

УДК 577.2

ББК 28.04

Молекулярно-генетическое исследование ценопопуляций пиона тонколистного (*Paeonia tenuifolia* L.) в Ульяновской области

Мищенко Андрей Владимирович,

кандидат биологических наук, доцент кафедры географии и экологии
ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Россия

Аннотация. Сохранение флористического биоразнообразия – важная проблема современности, которая должна решаться, прежде всего, на региональном уровне, так как от флористической уникальности регионов зависит общее состояние локальных экосистем и биосферы Земли в целом. Необходимой основой для этого является изучение редких и исчезающих видов растений на разных уровнях организации, создание региональных Красных книг и научно обоснованной сети особо охраняемых природных территорий разного ранга.

Ключевые слова: краснокнижные виды, молекулярно-генетические исследования, пион тонколистный.

Красная книга Ульяновской области по растениям первый раз была издана в 2005 году, и по закону Ульяновской области о Красной книге принятому Законодательным Собранием Ульяновской области было предусмотрено издание Красной книги Ульяновской области не реже одного раза в 10 лет [1, с. 1–220]. Для переиздания региональной Красной книги в течение десяти лет шло её ведение, которое включало: сбор и анализ данных об объектах растительного мира, мониторинг состояния объектов растительного мира, предложения о занесении в Красную книгу того или иного вида, подготовку и реализацию

предложений по организации особо охраняемых природных территорий с целью сохранения охраняемых видов. Результаты проводимого фитомониторинга и ведения Красной книги Ульяновской области были отражены в публикациях материалов научных конференций, периодических изданий и монографий [2, с. 262–272; 3, с. 84–92; 4, с. 387–393; 5, с. 1–285]. В конце 2015 года региональная Красная книга была успешно переиздана. Во второе издание Красной книги в настоящее время включено 549 видов биоты региона. Среди них растения составляют 245 видов, грибы – 25 видов, лишайники – 33 вида, беспозвоночные животные – 156 видов и позвоночные животные – 90 видов.

Из 245 видов растений, охраняемых на территории Ульяновской области, 207 видов составляют покрытосеменные, 3 вида – голосеменные, 7 видов – папоротниковидные, 1 вид – хвощевидные, 4 вида – плауновидные и 23 вида – моховидные. Кроме того, в региональной Красной книге приведен белый список из 24 видов растений и животных, исчезнувших с территории области и список из 287 видов, нуждающихся в особом внимании. В белом списке сейчас 12 видов сосудистых растений (11 видов покрытосеменных и 1 вид – плауновидных) более 100 лет не обнаруживаемых в растительных сообществах региона.

К видам, требующим особого внимания отнесено 118 видов сосудистых растений (112 видов - покрытосеменных, 1 вид – голосеменных, 2 вида – папоротниковидных, 1 вид – хвощевидных и 2 вида – плауновидных). Эти виды требуют особого внимания, так как они являются реальными кандидатами на включение в последующие издания Красной книги Ульяновской области при ухудшении условий обитания или выявлении тенденции снижения их численности.

В настоящее время учеными нашего региона ведется постоянный, планомерный и комплексный мониторинг за состоянием популяций редких и охраняемых видов, который включает молекулярно-генетические, ценопопуляционные и геоботанические исследования, позволяет оценить экологическое состояние видов на данном участке ареала, а также разработать

действенные меры по их сохранению в настоящем и восстановлению в будущем.

Один таких видов, пион тонколистный (*Paeonia tenuifolia* L.) – редкое, уязвимое и охраняемое растение лесостепной и степной зоны Европейской России. Он образует крупные популяции в степных и лесостепных сообществах юга Ульяновской области, где находится на северо-восточной границе своего распространения. Несмотря на то, что он занесён в региональную и федеральную Красные книги, до сих пор специальных молекулярно-генетических исследований этого вида в условиях Приволжской возвышенности не проводилось. В то же время по данным многих исследователей на территории России и Приволжской возвышенности в последние десятилетия наблюдается сокращение его ареала из-за негативной хозяйственной деятельности человека [6, с. 15–27]. На территории Ульяновской области пион тонколистный встречается в Радищевском и Старокулаткинском районах, а также на востоке Павловского и на юге Новоспасского района (рис.1).

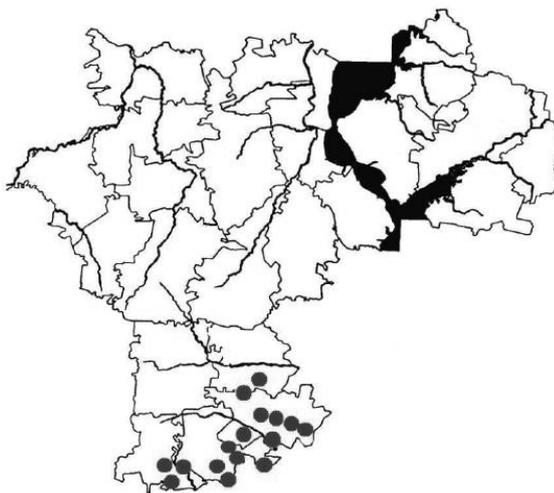


Рис. 1. Ареал распространения пиона тонколистного (*Paeonia tenuifolia* L.) на территории Ульяновской области.

Изучение ценопопуляций *Paeonia tenuifolia*, из которых в дальнейшем были взяты образцы для молекулярно-генетического анализа, показало, что они располагаются в составе кострцево-разнотравных, кострцево-тырсово-разнотравных и пионово-кострцево-разнотравных степей и примыкающих к

ним участкам полянно-опушечных сообществ, то есть во взаимосвязанных между собой биоценозах, образующих единый ландшафтный комплекс – Приволжскую лесостепь.

Материалы и методы. Для молекулярно-генетических исследований в августе 2017 г. были взяты образцы пиона тонколистного из четырех популяций юга Ульяновской области:

1. Гора Вотлама (Большая Атмала) в 1,5 км к северо-западу от с. Средниково Радищевского района Ульяновской области. Кострцево-разнотравное полянно-опушечное сообщество.

2. Гора Малая Атмала в 1,8 км юго-восточнее с. Средниково Радищевского района Ульяновской области. Кострцево-разнотравная степь.

3. В 3,5 км юго-восточнее пос. Октябрьский Радищевского района Ульяновской области. Кострцево-тырсово-разнотравная степь.

4. В 2 км юго-западнее урочища Урусовка Радищевского района Ульяновской области. Пионово-кострцево-разнотравная луговая степь по склону северо-западной экспозиции.

Молекулярно-генетические исследования *Paeonia tenuifolia* включали следующие этапы: экстракцию ДНК из зелёных свежемороженых листьев растения; подбор оптимальных условий полимеразной цепной реакции (ПЦР) (концентрация растворов буфера, праймеров, dNTP, полимеразы, а также температурных условий проведения ПЦР); проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью амплификации участка хлоропластного гена (матураза К); аналитический гель-электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК с целью определения качества проведённой ПЦР; препаративный гель-электрофорез для разделения продуктов ПЦР-реакции и выбора интересующего фрагмента при сравнении с маркёром длин; выделение из геля и очистка участка гена матуразы К; проведение сиквенсовой реакции с флюоресцентно-мечеными дезоксирибонуклеотидами (ddNTP) с последующей очисткой набора терминированных фрагментов; секвенирование полученного фрагмента гена матуразы К и получение последовательности нуклеотидов;

биоинформационная обработка полученных сиквенсов с построением филогении для уточнения систематического положения вида растения.

Результаты исследования. Проведена экстракция ДНК из листьев 4х объектов *Paeonia tenuifolia* с помощью набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit, качество выделения проверено на спектрофотометре:

- образец № 1 - 66 мкг/мкл,
- образец № 2 – 68 мкг/мкл,
- образец № 3 – 56 мкг/мкл,
- образец № 4 – 87 мкг/мкл, все пробы ДНК пригодны для амплификации.

Проведена полимеразная цепная реакция на полученной матрице ДНК, качество ПЦР проверено на гель-электрофорезе (для образцов № 1-4 получены фрагменты гена матуразы К длиной около 500 п.о.) Проведено секвенирование полученных амплифицированных фрагментов ДНК *Paeonia tenuifolia* и получены последовательности интересующего участка для объектов исследования.

В результате секвенирования для 4 объектов *Paeonia tenuifolia* получены уникальные последовательности хлоропластного гена матураза К; корректировка и анализ фрагментов проведена в программе Sequence Scanner 2 software (Life Technologies Corporation), выравнивание проведено с помощью программы ClustalW2, дерево построено по методу ближайших соседей в программе JalView (рис. 2). Для определения места *Paeonia tenuifolia* в филогенетическом дереве рода проведено сравнение и выравнивание определённого нами участка хлоропластного гена с имеющимися в базе BOLD Systems и GenBank последовательностями рода *Paeonia*.

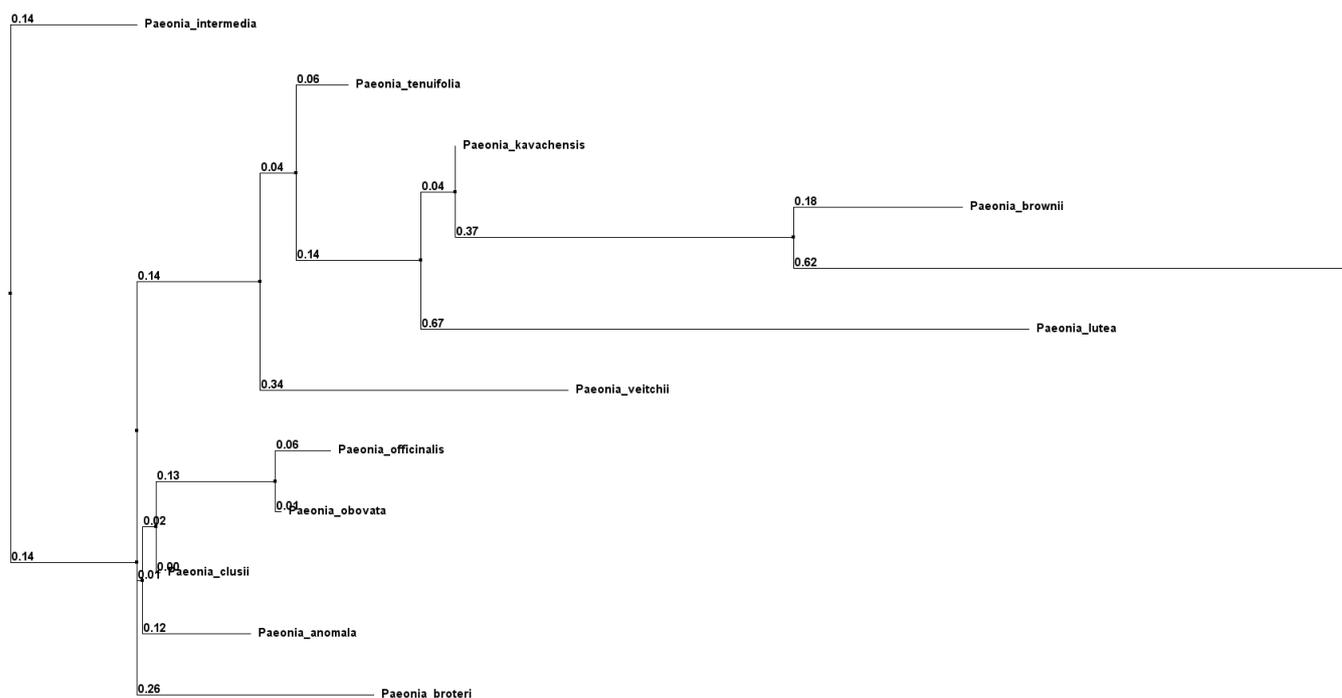


Рис. 2. Филогенетическое дерево некоторых видов рода *Paeonia*, построенное после выравнивания последовательностей гена матураза К (в программе JalView).

Полученные последовательности хлоропластного гена матураза К из отобранных особей *Paeonia tenuifolia* достаточно однородны и показывают генетическую целостность и взаимосвязанность ценопопуляций пиона тонколистного, расположенных на северо-восточном участке ареала в условиях Приволжской возвышенности и приуроченных к кострцево-разнотравным, кострцево-тырсово-разнотравным, пионово-кострцево-разнотравным степям и примыкающим к ним участкам полянно-опушечных сообществ.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Ульяновской области в рамках научного проекта № 16-44-732017 «Разработка методов молекулярно-генетического скрининга жизнеспособности и наличия патогенов в клеточных культурах и коллекционных образцах редких и эндемичных видов растений Ульяновской области».

Список использованной литературы:

1. Красная книга Ульяновской области (растения) – Ульяновск:

УлГУ, 2005. Том 2. 220 с.

2. Артемьева Е.А., Корепов М.В., Корепова Д.А., Корольков М.А., Красун Б.А., Ковалев А.В., Масленников А.В., Масленникова Л.А. Комплексное биоэкологическое исследование биоты новых перспективных ООПТ Среднего Поволжья (Ульяновской области) // XXIV Любищевские чтения. Современные проблемы эволюции. Ульяновск, 2010. С. 262–272.

3. Масленникова Л.А., Масленников А.В. Новые находки видов растений федеральной и региональной Красных книг в ключевых и новых перспективных ООПТ Ульяновской области // Природа Симбирского Поволжья. Сб. научн. трудов. Вып. 12. Ульяновск, 2011. С. 84–92.

4. Масленников А.В., Масленникова Л.А., Масленников В.А. Лесостепные урочища и центры развития кальциевых ландшафтов как гаранты сохранения биоразнообразия севера Ульяновской области и центральной части Приволжской возвышенности // XXIX Любищевские чтения. Современные проблемы эволюции и экологии. Ульяновск, 2015. С. 387–393.

5. Раков Н.С., Саксонов С.В., Сенатор С.А., Васюков В.М. Сосудистые растения Ульяновской области. – Флора Волжского бассейна. Т. II. – Тольятти: Кассандра, 2014. 295 с.

6. Мищенко А.В., Артемьева Е.А., Макаров Д.К., Солтис В.В. К эколого-генетическому мониторингу популяций пиона тонколистного (*Paeonia tenuifolia* L.) - кормового растения листовертки пионовой *Pelatea Klugiana* (Freyer, 1836) (Lepidoptera, Tortricidae) - редкого и эндемичного вида чешуекрылых Ульяновской области (Среднее Поволжье) // Проблемы региональной экологии. 2017. №1. С. 15–27.