

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Гладышев М.И. Гладышев
« 03 » июля 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. Биология

Сравнительный морфолого-генетический анализ видов р. *Rosa* в южной части Красноярского края

Научный

Выпускник:

_____ 01.03.2020
подпись дата

С.П. Литовских

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме: «Сравнительный морфолого-генетический анализ видов р. *Rosa* в южной части Красноярского края» содержит 70 страниц текстового документа, 11 рисунков, 7 таблиц, 48 использованных источников и 2 приложения.

Объект – популяции *Rosa acicularis* и *R. majalis*, произрастающие на юге Красноярского края.

Предмет – полиморфизм и степень морфологической и генетической дифференциации популяций шиповников.

Цель – провести сравнительный морфолого-генетический анализ популяций *R. acicularis* и *R. majalis* в южной части Красноярского края.

Актуальность – исследование модификационной и генетической изменчивости природных популяций ценных декоративных и лекарственных видов р. *Rosa*; оценка степени генетической дифференциации популяций.

В работе проведен анализ литературы по объектам и методам исследования, приведена ботанико-географическая характеристика районов, описаны методы проводимых исследований, изучена морфологическая и генетическая изменчивость 9 популяций шиповников, выявлены важные в таксономическом отношении признаки видов р. *Rosa*, изучена степень их морфологической и генетической дифференциации.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Общая характеристика рода <i>Rosa</i>	6
1.2. Морфологическая характеристика, экология и особенности распространения <i>Rosa acicularis</i> и <i>R. majalis</i>	8
1.3. Изучение генетического полиморфизма популяций р. <i>Rosa</i>	12
ГЛАВА 2. РАЙОН И МТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	16
2.1. Характеристика районов исследований	16
2.2. Методика исследований	20
2.2.1. Методы анализа морфологической изменчивости популяций	20
2.2.2. Методы анализа генетической изменчивости популяций	22
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
3.1. Геоботаническое описание пробных площадей	
3.2. Морфологический анализ популяций <i>R. majalis</i> и <i>R. acicularis</i>	
3.3. Анализ сходства популяций видов р. <i>Rosa</i>	
3.3 Анализ генетического полиморфизма с помощью ISSR-PCR анализа..	
ВЫВОДЫ.....	
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	26
ПРИЛОЖЕНИЕ А	
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	

ВВЕДЕНИЕ

Растения, произрастающие в природных популяциях, составляют основу биологических ресурсов во всём мире. Стратегической задачей, стоящей перед государствами, является сохранение биологического разнообразия. В нашей стране уделяется недостаточное внимание вопросу сохранения генетических ресурсов и видового разнообразия дикорастущих растений (Бобошина, Боронникова, 2012).

Среди кустарниковых растений роза, или шиповник, занимает особое место, благодаря высокой хозяйственной ценности: в плодах содержатся биологически активные вещества: каротиноиды; витамины: К, В2, В1, и Е, а по содержанию аскорбиновой кислоты и витамина Р, шиповник занимает первое место (Букин, 1941). Кроме того, шиповник является ценным лесомелиоративным и декоративным кустарником.

Род *Rosa* L. представляет собой таксономически сложную группу, количество видов в которой может различаться у разных авторов. Также мало изучен вопрос о широте гибридизационных процессов, представленных в природных популяциях шиповников. В существующих таксономических обработках предположения о гибридной природе отдельных растений или гибридогенном происхождении видов основываются на приблизительной оценке переходности морфологических признаков между признаваемыми в качестве видов таксонами (Цвелев, 2000, Бузунова, 2001). В результате этого систематика группы носит искусственный и формальный характер (Шанцер, 2001).

На сегодняшний момент специального изучения генетического разнообразия популяций видов рода *Rosa* на территории Сибири не проводилось. Работа по изучению морфологической структуры популяций шиповников выполнена А.В. Пименовым (1997).

Цель работы: провести сравнительный морфолого-генетический анализ популяций *R. acicularis* Lind и *R. majalis* Herrm в южной части Красноярского края.

Задачи:

1. Изучить внутри- и межпопуляционную изменчивость морфологических признаков *R. acicularis* и *R. majalis*.
2. Оценить сопряженную изменчивость и выявить важные в таксономическом отношении признаки видов р. *Rosa*.
3. Оценить генетический полиморфизм 8 популяций рода *Rosa* на основе ISSR-PCR анализа.
4. Оценить степень генетической и морфологической дифференциации популяций шиповников.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика рода *Rosa*

Среди цветковых растений немногие роды, как *Rosa*, привлекали к себе столь пристальное внимание систематиков. С одной стороны, это связано с высокой декоративностью растений, наверное, самых популярных в культуре начиная с античных времен, и другой — с чрезвычайной изменчивостью видов этого рода и наличием множества культурных форм и межвидовых гибридов (Пименов, Шемберг, 1995).

Шиповник (*Rosa*) является представителем семейства розоцветных (*Rosaceae* Juss.). Это многолетние, листопадные или вечнозеленые кустарники, используемые как декоративные, пищевые, почвозащитные, технические, витаминоносные и лекарственные растения. Термин «шиповник» применяется по отношению к формам, гибридам, сортам роз, имеющим плодовое назначение. Этот же термин считается русским эквивалентом латинского названия рода (Хржановский, 1958).

Род *Rosa* включает около 400 видов, которые распространены в умеренной и субтропической зонах Северного полушария: на севере — до полярного круга, на юге — до северной Африки, северной Аравии, южной части Ирана, Афганистана, по реке Инд и далее на восток до Филиппинских островов и Северной Америки. Отдельные виды произрастают в Северной Африке и северных широтах Евроазиатского континента (Zielinski, 1986). Весьма разнообразными являются также условия их произрастания: они растут как на побережьях, так и высоко в горах, встречаются отдельными кустами, куртинами и зарослями в лесах, на полях, в лугах, однако наиболее широкое распространение они имеют в поймах рек и вокруг озёр (Пайбердин, 1963).

Одно из важных обобщений рода Роза сделано С.В. Юзепчуком в десятом томе «Флора СССР» (1941). Здесь впервые описывается и даётся подробная ботаническая характеристика 64 видам рода *Rosa*,

произрастающим на территории СССР, из которых 8 (*R. acicularis*, *R. oxyacantha* M. Bieb. *R. alberti* Regel, *R. glabrifolia* C.A. Mey. ex Rupr., *R. davurica* Pall., *R. laxa* Retz., *R. spinosissima* L., *R. majalis*) характерны для Западной и Восточной Сибири. После этой публикации появилась целая серия разноплановых работ по видовому составу, географии, экологии, биохимии шиповников. Однако все они носили узкорегиональный характер.

Значительный прогресс в деле исследования шиповников СССР отмечается в 50-е годы. В монографической работе В.Г. Хржановского «Розы» (1958), где представлен общий и систематический обзор видов этого рода, разработана его классификация, представлены многочисленные данные о географии, экологии и происхождении видов, что имеет большое значение для обобщения знаний о видах рода в целом. Эта книга считается одной из наиболее крупных работ по систематике рода *Rosa*. В ней приводится ключ для определения 111 видов шиповника, а в сводке, которая опубликовалась под редакцией С.Я. Соколова, добавляется ключ для определения еще 39 видов, тем самым доводя количество видов до 150.

На территории Красноярского края видовое разнообразие составляет четыре дикорастущих вида шиповника: иглистый (*R. acicularis*) остроиглистый (*R. oxyacantha*), колючайший (*R. spinosissima*), майский (*R. majalis*). Эколого-ценотические условия ограничивают формообразовательный процесс, а сомкнутое затененное растительное покрытие обуславливает проблему существования малоустойчивых форм (создаёт предпосылки для постоянной острой борьбы за условия существования). Всё это привело к низкому разнообразию видов на территории Красноярского края.

Среди дикорастущих видов шиповника, произрастающих в условиях Красноярского края, доминирующее положение занимают роза майская (*R. majalis*) и роза иглистая (*R. acicularis*) (Черепнин, 1987). В центральных и

южных районах пересекаются их географические ареалы, эколого-фитоценотические ниши.

Одна из особенностей шиповника возможность вегетативно омолаживаться и поддердивать продуктирующие состояние, что является в хозяйственном отношении весьма ценным свойством (Пименов, 1997). Ниже приведена краткая характеристика шиповника майского и иглистого.

1.2. Морфологическая характеристика, экология и особенности распространения *Rosa acicularis* и *R. majalis*

Роза иглистая – это листопадный кустарник около 1,5 м высотой, с буро-коричневыми побегами, которые густо покрыты, горизонтально отстоящими шипами и щетинками. У старых ветвей часто шипики утрачены. Листья сложные, непарноперистые, 3-15 см длиной, состоящие чаще всего из 5-7 листочков длиной 1,5-6 см. Цветки расположены одиночно или по 2-3 на концах ветвей. Венчики темно-розовые, 3-6 см в диаметре. Плод 15-20 мм длиной гладкий или щетинистый (в южных районах), различной формы с перетяжкой у верхушки, суженный к обоим концам, 0,5–1,5 см в диаметре, красный/темно-красный, иногда с сизым налетом, с сохраняющимися прямостоящими чашелистиками. Плод представляет собой многоорешек внутри разросшегося гипантия (Тахтаджян, 1978).

Размножается семенами и летними черенками. Цветет в июне-июле, плоды созревают в августе-сентябре.

Встречается на севере европейской России, на Урале, в лесной части Сибири, вплоть до Арктики, Северной Монголии, Даурии, Манчжурии, Охотской области, Японии и Китае, согласно рисунку 1. Права на фото принадлежат специалисту по объекту И.Г. Чухиной (2004). Точки показывают местонахождения вида по литературным источникам и данным гербариев. Полигоны составлены на основе обобщенной

информации из литературных источников и по гербарным экземплярам и представляют область возможного распространения вида.

R. acicularis характеризуется очень широкой экологической амплитудой, произрастает повсеместно. Мезоксерофит. Растет в лесах, степях, проникает в пояс высокогорий и в арктические тундры. Всюду встречается единично или небольшими группами, реже образует почти чистые заросли или входит в состав кустарниковых сообществ как субэдификатор. Произрастает в подлеске различных типов хвойных, лиственных и смешанных лесов, на лесных полянах и опушках. В южных частях ареала чаще приурочен к тенистым и влажным местообитаниям в березовых колках или в поймах рек. На севере ареала избегает сырых и холодных почв, предпочитает обнажения коренных берегов, сложенных известняками, сланцами, мергелями, песчаником. По долинам рек и склонам южной экспозиции проникает в лесотундру и тунду, где может быть встречен в ерниках. В горы поднимается до нижней части субальпийского пояса (Юзепчук, 1941).

R. acicularis - полиплоидный вид, содержит все возможные наборы хромосом для рода *Rosa*: $2n = 14, 28, 42, 56$ (Юзепчук, 1941). А. В. Пименов (1997) определил количество хромосом на проростках семян красноярской, туруханской, ангарской популяций розы иглистой. Во всех популяциях розы иглистой образуются семена, как с окто- ($2n = 8x = 56$), так и гексаплоидным ($2n = 6x = 42$) наборами хромосом, первые доминируют в красноярской и туруханской популяциях, а вторые – в ангарской.



Рисунок 1 – Ареал *Rosa acicularis*

Роза майская. Листопадный кустарник высотой 0,5–2,0 м, может достигать высоты до 3,0 м. Побеги практически полностью голые, за исключением небольших изогнутых шипиков, расположенных чаще всего у основания листьев и молодых побегов. В нижней части ветвей могут быть многочисленные прямые тонкие шипики и щетинки. Листья имеют очередное расположение, сложные, непарноперистые, 5-9 см длиной, состоящие из 5-7 листочков. Листочки 1,5-5 см длиной, продолговато-эллиптические, острые, по краю железисто-мелкопильчатые или зубчатые, с обеих сторон от голых до опущенных, без точечных железок. Цветоносные ветви усажены редкими, загнутыми книзу шипами, располагающимися обычно по два при основании листьев. Цветки одиночные или по 3-5. Венчики розовые, 3-6 см в диаметре. Плод 10-20 мм длиной, красный, оранжевый, шаровидный, яйцевидный, голый, мясистый, с сохраняющимися восходящими чашелистиками. Поверхность гипантия, расположенная с солнечной стороны, более темная, так как процесс созревания идет интенсивнее (Пименов, Шемберг, 1995).

Цветет в мае-июне, плоды созревают в августе-сентябре. Диплоидный набор хромосом ($2n = 14, 28$) оказался характерным для подавляющего большинства растений розы майской (Тахтаджан, 1978).

Rosa majalis — широко распространённый вид с евросибирским типом ареала. Встречается от Скандинавии до Сибири (доходит примерно до озера Байкал), нигде не заходя в Арктику, и лишь изредка спускаясь к зоне степей. Встречается в европейской части России, Западной и Восточной Сибири, произрастает преимущественно на юге и в центре Красноярского края. На рисунке 2 приведены местонахождения вида по литературным источникам и данным гербариев.

Растение относится к мезофитам, является засухоустойчивым и теневыносливым. Растет одиночно или небольшими группами в подлеске разреженных лесов, на лесных полянах и опушках, по берегам рек, на влажных лугах. Часто преобладает в кустарниковых зарослях, приуроченных к поймам рек. В горах произрастает крайне редко, чаще встречается в предгорьях (Юзепчук, 1941).

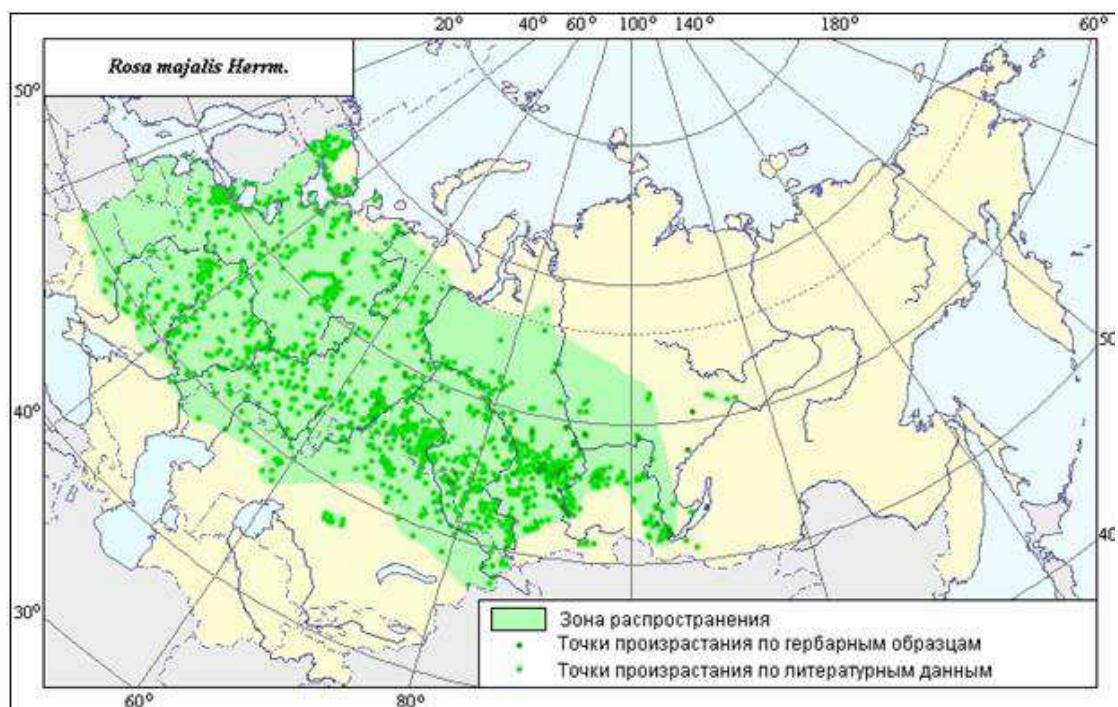


Рисунок 2 – Ареал *Rosa majalis*

1.3. Изучение генетического полиморфизма популяций р. *Rosa*

Изучение генетического разнообразия играет важную роль для сохранения биологических видов. Видообразование имеет очень важное значение: оно ведет к дифференцировке, к дроблению одной генетической популяции на ряд подгрупп, каждая из которых представляет собой независимую эволюционную линию со своими возможностями для дальнейших филетических изменений (Frankel, 1974).

Генетическое разнообразие популяции зависит от его способности адаптироваться к окружающей среде в процессе естественного отбора. Из-за низкой внутренней полиморфности уменьшаются варианты комбинации генов, которые помогают адаптироваться к окружающей среде, что снижает вероятность появления новых адаптивных генов. Таким образом, популяции в природных условиях нуждаются в надлежащем уровне генетического разнообразия для выживания под давлением меняющихся биологических и неживых компонентов экосистем (Грушецкая, 2013).

Уровень генетического полиморфизма как природных популяций, так и культурных растений наиболее эффективно определяется с помощью ДНК-маркеров, также это позволяет получать информацию о филогенетических взаимоотношениях между видами и о географической локализации популяций, имеющих разное генетическое происхождение (Diamond, 2002).

Основанные на ДНК молекулярные маркеры являются надежными источниками оценки генетического разнообразия, поскольку они предоставляют генетическую информацию для каждого вида независимо от возраста, физиологических условий и факторов окружающей среды (Joshi, 2004).

Для природных и культурных популяций животных и растений используют ДНК-микрочипы, чтобы обнаруживать однонуклеотидный полиморфизм (SNP). Однако эти SNPs по-прежнему трудно обнаружить в геноме, они требуют дорогостоящего оборудования и расходных

материалов. К тому же нет никаких доказательств возможности их использование для оценки родственной принадлежности и связи между маркерами SNP и вовлеченными генами в развитии экономически ценных признаков (Ganie, 2015).

Менее сложным подходом для сканирования генома является использование метода ISSR-PCR. Данный метод основан на использовании праймеров с комплементарными микросателлитными повторами (4–12 единицам повтора), несущими на одном из концов последовательность из двух-четырех произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь»). Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты уникальной ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофорограмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Таким образом, метод, названный Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), основан на амплификации области ДНК, расположенной между двумя локусами микросателлитов (рис. 3).

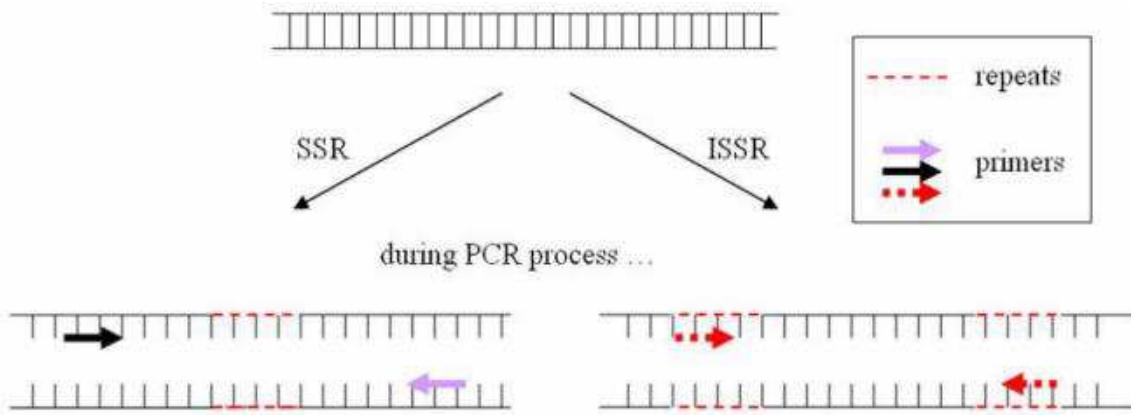


Рисунок 3. Принцип работы SSR и ISSR маркеров

После проведения ISSR-ПЦР в результате анализа на электрофорограмме образуется так называемый ISSR-фингерпринт, который выглядит как сочетание дискретных полос ДНК на геле (Грушецкая и др., 2013). ISSR-фингерпринт довольно хорошо

воспроизводится, потому что последовательность праймера строго специфична, за счет чего достигается довольно высокий уровень специфичного отжига. Однако проблема «сильных» и «слабых» ампликонов, как и в случае других ДНК-маркеров, основанных на методе ПЦР, остается (Чемерис и др., 2018). В литературе подчеркивается необходимость более строгого подбора последовательностей ISSR-праймеров и использования в анализе только «ярких» продуктов ISSR-амплификации (Gustafsson et al., 2014).

Полученные ПЦР-продукты относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию полосы (Huseyin et al, 2010). Кроме того, такая амплификация не требует информации о геномной нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК и раскрывает высокополиморфность структуры (Azhar et al., 2013). Расположение микросателлитов может значительно отличаться даже в пределах одного вида, благодаря чему возможно исследование внутривидового полиморфизма и генетической вариации среди очень близких видов (Fang and Roose, 1997; Nagaoka and Ogihara, 1997).

Этот метод был разработан больше, чем два десятилетия назад (Zietkiewicz et al., 1994). Данный тип маркеров обеспечивает хорошее покрытие генома, обладает хорошей воспроизводимостью результатов по степени полиморфизма и не требует предварительной трудоемкой обработки ДНК. Это и дает возможность оценить генетический дрейф, происходящий в экосистемах, а также эффективно проводить мониторинг популяций редких и исчезающих видов растений (Nagaoka et al, 1997).

Метод ISSR-PCR сканирования может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации групп растений различного таксономического ранга, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования многих

растительных и животных организмов (Stolpovskii et al., 2013; Askari et al., 2014; Costa et al., 2016).

Проведённым ISSR-методом экспериментально доказана возможность гибридизации у рода *Rosa*. И. А. Шанцер и Н. А. Кутлунина (2012) изучили изменчивость морфологических признаков и генетический полиморфизм в смешанной многовидовой симпатической группе шиповника (*Rosa*) из Луганской области. Украины. Использовались различные методы обработки данных: метод главных координат, кластерный анализ (UPGMA), анализ структуры байесовскими методами в программах Structure и NewHybrids для молекулярных данных. Результаты указывают на присутствие четырех видов в группе: *R. canina*, *R. villosa*, *R. dimorpha* и *R. podolica*, а также различных гибридов между ними. Гибридная природа отдельных образцов подтверждается молекулярными методами, но морфологически эти гибриды не являются промежуточными между родительскими видами: они либо совпадают по характеристикам с одним из родителей, либо демонстрируют новые комбинации диагностических признаков.

ГЛАВА 2. РАЙОН И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика районов исследований

Наши исследования проводились в южной части Красноярского края, в частности, в Уярском, Новоселовском, Березовском, Манском районах, окрестностях г. Красноярска.

Окрестности города Красноярска располагаются в Красноярско – Канской провинции и относятся к Красноярскому округу. Тектоническую основу Красноярско – Канской провинции составляет мезо – кайнозойский прогиб края Сибирской платформы на контакте со структурами Восточного Саяна. Провинция является самой пониженной краевой частью Среднесибирского плоскогорья. В рельефе выделяют две обширные всхолмленные равнины: западная (Приенисейская) и восточная (Канская).

В системе флористического районирования А.Л. Тахтаджяна (1978) г.Красноярск принадлежит Среднесибирской провинции Циркумбореальной области Голарктического флористического царства. По геоботаническому районированию СССР территория относится к Евразиатской хвойной области, Европейско-Сибирской подобласти, Средне-Сибирской стране, Урало-Алтайской провинции.

Характер растительного покрова г. Красноярска обусловлен местонахождением его территории близ границы лесостепной и таёжной природных зон и антропогенным воздействием. Также основным фактором, обуславливающим развитие различных типов растительности, является климат, в особенности количественные показатели тепла и влаги. Мощным трансформатором всех климатических факторов выступает рельеф, он определяет размещение растительных сообществ. Основными типами естественной растительности города в соответствии с классификацией, принятой для южной части Красноярского края, являются леса, степи, луга, кустарниковая и водная растительность, болота (Вандеров, 2016).

Естественная лесная растительность представлена формациями сосновых и березовых лесов. Степную растительность формируют луговые, настоящие степи и степные петрофитные группировки. Луговая растительность представлена формациями пойменных и суходольных лугов. Кустарниковые, водные сообщества, болота, а также синантропные участки растительности существенно дополняют фитоценотическое разнообразие городской среды.

Канская лесостепь обрамлена с запада, юго-запада, юга и юго-востока горными сооружениями Енисейского кряжа и Восточного Саяна. Днище котловины представляет собой волнистую равнину с высотными отметками 200-300 м над уровнем моря, повышаясь к окраинам до 450 м.

На территории Уярского района, расположенного в пределах Канской лесостепи, выделено несколько растительных ассоциаций. На открытых нераспаханных участках преобладают луговые простреловые степи, отличающиеся большой видовой насыщенностью, полным травостоем, красочностью. Под этой растительностью формируются выщелоченные черноземы. Среди древесных пород преобладает береза. Березовые леса водоразделов обычно разреженные, с луговыми полянами и сочным травянистым покровом, образованным лесным и лугово-лесным разнотравьем (Любимова, 1962).

Территория Березовского района расположена в центральной части земледельческой зоны Красноярского края. Климат резко континентальный, с коротким и жарким летом. По природно-сельскохозяйственному районированию территория отнесена к лесостепной зоне (Кучин, 1998). Среднегодовое количество осадков, выпадающих на территории, составляет 517 мм.

На весьма незначительной площади наблюдается большое ландшафтное разнообразие: низкогорный рельеф сменяется равнинно-террасным, переходящим в поименно-болотистый. Соответственно меняется и растительность: темнохвойная тайга гор переходит в сосново-

берёзовый лес предгорий и в кустарники в поименно-болотистой части (Черепнин, 1995).

Восточный Саян – горная система, расположенная в пределах Южной Сибири – начинается на левобережье Енисея, к юго-западу от Красноярска, и протягивается более чем на 1000 км в юго-восточном направлении почти до берегов Байкала. Материал для исследования был собран вдоль берега р. Енисей.

По типу рельефа территория Манского района, часть которого расположена в пределах Восточного Саяна, делится на три геоморфологические зоны: северную, среднюю, южную (Тихонова, 1964). Рельеф средней зоны (именно в этой зоне был собран материал) – предгорья Восточных Саян – в основном холмисто-увалистый, резко расчленённый долинами речек, логами. Увалы высокие, выпуклые, а в отдельных местах, особенно к западу и в бассейне реки Маны, они имеют переход к сопкообразным вершинам и низкогорному рельефу. Местность более приподнята над уровнем моря, чем лесостепь. Лога и долины речек глубокие и заболочены (Протопопов, 1965).

В центральной части большинство лесов производные, преобладают березовые и осиновые леса, возникшие на месте сосновых и лиственничных и елово-пихтовых лесов. Сосновые леса связаны с песчаными подзолистыми почвами и болотами. Наиболее широко распространены сосновые боры зеленомошной группы типов леса, занимающие разные уровни песчаных грив (брусничные, черничные). Древостои II-III бонитета, с полнотой 0,6-0,8; запасы древесины до 300 м³/га (Малышев, 1965).

Новосёловский район располагается на стыке двух тектонических структур: Минусинской котловины и Восточно-Саянского нагорья. Минусинская котловина и прилегающие к ней хребты Восточного Саяна образовались в палеозое около 400 миллионов лет назад.

Правобережная часть района занята отрогами Восточного Саяна. Рельеф в отличие от левого берега, более расчленённый, горы более высокие. Процессы выветривания сильно разрушили горы, придав им мягкие округлые очертания. Очень много глубоковрезанных речных долин, самая значительная из них — долина реки Убей.

Самая низкая часть правого берега — северо-западная. Здесь преобладают небольшие по площади высокоподнятые плато. В северной части, вдоль берега водохранилища протянулся на 20 км хребет Тон. Его средняя высота 600-700 м, а максимальная 837 м. Здесь же находится долина реки Убей, прорезавшая гранитный массив и образовавшая обрывистые берега, местами высотой до нескольких десятков метров. Средняя высота правобережной части района 650-700 м (Лаухин, 1999).

Новосёловский район можно условно разделить на две части с немного различающимся климатом. Это более прохладный и влажный юго-восток и более тёплый и сухой северо-запад. Вся территория района расположена в умеренном климатическом поясе.

Географическое положение Новосёловского района таково, что на его территории соседствуют несколько природных зон: леса, лесостепи, степи. Почти половина территории района (около 1500 км²) занята лесами, произрастающими в основном на правобережье. Район можно разделить на лесное правобережье и степное и лесостепное левобережье (Богданова, 2016).

Центральная часть правобережья занята берёзовыми лесами. Сплошные лесные массивы здесь чередуются с лугами, небольшими по площади и образовавшимися на месте вырубленных участков леса. Южная и восточная части правого берега заняты лесами, в которых берёза и осина сочетаются с хвойными деревьями. На востоке из хвойных преобладает сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*), и в меньшей степени — пихта (*Abies sibirica*). На юге лиственница (*Larix sibirica*) и сосна, на юго-востоке — лиственница и пихта и отдельные деревья кедра (*Pinus sibirica*). Среди

лесов правобережья встречаются и степные ландшафты, образовавшиеся на южных и юго-западных склонах гор. Эти склоны, освещаемые солнцем, сильно иссушаются, и там произрастает ксерофитная травянистая растительность (Антипова, 2011). На северо-западе правобережья на песчаных почвах расположился сосновый бор, протянувшись от берега Красноярского водохранилища севернее с. Анаш, на восток до залива Кома. Бор занимает площадь около 40 км² (Вышегородцев, 2005).

2.2. Методика исследований

Объектом исследований явились 9 популяций видов рода *Rosa*, произрастающих в г.Красноярске и его окрестностях (р-н Академгородка, ст. Бугач, район Турбазы), в Березовском (окр. г. Железногорск), Манском (окр. пос. Б.Унгут), Уярском (окр. пос. Пинчино), Новосёловском (ур. Медведево, зал. Убей) районах.

На первом этапе исследований были проведены геоботанические описания местообитаний, в которых встречаются представители рода *Rosa*. Описание проводились по стандартным геоботаническим методикам А.Г. Воронова (1973) и П.Д. Ярошенко (1961). В каждом сообществе закладывались пробные площади размером 20м x 20м. В лесных сообществах при характеристике древостоя определялись: преобладающая порода, ее средняя высота, ярусность, сомкнутость крон. При описании подлеска указывался его видовой состав, ярусность. В описание травяно-кустарникового яруса входило: общая характеристика, видовой состав, проективное покрытие.

2.2.1. Методы анализа морфологической изменчивости популяций

Измерение параметров для оценки внутри- и межпопуляционной изменчивости проводилось на 30 генеративных растительных организмах. Для репрезентативности выборки использовался метод случайного отбора,

при использовании которого все особи совокупности имеют равные шансы попасть в выборку.

При оценке модификационной изменчивости популяций шиповников замеряли следующие признаки: x_1 – длину сложного листа; x_2 – длину и x_3 – ширину листочка; x_4 – отношение длины листочка к расстоянию от его основания до наибольшей ширины; x_5 – форму листочка; x_6 – длину прилистника; x_7 – число листочков в сложном листе; x_8 – число зубчиков края листочка, мм; x_9 – длину шипов на 2 – 3-х летних побегах; x_{10} – длину гипантия; x_{11} – ширину гипантия; x_{12} – форму гипантия; x_{13} – число орешков в одном гипантии; x_{14} – длину орешка; x_{15} – диаметр орешка; x_{16} – форму орешка; x_{17} – массу 1000 орешков. Данные признаки были замерены нами. Большинство данных параметров используется другими авторами (Пименов, 1997) для оценки модификационной изменчивости.

При обработке данных использованы параметрические методы. Статистическая обработка данных проводилась в программе «Statistica 10» Для каждого параметра были определены пределы варьирования признака (lim), среднее арифметическое значение (X), ошибка репрезентативности среднего (m_x), среднее квадратичное отклонение (σ) и коэффициент вариации (Cv). Коэффициент вариации использован в качестве меры внутрипопуляционной изменчивости, а его оценка проведена с помощью эмпирической шкалы уровней изменчивости С.А. Мамаева (1972), имеющей следующие градации:

$C < 7\%$ - очень низкий уровень изменчивости;

C - 8-12% - низкий уровень изменчивости;

C - 13-20% - средний уровень;

C - 21-40% - высокий уровень;

$C > 40\%$ - очень высокий уровень изменчивости.

Однофакторный дисперсионный анализ позволяет установить достоверность различий между среднепопуляционными значениями

одноименных признаков. Различие следует считать достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проведена в программе «Statistica 10».

Для сравнительного анализа популяций и выявления диагностических признаков использовался метод главных компонент (Principal component analysis, PCA). Метод главных компонент – это один из наиболее широко используемых методов многомерного анализа данных. В основе этого метода лежит сведение всего множества исходных признаков к нескольким новым нескоррелированным переменным (собственно, главным компонентам), представляющим собой линейную комбинацию исходных переменных.

Анализ сходства популяций по морфологическим признакам проводился с помощью кластерного анализа. В обработке применялся метод Уорда, который используется при работе с группами сходных размеров, эффективно выделяет структуру, «скрытую» случайной изменчивостью признаков и позволяет получить компактные, хорошо выраженные кластеры (Ward, 1963). В качестве меры сходства использовалось Евклидово расстояние.

Перед использованием методов многомерной статистики данные стандартизировались (из значений каждого признака вычиталось его среднее и полученное число делилось на стандартное отклонение). Эта процедура необходима для того, чтобы размерность данных и их вариабельность не влияла на результаты анализа.

2.2.2. Методы анализа генетической изменчивости популяций

Выделение ДНК из сухого растительного материала проводилось в лаборатории биотехнологии и молекулярно-генетических исследований СФУ. Анализировалось 8 популяций, где в каждой популяции было выбрано по 10 растений, не являющиеся клонами.

Выделение ДНК производили из 30-40 мг сухой растительной растерпой ткани СТАВ-методом. Принцип выделения ДНК заключается в разделении фаз раствора ДНК и фенол-хлороформной смеси и удалении вместе фенольной и хлороформными фазами белков и полисахаридов.

Протокол выделения ДНК СТАВ-методом

1. 30-40 мг сухого растительного материала пометить в ступку, измельчить с помощью пестика, поместить в 1,5 мл пробирку.
2. Добавить 1000 мкл 2%СТАВ - буфера и поместить в термостат на 2,5 часа при 56 °C.
3. Добавить равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1), тщательно перемешать.
4. Центрифугировать 10 минут на максимальной скорости.
5. Аккуратно отобрать супернатант в новую пробирку, записать получившийся объем.
6. Добавить равный объем хлороформа, тщательно перемешать и повторить процедуру 4-5.
7. К супернатанту добавить изопропанол в количестве 80% от объема образца и насыщенный раствор NaCl в количестве 1/9 от объема образца. Тщательно перемешать.
8. Инкубировать при -20°C в течение 20 минут.
9. Центрифугировать на максимальной скорости 10 минут.
10. Аккуратно убрать раствор (с помощью пипетки), не задевая осадка (осадок – это и есть ДНК).
11. Добавить 300-500 мкл чистого 70% этанола. Центрифугировать на максимальной скорости.
12. Аккуратно убрать этанол. Остатки этанола высушить, поставив пробирки в термостат на 37°C.
13. Разбавить осадок однократным буфером ТЕ.

14. ДНК, выделенная фенол-хлороформным методом, готова к постановке ПЦР не сразу – нужно подождать несколько часов, а лучше день, для наилучшего растворения осадка.

Для изучения генетической изменчивости популяций использовался ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) метод. Предварительно на 8 образцах ДНК (из разных популяций) из имеющегося набора праймеров (Mansour et al., 2009) опытным путем выявлялись те, которые дают воспроизводимый полиморфный результат (табл. 1).

Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, включающей: 10 мкл готовой PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», Новосибирск), 6 мкл воды, 2 мкл ДНК и 2 мкл праймера.

Программа амплификации: 95° С (5 мин) – денатурация белка для активации полимеразы; 13 циклов: 95° С (20 с) – денатурация ДНК, 55° С (45 с, понижение температуры на 0,7° С в каждом последующем цикле) – присоединение праймера, 72° С (90 с) – элонгация цепи; 25 циклов: 95° С (20 с) – денатурация ДНК, 44° С (30 с) – присоединение праймера, 72° С (90 с) – элонгация цепи; 72° С (7 мин) – достройка всех цепей.

Разделение продуктов амплификации производилось в 1,5% агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при 80V. После электрофореза гель окрашивали раствором бромида этидия фотографировали в проходящем УФ-излучении.

Таблица 1 – Характеристика праймеров, использованных в ISSR-PCR

Название праймера	Последовательность
17898A	5'-(CA) ₆ GT -3'
17899B	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GG-3'
17898B	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GT-3'
HB14	5'-CTC-CTC-CTC-GC-3'

С помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software на фотографии электрофорезного геля для каждого образца отмечалось наличие или отсутствие фрагментов ДНК одной длины. Дополнительно использовалась ручная правка матриц. Каждый фрагмент (признак) был оценен как присутствующий (1) и отсутствующий (0). При обработке ISSR данных принимается теория доминантного наследования признаков, т.е. определённый бэнд в гетерозиготе и гомозиготе будет одинаково проявляться на электрофореграмме (Кашин,2015).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Popgene version 1.32 (расчет уровня полиморфизма (P), генного разнообразия Нея (H_e), индекса Шеннона (I_0), показателя подразделенности популяций (G_{st})). Генетические дистанции (D) между популяциями определялись по формуле М. Нея.

Дендрограмма сходства строилась при помощи компьютерной программы TFPGA version 1.3 (Miller, 1997) невзвешенным парногрупповым методом (UPGMA - unweighted pair-group method using arithmetic average). Генетическое расстояние между популяциями рассчитывались по формуле М. Нея (1978).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zieliński J. Studia nad rodzajem Rosa L / J. Zieliński // Systematyka sekcji Caninae DC em. Christ – 1986. – №. 30. C. 3–109.
2. Badr A. Genetic diversity of Achillea fragrantissima in Egypt inferred from phenotypic variations and ISSR markers with reference to traits of plant size and seed yield Plant Genet. Resour / A. Badr, H. El-Shazly, H.I. Sayed Ahmed, M.M. Hamouda, I. El-Khateeb, M. Sakr // – 2017 – № 15. – C. 239-247.
3. Azhar M. N. Optimization of ISSR markers for molecular DNA fingerprinting in Aquilaria sp. / M.N. Azhar, H.A. Muhammad, N.I. Siti, K.S. Parween // Nuclear Technical Convention. – 2013 – 1–8.
4. Badr A. Role of biotechnology in conservation and sustainable use of medicinal plants in the arid regions / A. Badr, H. El-Shazly, M. Sakr // Recent Progress in Medicinal Plants. – 2014. – T. 39. – C. 317-333.
5. Dai-di C. ISSR Analysis of Hybrid Descendants of Roses / C. Dai-di, S. Cheng-yuan, Z. Jin-zhu, C. Xue, M. Xue, W. Na. // Journal of Northeast Agricultural University (English Edition). – 2013. – T. 20. – №. 1. – C. 1-4.
6. Diamond J . Evolution, consequences and future of plant and animal domestication / J. Diamond // Nature. – 2002. – № 418. – C. 700–707.
7. Frankel O.H. Genetic conservation: our evolutionary responsibility / O.H. Frankel // Genetics. – 1974. – №78. – C. 53–65.
8. Ganie S.H. Authentication of medicinal plants by DNA markers / S.H. Ganie, P. Upadhyay, S. Das, M.P. Sharma //Plant Gene. – 2015. – T. 4. – C. 83-99.
9. Gustafsson A.L. Genetics of cryptic speciation within an Arctic mustard, Draba nivalis / A.L. Gustafsson, I. Skrede, H.C. Rowe, G. Gussarova, L. Borgen, L.H. Rieseberg, C. Brochmann, C. Parisod // PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 4. – C. e93834.

10. Huseyin U. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers / U. Huseyin, B.F. Yong, K. Orhan, G.W. Peterson, A. Diederichsen, P. Kusters // Genet. Resour. Crop Evol. – 2010. – Т. 57. – С. 1109–1119.
11. Joshi K. Molecular markers in herbal drug technology / K. Joshi, P. Chavan, D. Warude, B. Patwardhan // Current science. – 2004. – С. 159-165.
12. Nagaoka T. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers / T. Nagaoka, Y. Ogihara // TAG Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – Т. 94. – №5. – С. 597-602.
13. Wissemann V. Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa*, section *Caninae* (Ser.) Rehd. / V. Wissemann, F.H. Hellwig. // Bot. Acta. – 1997. – Т. 110. –С. 251–256.
14. Антипова Е.М. Флора северных лесостепей Средней Сибири / Е.М. Антипова // Красноярск: РИО КГПУ – 2003. – С. 464.
15. Бобошина И.В. Изучение генетического полиморфизма некоторых сортов *Triticum aestivum* L. с использованием ISSR-маркеров / И.В. Бобошина, С.В. Боронникова // Аграрный вестник Урала. – 2012. № 5. – С. 19–20.
16. Бузунова И.О. Роза, Шиповник – *Rosa* L. / И.О. Бузунова // Флора Восточной Европы – 2001. – Т. 10. – С. 329–361.
17. Вандеров А.В. Особенности физико-географических условий манского района / А.В. Вандеров, А. Ю. Катков // География и геоэкология на службе науки и инновационного образования. – 2016. – С. 12-14.
18. Воронов, А.Г. Геоботаника / А.Г. Воронов // Высшая школа – 1973. –384с.

19. Грушецкая З.Е. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений / З.Е. Грушецкая // Вестник БГУ. – 2013. – 3. – С. 50-56
20. Ижевский С.А. Розы / С.А. Ижевский // М.:Сельхозгиз. Изд. 2-ое испр. и доп. 1958. – 335 с.
21. Кичунов Н.И. Розы / Н.И. Кичунов // – Л.:Изд.-во Всесоюз. института прикл. ботаники и новых культур. – 1929. – С. 284.
22. Коропачинский И.Ю. Древесные растения Азиатской России / И.Ю. Коропачинский, Т.Н. Встовская // – Новосибирск: Изд-во СО РАН, филиал "Гео" – 2002. – С.353-354.
23. Кучин С.П. ЗАТО Железногорск. Природа. / С.П. Кучин //Железногорск: Полиграфист. – 1998. – С.75.
24. Любимова Е.Л. Растительность лесостепи и зоны травяных лесов Красноярского края. / Е.Л. Любимова // Природное районирование центральной части Красноярского края и некоторые вопросы пригородного хозяйства. – 1962.
25. Малышев Л. И. Высокогорная флора Восточного Саяна: обзор сосудистых растений, особенности состава и флорогенезис / Л.И. Малышев // – Наука – 1965.
26. Малышева Л.И. Флора Сибири / Л.И. Малышева, В.А. Положий // – Rosaceae – 1988. – Т. 8.
27. Кашин А.С. Методы изучения ценопопуляций цветковых растений / А.С. Кашин, Т.А. Крицкая, Н.А. Петрова, И.В. Шилова // – учебно-методическое пособие для магистров биологического факультета – 2015. – С.127.
28. Пайбердин М.В. Шиповник / М.В. Пайбердин // – М.: Гослесбумиздат С. 156.
29. Пименов А.В. Биоразнообразие шиповников в Средней Сибири / А.В. Пименов, М.А. Шемберг // – Институт леса им.

В.Н.Сукачева СО РАН, Государственный природный заповедник "Столбы" – 1995. – С.90-91.

30. Пименов, А.В. Морфологическая изменчивость *Rosa acicularis* L. Средней Сибири (систематика): автореф. дис. канд. биол. наук / А.В. Пименов // – Красноярск – 1997. – С.17.
31. Положий А.В. Флора Сибири. Rosaceae. / А.В. Положий, Л.И. Малышева // – Новосибирск: Наука – 1988. - Т.8.
32. Поповская Е.М. Анатомо-физиологическое изучение плодов и семян шиповника / Е.М. Поповская // Учен. зап. Рязанск. гос. пед. ин-та. – 1949. – С.145—158.
33. Протопопов В.В. Биоклимат темнохвойных горных лесов Южной Сибири. / В.В. Протопопов // – Наука – 1965.
34. Рябовол С.В. Растительность г. Красноярска / С. В. Рябовол // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – 1.
35. Стрелец В.Д. Методические рекомендации по селекции шиповника / В.Д. Стрелец // – М.: Изд-во МСХА – 1994. – С.168.
36. Тахтаджан А.Л. Флористические области Земли / А.Л. Тахтаджан // – Л.: Наука – 1978. – С.247.
37. Федоров А.А. Хромосомные числа цветковых растений / А. А. Федоров // – Наука. – 1969.
38. Хржановский В.Г. Розы / В.Г. Хржановский // – М.: Сов.наука – 1958. – С.497.
39. Цвелев Н.Н. Определитель сосудистых растений Северо-Западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области) / Н.Н. Цвелев // СПб.: Издво СПФХА – 2000. – С.781.
40. Чемерис Д.А. Методы ПЦР для выявления мультилокусного полиморфизма ДНК у эукариот, основанные на случайному праймировании / Д.А. Чемерис, В.В. Зубов, А.Р. Кулув, А.В. Чемерис // Генетика. – 2018. Т. 54 – № 5. – С. 495–511.

41. Черепнин Л.М. Растительность Красноярского края / Черепнин Л.М. // Природные условия Красноярского края. М.: АН СССР – 1961. – С. 160-187.
42. Чухина И.Г. Гербарий ВИР им НИ Вавилова (WIR) и его роль в решении проблем мобилизации, сохранения и изучения генетических ресурсов растений / И.Г. Чухина // Проблемы сохранения разнообразия растительного покрова. Генетика и селекция. – 2004. – Т. 169. – С. 201-202.
43. Шанцер И.А. Межвидовая гибридизация у шиповников (*Rosa* L.) секции *Caninae* DC / И.А. Шанцер, Н.А. Кутлунина // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2010. – №. 5. – С. 564-573.
44. Шанцер И.А. Современное состояние таксономической изученности восточноевропейских шиповников (*Rosa* L.) / И.А. Шанцер // Бюл. МОИП. – 2001. – Т. 106. – С. 43–48.
45. Щербаков Ю.А. Схема физико-географического районирования Красноярского края / Ю.А. Щербаков, М.В. Кириллов // Сибирский географический сборник. Ч. 1 – М.: АН СССР. – 1962. – С. 119-130.
46. Юзепчук С.В. Роза (шиповник) - *Rosa* L. / С.В. Юзепчук // Флора СССР. – Л., М.: Изд. Акад. наук СССР, – 1941. – Т. X. – С.449-450.
47. Ярошенко, П.Д. Геоботаника / П.Д. Ярошенко // М.-Л., – 1961. – 474 с.
48. Вышегородцев А.А. Красноярское водохранилище. / А.А. Вышегородцев, Д.А. Бураков, О.А. Кузнецова, И.В. Космаков, Т.Н. Ануфриева // Наука – 2005.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Гладышев М.И. Гладышев
« 03 » июля 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01. Биология

Сравнительный морфолого-генетический анализ видов р. *Rosa* в южной части Красноярского края

Научный

Выпускник:

_____ 01.03.2020
подпись дата

С.П. Литовских

инициалы, фамилия

Красноярск 2020