

УДК 575.1/.2:574.2; 581.5

**Александр Петрович Колбас¹, Наталия Михайловна Матусевич²,
Наталия Викторовна Савина³, Светлана Владимировна Кубрак⁴,
Марина Викторовна Левковская⁵, Светлана Михайловна Токарчук⁶,
Александр Владимирович Кильчевский⁷**

¹канд. биол. наук, доц., нач. Центра экологии

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

²канд. биол. наук, доц., доц. каф. ботаники и экологии

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

³научн. сотрудник лаборатории экологической генетики и биотехнологии

Института генетики и цитологии НАН Беларуси

⁴канд. биол. наук., ведущий науч. сотрудник лаборатории экологической генетики и биотехнологии

Института генетики и цитологии НАН Беларуси

⁵ст. преподаватель каф. ботаники и экологии

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

⁶канд. геогр. наук, доц., доц. каф. географии и природопользования

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

⁷д-р биол. наук, проф., действительный член НАН Беларуси,

науч. рук. лаборатории экологической генетики и биотехнологии

Института генетики и цитологии НАН Беларуси

**Aliaksandr Kolbas¹, Nataliya Matusevich², Nataliya Savina³, Svyatlana Kubrak⁴,
Maryna Levkovskaya⁵, Svyatlana Tokarchuk⁶, Aliaksandr Kilchevsky⁷**

¹PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Head of Ecology Center of Brest State A. S. Pushkin University

²PhD in Biological Sciences, Associate Professor,

Associate Professor of the Department of Botany and Ecology of Brest State A. S. Pushkin University

³Research Associate of the Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology

of Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

⁴PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology

of Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

⁵Senior Lecturer of the Department of Botany and Ecology of Brest State A. S. Pushkin University

⁶PhD in Geographical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Geography

and Environmental Management Ecology of Brest State A. S. Pushkin University

⁷Doctor of Biological Sciences, Professor, Full Member of the National Academy of Sciences of Belarus,

Scientific Director of the Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology

of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

e-mail: ¹kolbas77@mail.ru

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ОХРАНЯЕМЫХ РАСТЕНИЙ БРЕСТСКОГО РЕГИОНА*

Приводятся результаты работы по мониторингу 9 видов охраняемых растений в Брестском регионе с использованием современных экологических, картографических и генетических подходов. Генетическая информация, полученная в ходе проведения экологического мониторинга редких и охраняемых растений и представленная в виде QR-кодов была использована при разработке и составлении картографического веб-приложения для предоставления комплексной информации.

Ключевые слова: банк ДНК, баркодирование, Брестский регион, Красная книга, мониторинг, охраняемые растения, популяция, веб-приложение, QR-код.

Ecological and Genetic Inventory of Certain Protected Plant Species in the Brest Region

The paper presents the results of monitoring 9 species protected plants in the Brest region using modern ecological, cartographic and genetic approaches. Genetic information obtained in the course of environmental monitoring of rare and protected plants and presented in the form of QR codes was used in the development and compilation of a cartographic web-application to provide complex information.

Key words: DNA bank, barcoding, Brest region, Red Book monitoring, protected plants, population, web application, QR code.

*Работа выполнена в рамках проекта «Изучение биоэкологических особенностей популяций редких растений в Брестском регионе, мониторинг, отбор образцов и разработка картографических веб-приложений» (№ госрегистрации 20180768).

Введение

Биологическое разнообразие живых организмов – это важнейший фактор функционирования экосистем. Своевременное принятие соответствующих мер по инвентаризации и охране позволяет сохранить биологическое разнообразие флоры в Брестском регионе, который характеризуется древнейшим видовым составом природных сообществ, а также наибольшим разнообразием географического и генетического элементов флоры в Республике Беларусь. Охраняемые виды растений, вследствие сниженной адаптационной способности, требуют особого внимания, всестороннего изучения, регулярного мониторинга природных популяций. Вместе с тем именно редкие виды представляют собой наиболее ценную и разнообразную составляющую биологических ресурсов. Инвентаризация биологического разнообразия флоры представляет собой сложную задачу, учитывая большое количество видов дикорастущих растений. В этом случае получение и работа с информацией об изучаемых объектах, представленной в цифровом виде, является наиболее эффективным подходом. Веб-картографирование популяций редких растений и ДНК-штрихкодирование особенно полезны при инвентаризации редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений, так как позволяют проводить популяционный и генетический скрининг видового разнообразия флоры без изъятия растения из естественной среды обитания.

Оценка современного состояния популяций редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений создает основу для изучения динамики популяционных процессов, позволяет прогнозировать перспективы конкретных популяций и обосновывать меры по их сохранению [1].

Цель работы – произвести инвентаризацию отдельных видов охраняемых растений в Брестском регионе с использованием современных экологических, картографических и генетических подходов.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования данной работы являются представители 9 редких видов растений, которые внесены в основной список 4-го издания Красной книги Республики Беларусь [2]: пихта белая (*Abies alba* Mill.), зубянка клубненосная (*Dentaria bulbifera* L.), омела австрийская (*Viscum austriacum* Wiesb.), кадило сарматское (*Melittis sarmatica* Klok.), венерин башмачок настоящий (*Cypripedium calceolus* L.), тайник яйцевидный (*Listera ovata* (L.) R. Br.), любка зеленоцветковая (*Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb.), пальчатокоренник майский (*Dactylorhiza majalis* (Reichenb. F.) P. F. Hunt et Summerhayes), осока войлочная (*Carex tomentosa* L.) (таблица 1). Были определены координаты, численность популяций, занимаемая площадь, фенофаза, размеры. Сделаны ботанические и геоботанические описания популяций растений, получены фотографии объектов и окружения.

Собранный растительный материал (образцы листовых эксплантов) был передан в Республиканский банк ДНК (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси). Тотальная ДНК из растительного материала выделена коммерческим набором *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Германия). ПЦР проведена в финальном объеме 8 мкл; смесь для амплификации включала готовый буфер для проведения ПЦР *Quick-load Taq 2X Master Mix* (ОДО «Праймтех», Беларусь), прямой и обратный праймеры в конечной концентрации 0,3 пмоль/мкл, воду, 1 мкл матрицы ДНК в концентрации 10 нг/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере *C1000 Touch Thermal Cycler* (BioRad, США); продукты амплификации очищали с помощью ферментов *Exonuclease I* и *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific, США). Терминирующая реакция проведена с использованием коммерческого набора *Brilliant Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Nimagen, Ни-

дерланды) с последующей очисткой продукта реакции этанолом. Определение нуклеотидной последовательности выполнено на автоматическом генетическом анализаторе *ABI 3500 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, США). Хроматограммы сиквенсов проанализированы в программе *ChromasPro 13.3*; для одного вида анализировали по три индивидуальных растения, для каждого ДНК-штрихкода получено по четыре хроматограммы – три с прямым и одна с обратным праймером. Выравнивание последовательностей выполнено в программах *Vector NTI* (модуль *Contig Express Project*) и *MEGA 4* с целью получения общей (консенсусной) маркерной последовательности. Консенсусные последовательности сравнивали с последовательностями ДНК аналогичных видов, хранящимися в международных базах данных *NCBI BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) [3] и *BOLD* (*Barcode of Life Data Systems*) [4].

Результаты исследований и их обсуждение

Были указаны и уточнены местонахождения 9 видов редких растений, произрастающих на территории Брестского региона (таблица 1). Максимальная численность особей среди изученных популяций охраняемых видов была отмечена для пихты белой (*Abies alba* Mill.), однако количество взрослых репродуктивных деревьев не превышало 20 единиц. Среди травянистых растений максимальным числом особей в популяции характеризовалось кадило сарматское (*Melittis sarmatica* Klok.), а минимальным – любка зеленоцветковая (*Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb.), однако в целом отмечается низкая численность большинства исследованных популяций. В таксономическом отношении наиболее представлено в исследовании семейство Орхидные (*Orchidaceae* Juss.) (4 вида). Анализ размеров растений показал, что практически все виды, достигшие дефинитивных форм, характеризуются значениями в рамках референсных [2]. Популяции охраняемых растений были зарегистрированы преимущественно в лиственных лесах, за исключением омелы австрийской (*Viscum austriacum* Wiesb.), произрастающей на сосне обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), и осоки войлочной (*Carex tomentosa* L.) – в прибрежной полосе водоохранной зоны. Популяция тайника яйцевидного (*Listera ovata* (L.) R. Br.) описана в антропогенном биотопе – рудеральном месте обитания.

Отмечается слабая жизненность и высокая степень угрозы для популяций любки зеленоцветковой (*Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb.), тайника яйцевидного (*Listera ovata* (L.) R. Br.) и осоки войлочной (*Carex tomentosa* L.) как вследствие естественных сукцессионных процессов, так и антропогенного прессинга.

С целью повышения точности пространственной координации изучаемых мест произрастания были использованы современные методы наземной топографии и геоботаники: производилась маркировка на местности объектов привязки, далее происходила привязка исследуемых растений либо их популяций к объектам-маркерам, определялась площадь. Для реализации описанных выше топографических задач использовался GPS-навигатор Garmin eTrex 30 (определение азимута направления) и электронный тахеометр CST/berger Electronic Total Station CST305R.

При веб-картографировании популяций редких растений в Брестском регионе использовали шаблоны карт историй «Story map tour» облачной платформы картографирования ArcGIS Online. Особенностью данного приложения является использование сочетания интерактивной карты с информационной панелью, включающей фотографический материал, название и описание точки на карте, ботаническое и геоботаническое описание, QR-коды для предоставления генетической информации.

Таблица 1. – Виды охраняемых растений Брестского региона, включенные в исследование

№	Вид (рус./лат.)*	Категория охраны	Число особей, шт.	Средняя высота, см
Сосновые (<i>Pinaceae</i> Lindl.)				
1	пихта белая / <i>Abies alba</i> Mill.	I	Площадь 1,2 га	**
Крестоцветные (<i>Cruciferae</i> Juss.)				
2	зубянка клубненосная / <i>Dentaria bulbifera</i> L.	IV	23	45,7
Ремнецветные (<i>Loranthaceae</i> Juss.)				
3	омела австрийская / <i>Viscum austriacum</i> Wiesb.	II	12	**
Губоцветные (<i>Labiatae</i> Juss.)				
4	кадило сарматское / <i>Melittis sarmatica</i> Klok.	III	26	32,8
Орхидные (<i>Orchidaceae</i> Juss.)				
5	венерин башмачок настоящий / <i>Cypripedium calceolus</i> L.	III	10	20,7
6	Тайник яйцевидный <i>Listera ovata</i> (L.) R. Br.	IV	25	36,3
7	любка зеленоцветковая / <i>Platanthera chlorantha</i> (Cust.) Reichenb.	IV	7	25,8
8	пальчатокоренник майский / <i>Dactylorhiza majalis</i> (Reichenb. F.) P. F. Hunt et Summerhayes	III	10	21,8
Осоковые (<i>Cyperaceae</i> Juss.)				
9	осока войлочная / <i>Carex tomentosa</i> L.	I	18	42,0

Примечание – * – названия даны по [2; 5], ** – нет данных.

Для всех растений было выполнено двух-четырёхлокусное генотипирование по ядерному маркеру *ITS2* и хлоропластным маркерам *rbcL*, *psbA-trnH*, *matK* [4; 6; 7]. Для всех маркеров продемонстрирована хорошая воспроизводимость результатов амплификации; маркеры *ITS2* и *rbcL* лучше отвечали требованию «качество сиквенсов». Всего получена 31 консенсусная нуклеотидная последовательность, при этом их сходство с аналогичными последовательностями из международных баз данных составило 98–100 %. У четырех видов было выявлено сходство менее 100 % (пихта белая, зубянка клубненосная, кадило сарматское, осока войлочная).

Для ряда изучаемых нами редких видов растений в международных базах еще не депонированы интересующие нас видовые маркерные последовательности, что исключает проведение сравнительного анализа. Так, для омелы австрийской (*Viscum austriacum* Wiesb.) в базе *NCBI* из четырех последовательностей представлена лишь одна *ITS*. Именно отсутствие эталонных штрих-кодов, полученных от таксономически подтвержденных образцов из достоверных источников и подтвержденных, в свою очередь, доступными онлайн-хроматограммами, является одним из ограничений применения метода ДНК-штрихкодирования для видовой идентификации [8].

Результаты проделанной работы в целом подтверждают эффективность использования выбранных нами маркеров в качестве ДНК-штрихкодов. Дальнейшая работа по видоидентификации редких растений будет базироваться на комбинировании всех

маркеров, отдавая предпочтение при первичном скрининге маркерам *ITS2* и *rbcL*. Результатом таксономической идентификации растений будет являться собственная база референсных последовательностей ДНК-штрихкодов.

Стандартный формат представления последовательностей, полученных в результате секвенирования, – буквенный (в нашем исследовании для отдельных видов до 900 п. н.), что очень неудобно при хранении и передаче данных. С целью сжатия информации, полученной в ходе ДНК-баркодирования, предложено использовать двумерные штрихкоды – QR-код [9] (рисунок 1). Подобный формат представления данных может быть актуален при разработке картографических веб-приложений. Для 9 изученных растений нами сгенерированы QR-коды маркерной последовательности *ITS2* (таблица 2).

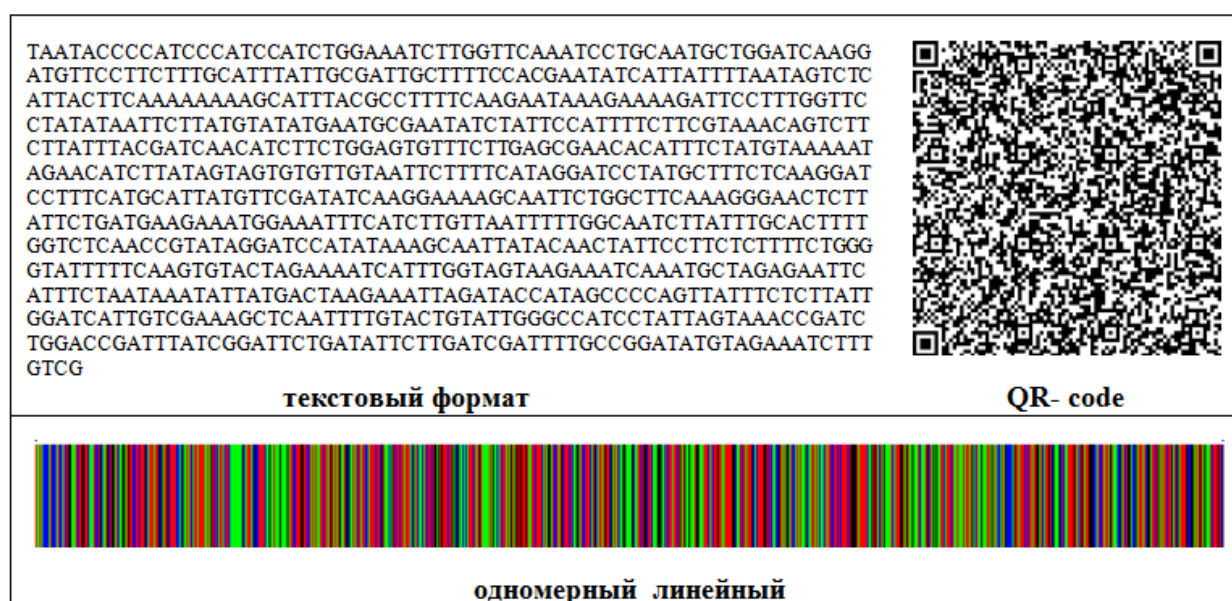


Рисунок 1. – Маркерная последовательность *matK* для вида венерин башмачок настоящий (*Cypripedium calceolus* L.)

Последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров *ITS1* и *ITS2* в молекулярной филогенетике изучают достаточно часто, и область *ITS2* считается подходящим маркером для видоидентификации и таксономической классификации. Последовательность отличается короткой длиной, успешной амплификацией с универсальными праймерами, высоким качеством сиквенса и высокой межвидовой вариабельностью [10].

Генетическая информация, полученная в ходе проведения экологического мониторинга отдельных видов редких и охраняемых растений Брестского региона, была использована при разработке и составлении картографического веб-приложения для предоставления комплексной информации об охраняемых объектах: ботаническая, геоботаническая, топографическая, генетическая характеристики.

Было создано картографическое веб-приложение «Редкие растения Брестского региона», которое включает 9 видов растений, 10 мест произрастаний и 9 QR-кодов (рисунок 2).

Таблица 2. – QR-коды маркерной последовательности *ITS2*

QR-код (for mobile applications)			
вид растения длина, п. н. сходство с NCBI, %	пихта белая 247 99	зубянка клубненосная 191 99	омела австрийская 238 100
QR-код (for mobile applications)			
вид растения длина, п. н. сходство с NCBI, %	кадило сарматское 222 98	венерин башмачок настоящий 272 100	тайник яйцевидный 255 100
QR-код (for mobile applications)			
вид растения длина, п. н. сходство с NCBI, %	любка зеленоцветковая 243 100	пальчатокоренник майский 245 100	осока войлочная 231 99

Результаты исследования подтверждены актами внедрения и паспортом коллекции образцов биологического материала. Веб-приложение может использоваться научными сотрудниками, специалистами лесоводческих и природоохранных организаций, преподавателями и студентами естественнонаучных специальностей.

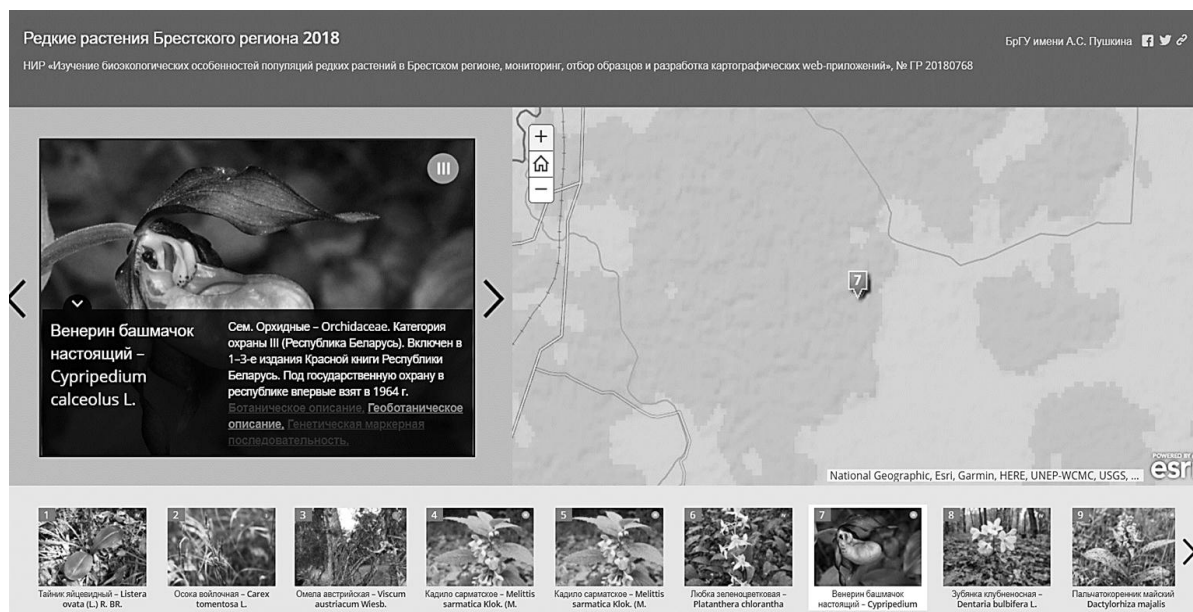


Рисунок 2. – Внешний вид картографического веб-приложения

Заключение

Таким образом, эколого-генетическая инвентаризация 9 редких видов растений Брестского региона позволила уточнить их местонахождение, сделать точную топографическую привязку; провести экологический мониторинг состояния популяций; выполнить ДНК-штрихкодирование; уточнить таксономическую принадлежность с использованием международных ресурсов, визуализировать полученные результаты в веб-приложении. Одним из важных результатов проведенной нами таксономической идентификации растений будет создание региональной библиотеки референсных последовательностей ДНК с целью аккумуляции, структурирования и анализа генетической информации по охраняемым видам растений Беларуси.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вознячук, И. П. Мониторинг охраняемых растений и грибов / И. П. Вознячук, Л. В. Семеренко // Мониторинг растительного мира в Республике Беларусь: результаты и перспективы / И. В. Бордок [и др.]; под общ. ред. А. В. Пугачевского, А. В. Судника. – Минск : Беларус. навука, 2019. – С. 100–140.
2. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский (пред.) [и др.]. – 4-е изд. – Минск : Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. – 448 с.
3. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource] : The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>. – Date of access: 24.05.2021.
4. BOLD Systems [Electronic resource] : The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). – Mode of access: <https://www.boldsystems.org/>. – Date of access: 24.05.2021.
5. Определитель высших растений Беларуси / под ред. В. И. Парфенова. – Минск : Дизайн ПРО, 1999. – 472 с.
6. Hollingsworth, P. M. Choosing and using a plant DNA barcode / P. M. Hollingsworth, S. W. Graham, D. P. Little // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, nr 5. – P. 1–28.

7. Use of *ITS2* Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals [Electronic resource] / H. Yao [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, nr 10. – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0013102&type=printable>. – Date of access: 24.05.2021.

8. Purty, R. S. DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy / R. S. Purty, S. Chatterjee // Austin J Biotechnol Bioeng. – 2016. – Vol. 3, iss. 1. – P. 1059.

9. DNA Barcode Goes Two-Dimensions: DNA QR Code Web Server [Electronic resource] / C. Liu [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, nr 5. – Mode of access: https://www.researchgate.net/publication/224934034_DNA_barcode_goes_two-dimensions_DNA_QR_code_web_server. – Date of access: 24.05.2021.

10. Internal Transcribed Spacer 2 Ribosomal RNA Database / B. Merget [et al.] // J. of Visualized Experiments. – 2012. – Vol. 61.

REFERENCES

1. Vozniachuk, I. P. Monitoring okhraniajemykh rastenij i gribov / I. P. Vozniachuk, L. V. Siemierienko // Monitoring rastitel'nogo mira v Rjespublikie Bielarus': riezul'taty i pierspiektivy / I. V. Bordok [i dr.]; pod obshch. ried. A. V. Pugachievskogo, A. V. Sudnika. – Minsk : Bielarus. navuka, 2019. – S. 100–140.

2. Krasnaja kniga Rjespubliki Bielarus'. Rastienija: riedkije i nakhodiashchijesja pod ugrozaj ischieznovienija vidy dikorastushchikh rastenij / gl. riedkol.: I. M. Kachanovskij (pried.) [i dr.]. – 4-je izd. – Minsk : Bielarus. encykl. imia P. Brouki, 2015. – 448 s.

3. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource] : The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>. – Date of access: 24.05.2021.

4. BOLD Systems [Electronic resource] : The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). – Mode of access: <https://www.boldsystems.org/>. – Date of access: 24.05.2021.

5. Opriedielitel' vysshikh rastenij Bielarusi / pod ried. V. I. Parfionova. – Minsk : Dizayn PRO, 1999. – 472 s.

6. Hollingsworth, P. M. Choosing and using a plant DNA barcode / P. M. Hollingsworth, S. W. Graham, D. P. Little // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, nr 5. – P. 1–28.

7. Use of *ITS2* Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals [Electronic resource] / H. Yao [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, nr 10. – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0013102&type=printable>. – Date of access: 24.05.2021.

8. Purty, R. S. DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy / R. S. Purty, S. Chatterjee // Austin J Biotechnol Bioeng. – 2016. – Vol. 3, iss. 1. – P. 1059.

9. DNA Barcode Goes Two-Dimensions: DNA QR Code Web Server [Electronic resource] / C. Liu [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, nr 5. – Mode of access: https://www.researchgate.net/publication/224934034_DNA_barcode_goes_two-dimensions_DNA_QR_code_web_server. – Date of access: 24.05.2021.

10. Internal Transcribed Spacer 2 Ribosomal RNA Database / B. Merget [et al.] // J. of Visualized Experiments. – 2012. – Vol. 61.

Рукапіс наступіў у рэдакцыю 31.05.2021