

## АННОТАЦИЯ

докторской диссертации на тему: «Изучение состояния популяций редкого и эндемичного вида Миндаля Ледебуря (*Amygdalus ledebouriana* Schltdl.) в условиях Восточного Казахстана» представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «БД061300-Геоботаника»

### ОРАЗОВА АЙДЫНА ЕРҒАЛИҰЛЫ

**Актуальность диссертационной работы.** Согласно Концепции развития особо охраняемых природных территорий Республики Казахстан до 2030 года наиболее эффективной мерой по сохранению эндемичных и редких видов кустарниковых растений является создание сети особо охраняемых природных территорий. Согласно новому Экологическому кодексу Республики Казахстан, принятому 2 января 2021 года, особое внимание уделяется охране генофонда эндемичных растений.

Однако комплексных исследований с популяционными характеристиками, такими как возрастной состав и генетическое разнообразие эндемичных и редких видов кустарниковых растений, не проводилось. Согласно Красной книге Казахстана и Постановлению Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года № 1034 «Об утверждении перечня редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных», одним из редких и эндемичных видов растений Восточного Казахстана является *A. ledebouriana*, относящийся к семейству Rosaceae Juss.

Актуальностью научно-исследовательской работы определяется тем, что произведено комплексное изучение популяций этого вида растения, в особенности его строения, определения уровня генетического разнообразия с использованием современных молекулярно-генетических методов и сохранения с помощью биотехнологических методов, которые ранее не проводились в Республике Казахстан.

**Объект исследования** Редкий и эндемичный вид растения — миндаль Ледебуря *Amygdalus ledebouriana* Schlecht.

**Цель работы:** Изучение популяций редкого и эндемичного *A. ledebouriana*, произрастающего в условиях Восточного Казахстана, на основе современного состояния, морфологических отличий и показателей генетического разнообразия, а также сохранение биотехнологическими путями.

#### **Научно-исследовательские задачи:**

1. Изучение особенностей популяций редкого и эндемичного вида растения *A. ledebouriana* в условиях Восточного Казахстана, также его охранного статуса, ареала распространения и флористического состава сообщества;
2. Изучение структурных особенностей популяций *A. ledebouriana* и сравнение морфологической изменчивости высоты кустарников между популяциями на территории Восточного Казахстана.
3. Анализ родственных видов рода *Prunus* на основе нуклеотидных последовательностей ДНК-маркеров ITS и *matK* и определение местоположения *A. ledebouriana* на филогенетическом древе;
4. Сравнение популяций видов растений и оценка генетических особенностей секций *Chamaeamygdalus* на основе ДНК-маркеров SSR;
5. Разработка регламента получения устойчивых асептических каллусных клеток на тканевом уровне растения *A. ledebouriana* биотехнологическим путем (*ex situ*) в условиях *in vitro*;
6. Предложить меры по сохранению редкого и эндемичного вида *A. ledebouriana* на особо охраняемых природных территориях Восточного Казахстана.

#### **Теоретико-методологическая база исследования:**

Называемое растение *A. ledebouriana* впервые было выявлено и описано немецким ботаником и микологом Дирихом Францем Леонардом фон Шлехтендалем. Первые

сведения об этом виде были опубликованы в 1854 г. Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal (Schlecht.), *Abhandlungen der naturforschenden gesellschaft*, Band 2. Вид описан в 10 томе «Флоры СССР», 4 томе «Флоры Казахстана» и первой части «Иллюстрированного определителя растений Казахстана». *A. ledebouriana* занесена в Красную книгу Казахстана как редкий и исчезающий вид растений. Во всех упомянутых выше источниках *A. ledebouriana* выделяется как отдельный вид растений с эндемичными признаками.

В изданиях флоры Союза Советских Социалистических Республик (СССР) 1941 г. и Казахстана 1961 г. (С.К. Черепанов, С.А. Абдулина) семейство миндальных определяется как отдельное самостоятельное семейство, также атлас флоры Российской Федерации «Плантариум» ([www.plantarium.ru](http://www.plantarium.ru)) видов растений и система онлайн-идентификации это подтверждают. Главной отличительной чертой миндальных является наличие сухого и костянского плода. Наиболее полные сведения о видовом разнообразии растений хребта Тарбагатай приводит Е.Ф. Степановой «Флора и растительность хребта Тарбагатай».

Исследования многих зарубежных ученых, Ма Яна и Си Хуа, позволили провести исследования генетического разнообразия миндаля с использованием молекулярных маркеров AFLP и SSR.

Изучение жизненных циклов растения *A. ledebouriana* определяли по методике Уранова. Идентификацию видов в фитоценозах проводились в соответствии с «Флорой Казахстана» (1956-1966, 1999-2002), «Флора Сибири» (1982-1993), «Определитель растений Средней Азии» (1968-1994). Определение географического распространения местообитаний растения *A. ledebouriana* на территории ВКО и создание картосхемы выполнено в системе ArcGIS. Обработка статистических данных выполнено с помощью методов Г.Ф. Лакин и Н. Л. Удольская, Зайцев Г. Н., а также с помощью приложений Statistica 6.1 и Microsoft Office Excel 2007.

Метод исследования генетической структуры выполнены с помощью ДНК-маркеров ITS и *matK*., также использовался метод исследования генетического разнообразия популяций с использованием ДНК-маркера SSR. Выделение геномной ДНК из листьев миндаля проводили по протоколу СТАВ (Doyle, 1991). Популяционная изменчивость выявлялось программное обеспечение GenAlex, версия 6.5 (Peakall et al., 2012), программное обеспечение R-studio (версия 1.3.1093), веб-инструмент ClustVis (Metsalu & Vilo, 2015), PopGene, версия 1.32 (исследовано Yeh et al.). др., 1997), программное обеспечение STATISTICA 10.0. Кластеризация проводилась с использованием невзвешенного усреднения парных групп (UPGMA) (2014).

Во всех экспериментах использовали 0,7% агаровую гелевую среду MS с 3-6% сахарозой в соответствии Мурасего (1977). Культивирование клеток проводилось, согласно методике Бутенко Р.Г., биотехнология культивирования клеток высших растений *in vitro* (1999). Морфологическая характеристика каллуса описана по методикам Тимофеева и Румянцевой (2012).

**Личный вклад автора в получение научного результата.** Автор диссертационной работы в полной мере внес свой вклад в определении цели работы, постановки задачи исследования, а также в выполнении экспериментов, обобщение и обработку полученных данных.

**Научная новизна и значимость диссертационной работы.** На основе комплексного изучения особенности редких и эндемичных популяций *A. ledebouriana*, получены новые сведения, позволяющие предложить меры по сохранению изучаемых популяций *A. ledebouriana*.

Популяции *A. ledebouriana*, произрастающего хребтах Алтая и Тарбагатай, отличаются относительно высоким уровнем генетического разнообразия. Плоды, собранные из популяций, переданы в «Банк семян природной флоры Казахстана» Института ботаники и фитоинтродукции с целью сохранения генофонда вида растения *A. ledebouriana* в течение длительного времени, и был получен акт передачи.

Информация о нуклеотидной последовательности *A. ledebouriana*, полученная из биологических материалов на основе ДНК-маркеров ITS и *matK*, была загружена в международную базу данных NCBI под номерами MN335241.1, MN453776.1 и MN453777.1, полученные результаты вносят большой вклад в изучение молекулярной систематики секция *Chamaeamygdalus*.

Методика получения стабильных асептических каллусных клеток *A. ledebouriana* в условиях *in vitro* из эмбрионального материала и химический состав оптимальной питательной среды, концентрация экзогенных фитогормонов будут использованы в дальнейшем для криоконсервации и микроклонального размножения тканей редких и эндемичных видов растений. Впервые определен оптимальный состав и регламент питательной среды с концентрацией ИМК 1 мг/л, ГК и 6-БАП 0,5 мг/л для получения стабильных асептических каллусных клеток редкого и эндемичного растения *A. ledebouriana*. Получен патент на полезную модель химического состава питательной среды.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

– Изолированное географическим положением и возрастающее антропогенное влияние в горных районах Восточного Казахстана создает угрозу исчезновения эндемичного вида, занесенного в Красную книгу *A. ledebouriana*.

– *A. ledebouriana* отличается двумя крупными ареалами в горных системах Алтая и Тарбагатая Восточного Казахстана: Нарынская популяция горного Алтая, состоящая из двух ценопопуляций с 250 видами ценофлоры; популяция Калбинского хребта горного Алтая, состоящее из двух ценопопуляций со 153 видами ценофлоры; популяция Тарбагатайского хребта, состоящая из трех ценопопуляций с 376 видами ценофлоры; На мелкосопочнике Ульбинского хребта горного Алтая выявлена популяция *A. nana* представителя секции *Chamaeamygdalus*, морфологически сходная с *A. ledebouriana*, ценофлора которой насчитывает 150 видов.

– Установлено, что статистическая разница в высоте растений между тремя горными популяциями *A. ledebouriana* связана с расположением над уровнем моря. Статистически значимое различие между популяциями было подтверждено по признаку высоты растений ( $P$ -значение =  $2,3e-15$ ). Т- тест показал, что все три горные популяции *A. ledebouriana* имели значительные показатели по высоте растений по сравнению с популяциями *A. nana* ( $P < 0,0001$ ). В связи с географическим положением между представителями двух морфологически схожих видов секции *Chamaeamygdalus* горного вида *A. ledebouriana* и степного *A. nana* выявлена существенная разница в высоте растений.

– На основе ДНК-маркеров ITS и *matK* определено филогенетическое положение *A. ledebouriana* роде *Prunus* и то, что *A. nana* генетически близок к *A. ledebouriana*.

– На основе SSR ДНК-маркеров определены генетические структурные различия между популяциями представителей *A. ledebouriana* и *A. nana* секции *Chamaeamygdalus* в зависимости от их географического положения, выявлена общая генетическая изменчивость видов растений *A. ledebouriana* 73% внутри популяций и 27% между популяциями.

– Получена оптимальная концентрация питательных веществ для каллуса образования с добавлением экзогенных фитогормонов таких как ИМК 1 мг/л, ГА и 6-БАП 0,5 мг/л. Относительная частота образование асептических каллусных клеток в условиях *in vitro* увеличивается на  $7,79 \pm 0,46\%$  на незрелых эмбрионах эксплантатах без зародышевого корня.

#### **Заключение.**

1. Определен состав флоры растительных сообществ, в которых присутствуют популяции редкого и эндемичного растения *A. ledebouriana* в условиях Восточного Казахстана, и обнаружены три новые популяции *A. ledebouriana*. Популяции выделяются двумя крупными ареалами распространения в горных системах Алтая и Тарбагатая: Нарынская хребтовая популяция Алтая (3-КА), состоящая из двух ценопопуляций с 250 видами ценофлоры; популяция Калбинского хребта Алтая, состоящее из двух

ценопопуляций с ценофлорой 153 вида (2-КО); Выявлена популяция Тарбагатайского хребта Тарбагатайских гор, состоящая из трех ценопопуляций с 376 видами ценофлоры.

2. В популяциях Тарбагатая, Калбы и Нарын преобладают молодые генеративные и взрослые генеративные растения, что свидетельствует об обновлении этих популяций. Ульбинская популяция *A. nana* содержит представителей старых генеративных и субсенильных растений. Наибольшая высота растений отмечена у популяции 3-КА ( $2,09 \pm 0,06$  м), являющейся самой высокогорной популяцией над уровнем моря. Т-тест ( $P < 0,0001$ ) подтвердил статистически значимую разницу между популяциями по высоте растений (значение  $P = 2,3e-15$ ). Уровень этого признака у растений зависел от расположения над уровнем моря, и наименьшая высота для образцов *A. ledebouriana* была выше 1,7 м, а наибольшая высота для образцов растений *A. nana* была ниже 1,5 м.

3. Оценили образцы двух видов с использованием 19 полиморфных SSR-локусов для сравнения популяций видов растений секции *Chamaeamygdalus* на основе SSR-ДНК-маркеров. Было построено филогенетическое дерево UPGMA из *A. ledebouriana* (1-UR, 2-КО, 3-КА) 60 образцов и 20 образцов *A. nana* (4-UK) которое четко разделяло между собой. Этот результат также подтверждается графиком PCoA, где PC2 (41,2%) отделяет образцы 4-UK от 1-UR и 2-КО, а PC1 (49,1%) отделяет 3-КА от трех других популяций. Кластеризация показывает, что существует низкий уровень смешения между популяциями, что подтверждает модель «изоляции расстоянием». Оценка генетического индекса гетерозиготности (индекса Нея) показывает, что наибольшее генетическое разнообразие имеет *A. nana* (0,606), а самый низкий показатель зафиксирован в популяции 3-КА (0,449). Возможно, большая высота является достаточно сильным фактором окружающей среды, чтобы негативно повлиять на генетическую изменчивость *A. ledebouriana*. Тем не менее, отделение 3-КА от 1-UR и 2-КО подтверждает высокий уровень генетической изменчивости внутри вида. Популяция 4-UK сформировала отдельный кластер, и только одна выборка из этой популяции (4-UK\_07) плотно сгруппировалась с выборками из популяции 3-КА. Оценка структуры популяции с использованием пакета STRUCTURE показала, что популяции *A. ledebouriana* и *A. nana* начали разделяться на шагах  $K=3$  и  $K=4$ , что еще раз указывает на то, что *A. ledebouriana* и *A. nana* являются двумя разными видами. Оценка образцов в четырех кластерах при  $K = 4$  показала низкий уровень примеси, что подтверждает модель изоляции расстоянием с ограниченным потоком генов между популяциями. Так, анализ высоты растений и использование SSR-маркеров *A. nana* и *A. ledebouriana* и был успешно использован для изучения генетического разнообразия и популяционной структуры эндемичного вида *A. ledebouriana*.

4. По топологии дендрограммы филогенетической генеалогии по ДНК маркеру ITS и *matK* делится на III больших кластера. Кластер I объединяет три небольших подкластера. Филогенетический анализ в значительной степени соответствовал эволюционным исследованиям секции *Chamaeamygdalus*. По результатам молекулярно-морфологических исследований установлено, что *A. ledebouriana* генетически близка к *A. nana*.

5. В ходе создания протокола получения устойчивого асептических каллусных клеток растения *A. ledebouriana* в условиях *in vitro* на тканевом уровне биотехнологическим методом (*ex situ*) наблюдалась высокая скорость образования каллуса в культуральной среде с добавлением с фитогормонами, такими как Кинетин, Бензиламинопурин (6-БАП), Гиббереллиновая кислота (ГК), Индоллил-3-масляная кислота (ИМК). Снижение концентрации кинетина до 0,04 мг/л привело к снижению интенсивности, но увеличению частоты образования на  $72,00 \pm 5,66$  % и увеличению массы. Увеличение концентрации Кинетина приводило к снижению эффективности клеточного деления. Частота каллус образования варьировала от  $22,50 \pm 3,54$  % до  $31,25 \pm 2,95$  %. Средняя концентрация 0,5 мг/л фиторегуляторов, таких как ГК и 6-БАП, дала высокую частоту от  $65,38 \pm 5,44$  % до  $72,00 \pm 5,66$  % у обоих типов эксплантов. Увеличение концентрации ИМК до 1 мг/л увеличило частоту с  $46,00 \pm 2,83$  % до  $72,00 \pm 5,66$  %. Стабильный каллус формировался на 15-й день с небольшим некрозом тканей в этих средах. Таким образом частота каллус

образования в условиях *in vitro* составила  $38,98 \pm 6,01$  % для первого типа эксплантов (цельный зародыш) и  $46,78 \pm 6,47$  % для второго типа эксплантов (эмбрион без зародышевого корня). Это на  $7,79 \pm 0,46$  % больше, чем для второго типа эксплантов. Удаление зародышевого корня у эмбриона тормозит органогенез корня и первого побега, что позволяет накапливать питательные вещества для роста каллусной массы.

6. Для решения основных задач в области охраны и сохранения эндемичных, редких и исчезающих популяций *A. ledebouriana* в Восточном регионе Казахстана особое значение имеют комплексные исследования такие как изучение ареала распространения, флористический состав растений и д.р.

**Апробация и одобрение результатов работы.** Результаты и выводы исследования представлены в 11 работах, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных комитетом по контролю в сфере образования и науки Республики Казахстан, 3 статьи в материалах международных научно-практических конференций:

**В журналах, включенных в базы данных Scopus и Web of Science:**

1. Оразов А. и соавт. Индукция каллуса 6-БАП и ИМК как способ сохранения *Prunus ledebouriana* (Rosaceae) и эндемичного растения Алтая и Тарбагатая Восточного Казахстана // Журнал биологического разнообразия Biodiversitas. - 2022. - Вып. 23. - нет. 6. (Q-3, перцентиль-44) DOI: 10.13057/biodiv/d230645

2. Оразов А. и соавт. Флора, сопровождающая *Prunus ledebouriana* (Schltdl.) YU Yao в Тарбагатайском государственном национальном парке в Казахстане //Международный журнал биологии и химии. - 2021. - Вып. 14. – нет. 1. - С. 21-34.<https://doi.org/10.26577/ijbch.2021.v14.i1.02>