции .....	7
1.2 Характеристика инвазий рода Золотарник .....	13
Глава 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
Глава 3 Результаты и их обсуждение .....	25
3.1 Сбор гербарного материала и морфологическое сравнение....	25
3.2 Результаты подготовки образцов для выявления генетической разнородности .....	27
3.3 Результаты проведения RAPD-ПЦР .....	30
3.4 Статистический анализ данных. ....	32
Заключение.....	35
Список используемых источников .....	37
Приложение А.....	40
Приложение Б .....	42

## 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 ценоотические 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, распространённого в Витебской области, на основании морфологической и генетической разнородности их образцов.

**Задачи исследования:**

1. Сбор образцов *Solidago sp.* 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 sp.*

**Предмет исследования** – молекулярно-генетические отличия образцов *Solidago sp.*

**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 рода Золотарник наносят всё больший экологический и экономический ущерб. Изучение гетерогенности этого чужеродного вида 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.

## Список используемых 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 Колмаков, П.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.

## Приложение Б

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень ВАК

1 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.

Тезисы докладов, материалы конференций

2 Леонов А.Ю. Экстракция ДНК и выявление внутривидового полиморфизма *Solidago hybrida Hort.* С помощью RAPD-маркирования / Г.Г. Пирханов, А.Ю. Леонов, А.С. Кисова // XI Машеровские чтения. Материалы международной научно-практической конференции студентов, аспирантов, молодых учёных. – Витебск, 18 октября 2017 г, - С 82 – 84

3 Леонов А.Ю. Особенности экстракции ДНК из растений винограда, культивируемых в условиях *in vitro* при различном светодиодном освещении / Т.В. Никонович, П.Ю. Колмаков, И.Е. Зайцева, Г.Г. Пирханов, А.Ю. Леонов // Международный симпозиум по геномике, приуроченному к Году Науки в Республике Беларусь. Тезисы докладов. – 2017 г. – Минск: 21 – 23 ноября. – С. 146 – 147.

4 Леонов А.Ю. Выделение тотальной ДНК из корневых окончаний *Picea abies (L.) Karst.* / П.Ю. Колмаков, Г.Г. Пирханов, А.Ю. Леонов, К.В. Кунцевич // XXIII (70) Региональная научно-практическая конференция преподавателей, научных сотрудников и аспирантов "Наука – образованию, производству, экономике". Материалы конференции. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова. – 15 февраля 2018 г. – С. 71.

5 Леонов А.Ю. Выявление генетического полиморфизма у сортов винограда, используя методы молекулярного маркирования / Т.В. Никонович, П.Ю. Колмаков, И.Ю. Зайцева, А.Ю. Леонов, Г.Г. Пирханов // Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века Материалы 18-й международной научной конференции. – Минск: ИВЦ Минфина. – 17 – 18 мая 2018 г. – Ч. 2. – С. 157 – 158.

6      Леонов     А.Ю.,     Молекулярно-генетическое     выявление  
микроспоровых фитопатогенов хвойных в Витебской области с помощью  
RAPD-ПЦР / Василевич В.В., Леонов А.Ю., Пирханов Г.Г. // XIV  
Машеровские чтения: материалы международной научно-практической  
конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, Витебск, 21 октября  
2020 г. \ Витеб. гос. ун-т; редкол.: Е.Я. Аршанский (гл. ред.) [и др.]. -  
Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2020 - С. 84-85.

7      Леонов А.Ю., Разнородность и распространение микроспоровых  
фитопатогенов, вызывающих симптомы пятнистого ожога хвои в Витебской  
области // Экологическая культура и охрана окружающей среды: III  
Дорофеевские чтения: материалы международной научно-практической  
конференции, Витебск, 28-29 октября 2020 г. \ Витеб. гос. ун-т ; редкол.: Г.Г.  
Сушко (отв. ред.) [и др.]. - Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2020 - С. 81-  
82.