

АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ (*)
о результатах НИР по гранту за 2024-2025 год

Конкурс 2024 года на соискание грантов
для поддержки научно-исследовательской работы
аспирантов и молодых сотрудников ИГУ.

Направление Биология, почвоведение и биотехнологии Шифр гранта 091-24-317

1. Наименование НИР по гранту Изучение пространственно-генетической структуры редкого реликтового растения *Anemone altaica* в Южной Сибири
2. Структурное подразделение (кафедра, лаборатория) Биолого-почвенный факультет, кафедра биохимии, молекулярной биологии и генетики
3. Исполнитель НИР Нелюбина Полина Евгеньевна
(Ф.И.О)
4. Координаты исполнителя НИР +79503986358, nelubina01@mail.ru
(телефон, факс, E-mail)
5. Ожидаемые результаты в соответствии с заявленным планом работы:
 - Будет проведено определение условий амплификации некоторых молекулярно-генетических маркеров для анализа пространственно-генетической структуры популяций *A. altaica*;
 - Будут определены нуклеотидные последовательности молекулярно-генетических маркеров у *A. altaica* из различных популяций;
 - Будет определена пространственно-генетическая структура *A. altaica* на территории Южной Сибири и установлены филогенетические связи с близкородственными таксонами.
 - Будут подготовлены рекомендации по возможности практического использования полученных результатов для сохранения генофонда вида
6. Основные полученные научные результаты:

Введение

Настоящий проект был направлен на изучение современной пространственно-

генетической структуры *Anemone altaica* (Ranunculaceae) на территории Южной Сибири.

В исследование были включены популяции *Anemone altaica*, произрастающие на хр. Хамар-Дабан (поймы рек Безымянная, Утулик, Бабха, Солзан, Снежная, Большой Мамай, Малый Мамай, Выдриная, Осиновка (пос. Танхой), Переемная, Осиновка (пос. Мишиха), Мишиха, Мысовка, Мантуриха, Никиткина, Большая Речка, Еловка, Тимлюй), Приморском хребте (р. Большая Черемшанка, Емельяниха), и Западном Саяне (р. Нижняя Буйба, Большой Кебеж).

1. Определение условий амплификации некоторых молекулярно-генетических маркеров

На первом этапе экспериментальной работы проводили выделение общей ДНК ЦТАБ методом [1] с авторскими модификациями [3]. В качестве молекулярных маркеров использовали регионы пластидной (*trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*) и ядерной (ITS1-ITS2) ДНК. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием универсальных праймеров [2; 4; 5; 6].

В виду использования в исследовании универсальных праймеров проводили оптимизацию условий ПЦР для некоторых используемых молекулярных маркеров. Для определения оптимальных условий ПЦР использовали образцы популяций р. Безымянная (для *trnL* и *trnL-trnF*) и р. Нижняя Буйба (для *atpB-rbcL*).

Температурный градиент отжига праймеров региона, включающего интрон *trnL* и спейсер *trnL-trnF* для ДНК-полимеразы Go Taq Flexi (Promega, США) устанавливали в диапазоне 59-51,8 °С. Диапазон температур отжига праймеров межгенного спейсера *atpB-rbcL* составил 53-44,9 °С.

Эффективность амплификации оценивали по интенсивности окрашивания полученных ПЦР-продуктов бромистым этидием в агарозном геле и по отсутствию дополнительных неспецифических амплифицированных фрагментов ДНК.

Для региона, включающего интрон гена *trnL* и межгенный спейсер *trnL-trnF* наиболее эффективную амплификацию наблюдали при температуре отжига праймеров 57 °С в течение 30 сек. Для межгенного спейсера *atpB-rbcL* амплификация протекала наиболее эффективно при температуре отжига праймеров 50 °С в течение

30 с.

Полученные ПЦР-продукты (ампликоны) отделяли от компонентов реакции путем электрофореза, и очищали для последующего секвенирования.

2. Определение нуклеотидных последовательностей молекулярно-генетических маркеров у *Anemone altaica*

Определение нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров проводили путем секвенирования по методу Сэнгера с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе серии 3500 (Applied Biosystems and Hitachi, Япония).

В результате работы определены 44 нуклеотидных последовательностей интрона гена *trnL*, 72 нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера *trnL-trnF* и 18 нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера *atpB-rbcL* у особей *Anemone altaica* из популяций хр. Хамар-Дабан, Приморского хребта и Западного Саяна.

Так же для оценки внутригеномного полиморфизма были проанализированы последовательности региона ITS1-ITS2 у двух особей *A. altaica* из популяции р. Выдринная (хр. Хамар-Дабан). Особи, включенные в анализ, принадлежали к двум различным пластограммам.

ПЦР региона ITS1-ITS2 проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (New England Biolabs, США). Ампликоны лигировали в плазмидные векторы pEASY-Blunt3 (TransGen Biotech, КНР). Полученную генетическую конструкцию клонировали в химически компетентных клетках *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, США). Из бактериальных культур выделяли плазмиды, содержащие вставку ITS1-ITS2 и секвенировали по методу Сэнгера. В результате было получено 14 последовательностей ITS1-ITS2 для одной особи и 15 последовательностей для второй особи *A. altaica*.

3. Определение пространственно-генетической структуры и филогенетических взаимоотношений популяций *Anemone altaica* на территории Южной Сибири

Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия

в MEGA v. 6.06. и байесовским анализом в MrBayes v. 3.2.7. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) и расчет индексов генетической дифференциации Φ (эквивалентный индексу Шеннона-Уивера) проводили в программе PopArt v. 1.7. Анализ главных координат (PCoA) проводили с использованием пакета GenAlEx v.6.5 для Microsoft Excel.

Молекулярно-генетический анализ выявил наличие семи пластотипов (вариантов пластидной ДНК) на территории Южной Сибири. В пределах на хр. Хамар-Дабан и Приморского хребта выявлено пять пластотипов, на территории Западного Саяна было выявлено два пластотипа.

Филогенетический анализ на основе маркеров пластидной ДНК (*trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*) с привлечением референтных видов выявил полифилию южносибирских популяций *A. altaica*, что указывает на их двойственное происхождение, вероятно, путем гибридизации одной из линий с близкородственными таксонами. Все идентифицированные пластотипы (P1–P7) разделялись на две группы. Так, пластотип P1 с хр. Хамар-Дабан формировал пластогруппу с выявленными пластотипами с Западного Саяна, что свидетельствует об их едином происхождении. Вероятно, именно эта пластогруппа является аутентичной генетической линией *A. altaica*. Остальные выявленные у *A. altaica* пластотипы (P2–P5) группировались с пластотипами близкородственных видов: *A. reflexa* и *A. quinquefolia*.

Географическое распределение пластотипов и результаты AMOVA указывают на значительную генетическую дифференциацию выявленных популяций ($\Phi_{ST} = 0,81161$). Результаты PCoA и AMOVA показали, что наиболее вероятной филогеографической структурой вида на хр. Хамар-Дабан является разделение на шесть групп популяций в составе трех географических надгрупп: западной, центральной и восточной.

Молекулярно-генетический анализ ITS1-ITS2 выявил наличие внутригеномного полиморфизма ITS-региона у *A. altaica*. У особи, принадлежащей к пластогруппе PG1, степень внутригеномного полиморфизма оказалась выше, чем у особи, принадлежащей к пластогруппе PG2. Однако филогенетический анализ показал, что все последовательности ITS1-ITS2 *A. altaica* формировали отдельную

монофилетическую кладу, за исключением одного клона, который не группировался с остальными последовательностями *A. altaica*. Для уточнения филогенетических отношений южносибирских популяций *A. altaica* необходимо включение в анализ большего числа особей, принадлежащих к различным пластограммам.

4. Рекомендации по возможности практического использования полученных результатов для сохранения генофонда вида

Исходя из результатов настоящей работы, предлагается вводить в культуру растения *A. altaica* из различных филогеографических групп популяций, комбинируя особи с западного, центрального и восточного участка хр. Хамар-Дабан, несущие различные пластотипы для создания стабильных, генетически разнообразных искусственных популяций с целью сохранения генофонда вида.

Список используемых источников

1. Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // *Phytochemical Bulletin*. – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
2. Phylogenetic relationships of *Clematis* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. / Miikeda O. [et al.] // *Botanical Journal of the Linnean Society*. – 2006. – Vol. 152. – No. 2. – P. 153-168.
3. Protopopova M.V. *Eranthis* Salisb. (Ranunculaceae) in South Siberia: Insights into Phylogeography and Taxonomy / M.V. Protopopova, V.V. Pavlichenko // *Diversity*. – 2022. – Vol. 14. – P. 779.
4. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. / P. Taberlet [et al.] // *Plant molecular biology*. – 1991. – Vol. 17. – P. 1105-1109.
5. Utelli A. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae) / A. Utelli, B. Roy, M. Baltisberger // *Plant Systematics and Evolution*. – 2000. – Vol. 224. – P. 195–212.
6. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications* / M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White Eds. – San Diego, California, USA: Academic Press, 1990. – P. 315–322.

7. Предполагаемое использование результатов, в том числе в учебном процессе:

Полученные результаты могут быть использованы для разработки эффективных мер по сохранению и восстановлению популяций *Anemone altaica*, а также для создания интродукционных популяций вида. Результаты также будут использованы для подготовки выпускной квалификационной работы руководителя проекта.

8. Перечень публикаций^(**) по результатам работы (статьи, доклады) с приложением оттисков или рукописей, направленных в печать:

1. Protopopova M., Nelyubina P., Pavlichenko V. Current Phylogeographic Structure of *Anemone altaica* (Ranunculaceae) on the Khamar-Daban Ridge Reflects Quaternary Climate Change in Baikal Siberia / M. Protopopova, P. Nelyubina, V. Pavlichenko // Quaternary. – 2025. – Vol. 8. – P. 1-25. <https://doi.org/10.3390/quat8020000>. Scopus, Web of Science.

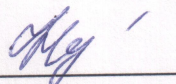
2. Нелюбина П.Е. Филогеографическая структура неморального реликта *Anemone altaica* (Ranunculaceae) на хребте Хамар-Дабан / П.Е. Нелюбина, В.В. Павличенко, М.В. Протопопова [и др.] // «Современные тенденции развития науки и мирового сообщества в эпоху цифровизации» : Сборник материалов XXX Международной научно-практической конференции. Москва, 30 января 2025 г. – 2025. – С. 132-136. – DOI: 10.26118/8247.2025.61.28.005 <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=80575991>. РИНЦ

3. Нелюбина П.Е. Филогеографическая структура *Anemone altaica* (Ranunculaceae) на территории Байкальской Сибири / П.Е. Нелюбина, В.В. Павличенко, М.В. Протопопова // «Современные проблемы экологии, гидробиологии и байкаловедения». Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Иркутск, 15-18 апреля 2025 г. [в печати]. РИНЦ

4. Нелюбина П.Е. Определение пространственно-генетической структуры биотехнологически перспективного растения *Anemone altaica* (Ranunculaceae) на территории Байкальской Сибири с целью сохранения генофонда вида / П.Е. Нелюбина, В.В. Павличенко, М.В. Протопопова // Научные исследования и разработки к внедрению в АПК : Сборник материалов национальной научно-

практической конференции молодых ученых с международным участием.
Молодежный, 20-21 марта 2025 г. – [в печати]. РИНЦ

Исполнитель НИР по гранту


(подпись)

Нелюбина П.Е.
(Ф.И.О.)

* Аннотированные отчеты будут размещены на сайте ИГУ

** Учитываются только публикации со ссылкой на финансовую поддержку ИГУ