

МРНТИ 34.29.35; 68.47.94; 87.35.29; 34.15.23

**Есимсеитова А.К.<sup>1</sup>, Жаныбекова Ж.Т.<sup>2</sup>, Муранец А.П.<sup>3</sup>,  
Тасова А.С.<sup>4</sup>, Щевцов А.Б.<sup>5</sup>, Жалмаканова Ж.Ж.<sup>6</sup>, Какимжанова А.А.<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений, e-mail: asel\_1388@bk.ru

<sup>2</sup>младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений,  
e-mail: zhanargul.zhanybekova@mail.ru

<sup>3</sup>кандидат биологических наук, доцент, e-mail: muranets@rambler.ru

<sup>4</sup>магистр биологии, e-mail: aselchik\_86@mail.ru

<sup>5</sup>кандидат биологических наук, зав. лабораторией прикладной генетики, e-mail: ncbshevtsov@gmail.com

<sup>6</sup>студент магистратуры Евразийского национального университета имени Л.Н. Гумилева,  
Казахстан, г. Астана, e-mail: janar.03.83@mail.ru

<sup>7</sup>доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией биотехнологии и  
селекции растений, e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

<sup>1,2,7</sup>Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Астана

<sup>3,4</sup>Казахский Агротехнический университет имени С.Сейфуллина, Казахстан, г. Астана

## **ВИДОИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЛОРЫ РАСТЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНЫХ ПАРКОВ «БАЯНАУЛЬСКИЙ» И «БУРАБАЙ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ITS**

При идентификации биологических материалов популярным является использование универсальных ДНК-штрих кодов. В настоящее время изучение генетического разнообразия флоры Северного Казахстана на разных таксономических (родовой, видовой и подвидовой) уровнях при использовании ДНК-маркеров не проводилось. Для учета численности и сохранения биоразнообразия растений необходима единая электронная база данных. Целью данной работы являлась видоидентификация и филогенетический анализ флоры растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» с использованием ITS. В качестве исходного материала использовали растительный материал, который был собран с мая по июль месяцы 2015-2017 гг. в национальных парках «Баянаульский» (90 видов) и «Бурабай» (69 видов). В результате исследований проведена видоидентификация 64 эндемичных и редких видов растений двух национальных парков. Оценен уровень генетического разнообразия растений семейства Бобовые (Fabaceae). При филогенетическом анализе чины гороховидной (*Lathyrus pisiformis*), клевера ползучего (*Trifolium repens*), люцерны желтой (*Medicago falcata*), остролодочника яркоцветного (*Oxytropis floribunda*), солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) представлено разделение семейства на 2 кластера по пяти родам растений. Внутривидовой уровень генетического разнообразия можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.) сформировал два подкластера в зависимости от типа популяции, где индекс Таджима составил 1.183269. Полученные данные на основе классических подходов систематики и молекулярно-генетических методов позволят в дальнейшем создать электронную базу данных по эндемичным, редким и хозяйственно-ценным видам растений.

**Ключевые слова:** «Баянаульский» ГНПП, «Бурабай» ГНПП, флора, ДНК-генотипирование, ITS (internal transcribed spacer).

Yessimseitova A.K.<sup>1</sup>, Zhanybekova Zh.T.<sup>2</sup>, Muronets A.P.<sup>3</sup>,  
Tasova A.S.<sup>4</sup>, Shevtsov A.B.<sup>5</sup>, Zhalmakanova Zh.Zh.<sup>6</sup>, Kakimzhanova A.A.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>researcher of the laboratory of biotechnology and plant breeding, e-mail: asel\_1388@bk.ru

<sup>2</sup>junior researcher of the laboratory of biotechnology and plant breeding, e-mail: zhanargul.zhanybekova@mail.ru

<sup>3</sup>candidate of biological sciences, associated professor, e-mail: muranets@rambler.ru

<sup>4</sup>master of biology, e-mail: aselchik\_86@mail.ru

<sup>5</sup>candidate of biological sciences, head of the laboratory applied genetics, e-mail: ncbshevtsov@gmail.com

<sup>6</sup>master-student, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana, e-mail: janar.03.83@mail.ru

<sup>7</sup>doctor of biological sciences, associated professor, head of the laboratory of biotechnology and plant breeding, Astana, e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

<sup>1,2,7</sup>National Center for Biotechnology, Kazakhstan, Astana

<sup>3,4</sup>S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Kazakhstan, Astana

### **Identification and phylogenetic analysis for flora of «Bayanaul» and «Burabay» national parks by using ITS**

When identifying biological materials popular is the use of universal DNA-barcode. At present, the study of the genetic diversity of the flora of Northern Kazakhstan at different taxonomic levels (generic, species and subspecies) was not carried out using DNA markers. The purpose of this work was the identification and phylogenetic analysis for flora of national parks «Bayanaul» and «Burabay» by using ITS. As a source material, plant material was used, which was collected from May to July months 2015–2017 in national parks «Bayanaul» (90 species) and «Burabay» (69 species). As a result of the research, 64 endemic and rare plant species of two national parks were visually identified. The level of genetic diversity of plants of the family Fabaceae is estimated. In phylogenetic analysis, the *Lathyrus pisiformis*, *Trifolium repens*, *Medicago falcata*, *Oxytropis floribunda*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., the family is divided into 2 clusters of five plant genera. The intraspecific level of the genetic diversity of the *Juniperus sabina* L. formed two subclusters, depending on the type of population, where the Tajima index was 1.183269. The obtained data on the basis of classical approaches of taxonomy and molecular genetic methods will allow to create in the future an electronic database on endemic, rare and economically valuable plant species.

**Key words:** Bayanaul SNNP, Burabay SNNP, flora, DNA genotyping, ITS (internal transcribed spacer)

Есімсеитова А.К.<sup>1</sup>, Жаныбекова Ж.Т.<sup>2</sup>, Муранец А.П.<sup>3</sup>,  
Тасова А.С.<sup>4</sup>, Щевцов А.Б.<sup>5</sup>, Жалмаканова Ж.Ж.<sup>6</sup>, Какимжанова А.А.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>өсімдіктер биотехнологиясы және селекциясы зертханасының ғылыми қызметкері, e-mail: asel\_1388@bk.ru

<sup>2</sup>өсімдіктер биотехнологиясы және селекциясы зертханасының кіші ғылыми қызметкері,  
e-mail: zhanargul.zhanybekova@mail.ru

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: muranets@rambler.ru

<sup>4</sup>биология магистрі, e-mail: aselchik\_86@mail.ru

<sup>5</sup>биология ғылымдарының кандидаты, қолданбалы генетика зертханасының меңгерушісі,  
e-mail: ncbshevtsov@gmail.com

<sup>6</sup>Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің магистранты,  
Қазақстан, Астана қ., e-mail: janar.03.83@mail.ru

<sup>7</sup>биология ғылымдарының кандидаты, өсімдіктер биотехнологиясы және  
селекциясы зертханасының меңгерушісі, e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

<sup>1,2</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Қазақстан, Астана қ.

<sup>3,4</sup>С. Сейфуллин атындағы Қазақ Агротехникалық Университеті, Қазақстан, Астана қ.

### **ITS-маркерін қолдану арқылы Баянауыл және Бурабай ұлттық саябақтарында кездесетін өсімдік флорасын идентификациялау және филогенетикалық сараптамасын жүргізу**

Биологиялық материалдарды идентификациялау үшін әмбебап ДНҚ-штрих кодтарды қолдану кеңінен таралған. Қазіргі кезде, Солтүстік Қазақстан флорасының таксономиялық деңгейде (туыс, түр және тұрасты) генетикалық алуан түрлілігіне ДНҚ-маркерлерді қолдану арқылы зерттеулер жүргізілмеген. Биологиялық алуан түрлілікті сақтау және сандық есебін жүргізу үшін бірыңғай электрондық дерекқорды қажет етеді. Берілген жұмыстың мақсаты, ITS-маркерін қолдану арқылы Баянауыл және Бурабай Ұлттық Саябақтарында кездесетін өсімдік флорасын түрге дейін идентификациялау және филогенетикалық сараптамасын жүргізу болып табылады. Бастапқы материал ретінде 2015–2017 жж. мамыр–шілде айларында Баянауыл (90 түр) және Бурабай (69 түр) Ұлттық Саябақтарынан жиналған өсімдік материалдар қолданылды.

Зерттеу жұмыстарының нәтижесінде, екі ұлттық саябақтардың эндемикалық және сирек кездесетін өсімдіктерінің түр идентификациясы жүргізілді. Бұршақ (*Fabaceae*) тұқымдас өсімдіктердің генетикалық алуан түрлілік деңгейі бағаланды. Бұршақ тәрізді ноғаттықтың (*Lathyrus pisiformis*), жатаған беденің (*Trifolium repens*), сары жоңышқаның (*Medicago falcata*), әсем кекектің (*Oxytropis floribunda*), орал миясының (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) филогенетикалық сараптамасы бойынша өсімдіктер 5 туыстан, тұқымдастар 2 кластерге жіктелді. Казак аршасының (*Juniper-*

rus sabina L.) түрішілік генетикалық алуан түрлілігінің деңгейі популяция түріне байланысты 2 кластерастын құрастырды, Таджима индексінің көрсеткіші 1.183269. Осылайша, систематиканың классикалық тәсілдері мен молекулярлық-генетикалық тәсілдердің негізінде эндемикалық, сирек кездесетін, жойылу қаупі төнген, жабайы және шаруашылықта құнды өсімдік түрлеріне электрондық дерекқор құрастыруға мүмкіндік береді.

**Түйін сөздер:** Баянауыл ҰМТС, Бурабай ҰМТС, флора, ДНК-генотиптеу, ITS.

## Введение

Учитывая глобальный характер проблемы биологического разнообразия весьма важным является охрана не только отдельных видов, но и целого ряда уникальных растительных сообществ, их разнообразие и устойчивость – важнейшее условие оптимальности среды в биологической продуктивности. Флора Казахстана по ряду оценок включает более 13 тыс. видов, в том числе – более 5754 вида высших сосудистых растений, около 5000 – грибов, 485 – лишайников, более 2000 – водорослей, около 500 – мохообразных. Среди растений 14 % видов являются эндемиками. В их числе немало реликтов (Национальный доклад, 2008: 3-6).

Для решения проблемы исчезновения видов растений были созданы особо охраняемые природные территории, такие как заповедники, государственные национальные природные парки и т.д. (Данченко, 2007: 179-182).

Баянаульский государственный национальный природный парк (ГНПП) был образован в 1985 г. для сохранения и восстановления естественной флоры и фауны Баянаульского горного массива. Территория национального парка отличается уникальностью отдельных растительных сообществ и почвенного разнообразия, флора насчитывает около 500 видов высших сосудистых растений, то есть третью часть флоры Казахского мелкосопочника. В Красную книгу Казахстана занесены ольха клейкая, тюльпаны – Шренка и поникающий, береза киргизская, пион степной, адонис весенний, прострел раскрытый, ковыль перистый (<http://www.marstour.kz/in-tourism/zapovedniki/bayanaulskij>).

Флора Государственного национального природного парк «Бурабай» насчитывает 757 видов растений, в том числе 95 редких и находящихся под угрозой исчезновения. Из древесных пород наибольшую площадь занимает сосна. В Красную книгу Казахстана занесены росянка круглолистная, башмак крупноцветный, башмачок настоящий, плаун баранец, дремлик болотный, зимолубка зонтичная, пальчатокоренник Фукса, кладина оленья (лишайник), а также

ольха клейкая (или черная) (<http://silkadv.com/ru/node/996>).

Исследования по изучению современного состояния и генетического разнообразия эндемичных, редких, исчезающих и хозяйственно-ценных видов растений проводились лишь по морфологическим признакам при использовании ботанических подходов, которые не являются достаточно точными и требуют огромного физического труда (Данченко, 2007: 179-182). Изучение генетического разнообразия флоры Северного Казахстана на разных таксономических уровнях (родовой, видовой и подвидовой) при использовании ДНК-маркеров не изучались. Для учета численности и сохранения биоразнообразия растений необходима единая электронная база данных.

В настоящее время в передовых научных центрах мира активно используют одновременно современные ботанические и молекулярно-генетические подходы для изучения генетического разнообразия эндемичных, редких и ценных видов растений (Gao, 2017: 993-1005; Doh, 2017: 101-109; Tsai, 2017: 9; Rodrigues, 2017: 811-817). При идентификации биологических материалов популярным является использование универсальных ДНК-штрихкодов, при этом наилучшим считается наличие небольшого фрагмента (Dong, 2014: 138; Hebert, 2003: 96-99).

Термин «ДНК штрихкод» для глобальной идентификации видов был впервые введен Хэбертом в 2003 году и получил всеобщее внимание в научном сообществе. С помощью данной техники было выполнено определение животных, растений и грибов. В связи с этим видовой идентификация растений с помощью ДНК-штрихкодирования представляет интерес, т.к. при использовании стандартных методов возможны ошибки (Hebert, 2003: 313-321; Матвеева, 2011: 40-43)

ДНК-штрихкодирование включает последовательность стандартного региона ДНК, который обеспечивает видовую идентификацию. Представляют интерес внутренние транскрибируемые спейсеры (*ITS – internal transcribed spacer*) области ядерной рибосомальной ДНК

(18S-5.8S-26S), часто используемые для молекулярно-генетических исследований в области систематики растений на уровне видов, обладающие большой копийностью в геноме (Alvarez, 2003: 417-434). Для данного региона показана высокая вариабельность и потенциальная применимость в качестве маркерного участка (Kress, 2005: 8369-8374). Анализ полиморфизма межгенных спейсеров позволяет изучать филогенетические отношения между близкородственными видами, а также изучать филогению между популяциями внутри вида и между отдельными индивидуумами.

Преимущество региона *ITS* в том, что он может быть амплифицирован по частям (имеется два более мелких фрагмента – *ITS1* и *ITS2* – прилегающих к 5.8S локусу, который расположен в центре всего участка и консервативен). Консервативный регион 5.8S на самом деле содержит филогенетическую информацию для дискриминации на уровне классов (Cullings, 1998: 919-923).

Наиболее значимые работы в 2017 году были опубликованы по видоидентификации и филогенетическому анализу лекарственных трав при использовании *ITS* (Doh, 2017: 101-109). Отличием наших результатов исследований основан на анализе популяций, охватывающий широкий спектр генетического разнообразия различных семейств растений, собранных в национальных парках «Баянаульский» и «Бурабай».

Таким образом, молекулярное генотипирование флоры национальных природных парков «Баянаульского» и «Бурабай» является актуальным и перспективным. Проведение анализов для определения видов на основе классических подходов систематики и молекулярно-генетических методов на основе ДНК-маркеров ядерного генома в дальнейшем позволит создать электронную базу данных эндемичных, редких, исчезающих и дикорастущих хозяйственно-ценных видов растений.

Целью данной работы являлась видоидентификация и филогенетический анализ флоры растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» с использованием *ITS*.

## Материалы и методы исследования

### Растительный материал

В качестве исходного материала использовали растительный материал, который был собран с мая по июль месяцы 2015-2017 гг. в ГНПП «Баянаульский» и «Бурабай» – эндемичные, ред-

кие, исчезающие и дикорастущие хозяйственно-ценные виды растений. Растительный материал был отобран, не причиняя вреда сохранению генетических ресурсов охраняемой территории. Определение проводили как непосредственно в природе, не повреждая растения, так и в лаборатории по свежему или гербарному материалу. Для составления гербария собранных растений использовали определители и пособия (Павлов, 1961: 639; Голоскоков, 1972: 571; Искаков, 2014: 116; Тасова, 2014: 204).

В ГНПП «Баянаульский» собрано и определено 90 эндемичных, редких, исчезающих и дикорастущих хозяйственно-ценных видов: из них Остролодочник яркоцветный (*Oxytropis floribunda*) семейство Бобовые является эндемичным видом растений. Найдены древесно-кустарниковые растения, которые принадлежат к бореальным реликтам: можжевельник казацкий (*Juniperus sabina L.*), смородина черная (*Ribes nigrum L.*), лекарственное растение – лютик многоцветковый (*Ranunculus polyanthemus L.*), представленные на рисунке 1.

По ГНПП «Бурабай» собрано и определено 69 видов; выявлены растения, которые принадлежат бореальному реликту, сохранившиеся как остаток предковой группы, более широко распространённые – земляника лесная (*Fragaria vesca*), лук привлекательный (*Allium delectatum Siev.*) и др., представленные на рисунке 1.

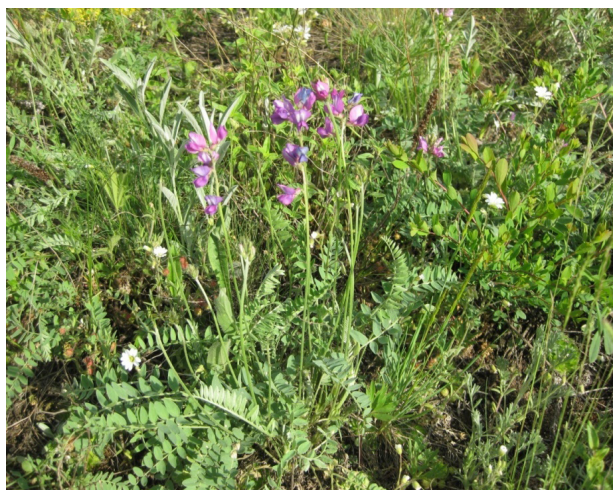
Для проведения молекулярно-генетического анализа использовано 64 видов эндемичных и редких видов растений двух национальных парков.

### Выделение ДНК растений

Для выделения ДНК были использованы вегетативные и репродуктивные органы растений. Свежий растительный материал был собран в бумажные пакеты и заморожен при -20°C. Для экстракции ДНК растений использовали СТАВ метод (Doyle, 1990: 13-15).

Перед выделением ДНК растительный материал промывался дистиллированной водой. 20-45 мг растительного материала гомогенизировали в 0,5 мл лизирующего буфера с 2% меркаптоэтанолом, пробирки с гомогенизированным материалом инкубировали при 65°C в течение 20 минут, далее проводили депротенинизацию 1 объемом хлороформа, центрифугировали 5 минут при 13 000 об/мин (микроцентрифуга Eppendorf 5424R, Германия). К супернатанту добавляли 2/3 объема изопропанола, центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 12 минут. Осадок промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера.





1



2



3



4



5



6

1 – Остролодочник яркоцветный, семейство Бобовые; 2 – Смородина черная, семейство Крыжовниковые;  
3 – Лютик многоцветковый, семейство Лютиковые; 4 – Можжевельник казацкий, семейство Кипарисовые;  
5 – Лук привлекательный, семейство Луковые; 6 – Земляника лесная, семейство Розовые

**Рисунок 1** – Эндемичные, редкие виды растений, собранные в ГНПП «Баянаульский» и «Бурабай»



### ПЦР амплификация

Для видоидентификации популяций видов растений последовательность ядерной рибосомальной ДНК амплифицировали с использованием универсальных *ITS* праймеров. Данный

*ITS* регион характеризуется наличием двух локусов *ITS1* и *ITS2*, разделяемый небольшой вставкой 5.8S, и имеет общую длину от 500 до 800 пар нуклеотидов в зависимости от вида растений.

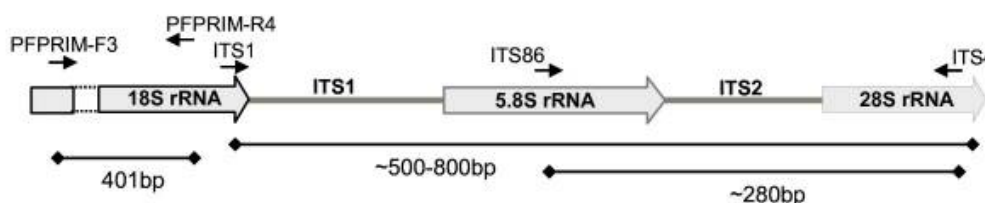


Рисунок 2 – Схема расположения *ITS1* и *ITS2* рибосомальной ДНК (Embong, 2008: 7)

В качестве *ITS* праймеров были использованы последовательности, разработанные и описанные White и др., (White, 1990: 315-322), пред-

ставленные в таблице 1. Праймеры были синтезированы в лаборатории органического синтеза РГП «Национальный центр биотехнологии».

Таблица 1 – Праймеры, использованные для амплификации

Название	Последовательность	Температура отжига (°C)	Размер ПЦР продукта (п.н.)
<i>ITS1a-F</i>	AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	55	700
<i>ITS4-R</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 30 мкл состава: 1x ПЦР буфер; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM каждого dNTP; прямой и обратный *ITS* – праймер 0,5 мкМ каждого; Tag ДНК полимеразы (0,04 ед/мкл); 5 нг ДНК. Амплификацию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация при 95°C – 4 мин.; 95°C – 40 сек, 55°C – 40 сек, 72°C – 1 мин; количество циклов – 35; окончательная элонгация 4 минуты при 72°C (амплификатор Eppendorf MasterCycler Pro, Германия). Продукты ПЦР анализировали с использованием 1,5% агарозного геля в присутствии бромистого этидия и фотографировали в УФ-свете с использованием аппарата GelDoc XR (BioRad, США). Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза в 1xTAE буфере.

Далее реакционную смесь подвергали очистке ферментами *Sap* и *ExoI* (Thermo Fisher Scientific, США). Данные реагенты используются для ферментативной очистки амплифицированного продукта: первая инкубация гидролизует избыток праймера и дефосфорилирует нукле-

отиды; вторая, высокотемпературная инкубация инактивирует ферменты, что позволяет минимизировать потерю ПЦР продукта и проводить дальнейшее секвенирование без дополнительной очистки на колонках. Реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер 1x*Sap*, 10 мкл ПЦР продукта, 3 ед. экзонуклеазы *ExoI*, 1 ед.щелочной фосфатазы *Sap* при 37°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией фермента при 75°C в течение 15 минут.

### Секвенирование ПЦР продукта

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

В результате проведения секвенирования нуклеотидные последовательности анализируемых образцов были собраны и отредактированы с помощью программы SeqMan (Allelix, 1999: 723-728). Автоматическое выравнивание, подсчет

количества замен на сайт и построение дерева методом максимального правдоподобия проводили с использованием программного обеспечения *MEGA5* (Tamura, 2011: 2731-2739) и метода ближайших соседей Neighbour-joining (Saitou, 1987: 406-425) с функцией «бутстрап» на 1000 повторений (Felsenstein, 1985: 783-791). Генетические расстояния между популяциями посчитаны по методу Maximum Composite Likelihood (максимальное композитное правдоподобие) (Tamura, 2004: 11030-11035).

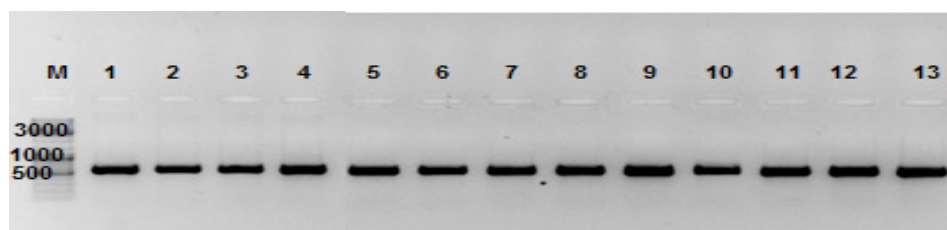
### Результаты исследования и их обсуждение

Исследования были направлены на применении праймеров для амплификации участка ядерного (*ITS*) генома редких видов растений для определения участка, пригодного для их идентификации и ДНК-штрихкодирования.

Наиболее значимые работы по идентификации и филогенетическому анализу редких, исчезающих и лекарственных видов растений принадлежат многим ученым, которые приводят результаты исследований растений своего региона (Gao, 2017: 993-1005; Doh, 2017: 101-109; Tsai, 2017: 9; Rodrigues, 2017: 811-817). В исследо-

ваниях Baldwin et al. показаны свойства *ITS* для видоидентификации и использования в филогенетики живых организмов (Baldwin, 1995: 247-277).

Праймеры, используемые для амплификации *ITS* локуса универсальны, так, группа корейских ученых использовала регион *ITS* для идентификации семи видов 29 образцов лекарственного растения рода *Cinnamotum*, при этом нуклеотидная последовательность составляла от 680 до 729 п.н. (Doh, 2017: 101-109). Это подтверждается с результатами исследований, полученных нами, при применении *ITS* праймера для амплификации участка ядерного рибосомального ДНК, размер амплифицированных фрагментов находился в допустимых пределах и составил около 700 п.н. Амплификация была проведена для разных 64 видов в 2-3 повторностях (солодка уральская, люцерна желтая, остролодочник яркоцветный, лук малоцветковый, лютик многоцветковый и др.) растений с *ITS* праймером. Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле и в результате были получены электрофоретические профили для каждого образца, примеры некоторых из них приведены на рисунке 3.



М – маркер молекулярного веса (100-10 000 п.н.); 1 – 30/1 (солодка уральская); 2 – 30/4 (солодка уральская); 3 – 30/7 (солодка уральская); 4 – 66/3 (люцерна желтая); 5 – 66/5 (люцерна желтая); 6 – 66/7 (люцерна желтая); 7 – 10/3 (остролодочник яркоцветный); 8 – 10/4 (остролодочник яркоцветный); 9 – 44/2 (лук малоцветковый); 10 – 44/4 (лук малоцветковый); 11 – 46/3 (лютик многоцветковый); 12 – 46/4 (лютик многоцветковый); 13 – 46/6 (лютик многоцветковый)

Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР

Оценили уровень генетического разнообразия при использовании *ITS* у растений, относящиеся к семейству Бобовые (*Fabaceae*). В литературе описаны примеры успешного использования *ITS* праймера для изучения генетического разнообразия внутри одного семейства (Qiang, 2005: 5-8; Jun, 2012).

По результатам филогенетического анализа чины гороховидной (*Lathyrus pisiformis*), клевера ползучего (*Trifolium repens*), люцерны желтой (*Medicago falcata*), остролодочника

яркоцветного (*Oxytropis floribunda*), солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) (рисунок 4), представлено генетическое разделение семейства *Fabaceae* на 2 кластера по пяти родам растений. Первый кластер включает представителей вида *Lathyrus pisiformis*, *Trifolium repens*, *Medicago falcata*. Второй кластер состоит из *Oxytropis floribunda*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Уровень генетического разнообразия семейства *Fabaceae* по индексу Таджима составил 0.159565.

В национальном парке «Баянаульский» был собран растительный материал двух популяций можжевельника казацкого (*Juniperus sabina L.*), который принадлежит к бореальному реликту. Внутривидо-

вой уровень генетического разнообразия можжевельника казацкого (*Juniperus sabina L.*) сформировал два подкластера в зависимости от типа популяции, где индекс Таджима составил 1.183269.

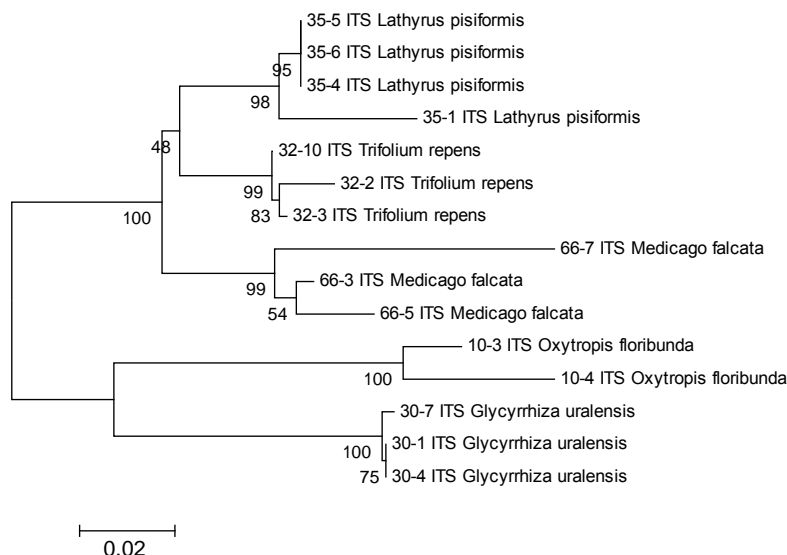


Рисунок 4 – Филогенетическое древо пяти родов семейства Бобовые с использованием *ITS*

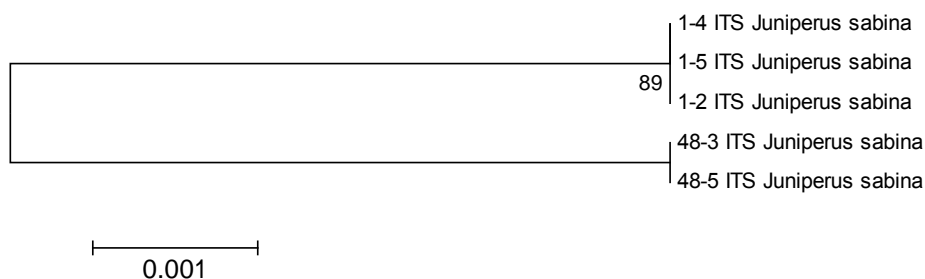


Рисунок 5 – Филогенетическое древо вида Можжевельник казацкий с использованием *ITS*

Таким образом, провели видоидентификацию растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» и на основе него построили филогенетические древа по семейству и виду. Полученные данные позволят нам в дальнейшем создать электронную базу данных по эндемичным, редким, исчезающим и дикорастущим хозяйственно-ценным видам растений.

### Заключение

Преимуществом данного исследования является использование праймеров для ам-

плификации участка *ITS* ядерного рибосомального ДНК редких видов растений, пригодного для видоидентификации и ДНК-штрихкодирования.

Таким образом, провели видоидентификацию растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» и на основе него построили филогенетические древа по семейству и виду. Полученные данные позволят нам в дальнейшем создать электронную базу данных по эндемичным, редким, исчезающим и дикорастущим хозяйственно-ценным видам растений.



## Финансирование

Работа выполнена в рамках научно-технической программы Ф.0675 «Изучение генетического разнообразия и сохранение генетических ресурсов эндемичных, редких и хозяйственно-цен-

ных видов растений в Республике Казахстан» на 2015-2017 гг. по проекту «Молекулярное генотипирование флоры Государственных национальных природных парков Баянаульского и Бурбай» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

## Литература

- Материалы Четвертого Национального доклада Республики Казахстан о биологическом разнообразии. – Астана, 2008. – С. 3-6.
- Данченко А.М., Кабанова С.А., Особо охраняемые природные территории Республики Казахстан и проблемы сохранения // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – №2-3. – С. 179-182.
- Баянаульский государственный национальный природный парк // <http://www.marstour.kz/in-tourism/zapovedniki/bayanaulskij>. – 2009.
- Огарь Н.П., Иващенко А.А. Заповедники и национальные парки Казахстана // <http://silkad.com/ru/node/996>. – Алматы, 2005.
- Gao J., Liao P., Meng W. H. et.al. Application of DNA barcodes for testing hypotheses on the role of trait conservatism and adaptive plasticity in *Acer L. section Palmata Pax* (Sapindaceae) // *Braz. J. Bot.* – 2017. – Vol. 40. – P. 993-1005. DOI:10.1007/s40415-017-0404-1.
- Doh E. J., Kim J.-H., Oh S., Lee G. Identification and monitoring of Korean medicines derived from *Cinnamomum* spp. by using ITS and DNA marker // *Genes Genom.* – 2017. – Vol. 39. – P.101-109. DOI 10.1007/s13258-016-0476-5.
- Tsai J.-N., Ann P.-J., Liou R.-F. et.al. *Phellinus noxius*: molecular diversity among isolates from Taiwan and its phylogenetic relationship with other species of *Phellinus* based on sequences of the ITS region // *Bot Stud.* – 2017. – Vol. 58. – pp. 9. DOI 10.1186/s40529-017-0162-1.
- Rodrigues V. T., Smidt E. de C., Bolson M., F. de Barros. Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: *Pleurothallidinae*), an endemic group of the Atlantic Forest // *Braz. J. Bot.* – 2017. – Vol. 40, No 3. – P. 811-817. DOI 10.1007/s40415-017-0384-1.
- Dong W., Liu H., Xu C., Zuo Y., Chen Z. and Zhou S. A chloroplast genomic strategy for designing taxon specific DNA mini-barcode: a case study on ginsengs // *BMC genetics.* – 2014. – Vol. 15. – P. 138. DOI: 10.1186/s12863-014-0138-z.
- Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 1. – P. 96-99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 270. – P.313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Матвеева Н.А., Курбатова Л.Е., Шаховский А.М., Кищенко Е.М., Дуплий В.П., Кваско Е.Ю. Использование некоторых ядерных и хлоропластных генов для видового определения растений Антарктики // Матер. междунар. науч. конф. «Современные аспекты генетической инженерии растений». – Киев, 2011. – С.40-43.
- Alvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2003. – Vol. 29. – P. 417-434.
- Kress W.J., Wurdac K.J., Zimmer E.A., Weight L.A., Jonsen D.H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 8369-8374. DOI:10.1073/pnas.0503123102.
- Cullings K.W., Vogler D.R. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution // *Mol. Ecol.* – 1998. – Vol. 7. – P. 919-923. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00409.x.
- Павлов Н.П. Флора Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1961. – Т. 1-9. – 639 с.
- Голоскоков В.П. Определитель растений Казахстана. – 1972. – Т. 1-2. – 571 с.
- Искаков М.А., Муранец А.П., Баймуканов Ш.К. Русско-казахско-латинский словарь названий растений. – Астана, 2014. – 116 с.
- Тасова А.С., Баймуканов Ш.К. Русско-казахско-латинский словарь названий растений. – Астана, 2014. – 204 с.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue // *Focus.* – 1990. – Vol.12. – P. 13-15.
- Embong Z., Wan Hitam W.H., Yean C. Y., Rashid N.H., Kamarudin B. et.al. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis // *BMC Ophthalmology.* – 2008. – Vol. 8. – pp. 7. DOI:10.1186/1471-2415-8-7.
- White T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. – New York, 1990. – P. 315-322. DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- Allex C.F., Shavlik J.W., Blattner F.R. Neural network input representations that produce accurate consensus sequences from DNA fragment assemblies // *Bioinformatics.* – 1999. – Vol. 15, No 9. – P. 723-728.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – Vol. 4. – P. 406-425. DOI.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – P. 783-791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030-11035. DOI:10.1073/pnas.0404206101.

Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter M. et al. The ITS region of nuclear Ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // *Annals of the Missouri Botanical Garden*. – 1995. – Vol. 82. – P. 247-277.

Qiang Z., Yu-long D., Chen XU. et al. A preliminary analysis of phylogenetic relationships of *Arundinaria* and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-F intergenic spacer) // *Journal of Forestry Research*. – 2005. – Vol. 16, No 1. – P. 5-8.

Jun W., Nian-He X. *Ardisia crenata* Complex (Primulaceae) Studies Using Morphological and Molecular Data // *Botany*, 2012. ISBN: 978-953-51-0355-4.

## References

Materialy Chetvertogo Nacional'nogo doklada Respubliki Kazahstan o biologicheskom raznoobrazii (2008) [Proceedings of the Fourth National Report of the Republic of Kazakhstan on Biological Diversity]. Astana, pp. 3-6.

Danchenko A.M., Kabanova S.A. (2007) Osobo ohranyaemye prirodnye territorii Respubliki Kazahstan i problemy sohraneniya [Specially protected natural territories of the Republic of Kazakhstan and problems of conservation]. *Hvojnnye boreal'noj zony*, no. 2-3, pp. 179-182.

Bayanaul'skij gosudarstvennyj nacional'nyj prirodnyj park (2009) [Bayanaul State National Natural Park] // <http://www.marstour.kz/in-tourism/zapovedniki/bayanaulskij>.

Ogar N.P., Ivaschenko A.A. (2005) Zapovedniki i natsionalnyie parki Kazahstana [Reserves and national parks of Kazakhstan] // <http://silkadv.com/ru/node/996>, Almaty.

Gao J., Liao P., Meng W. H. et al. (2017) Application of DNA barcodes for testing hypotheses on the role of trait conservatism and adaptive plasticity in *Acer L. section Palmata Pax* (Sapindaceae). *Braz. J. Bot.*, vol. 40, pp. 993-1005. DOI:10.1007/s40415-017-0404-1.

Doh E. J., Kim J.-H., Oh S., Lee G. (2017) Identification and monitoring of Korean medicines derived from *Cinnamomum* spp. by using ITS and DNA marker. *Genes Genom.*, vol. 39, pp. 101-109. DOI 10.1007/s13258-016-0476-5.

Tsai J.N., Ann P.J., Liou R.F. et al. (2017) *Phellinus noxius*: molecular diversity among isolates from Taiwan and its phylogenetic relationship with other species of *Phellinus* based on sequences of the ITS region. *Bot Stud.*, vol. 58, 9 p. DOI 10.1186/s40529-017-0162-1.

Rodrigues V. T., Smidt E. de C., Bolson M., F. de Barros. (2017) Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest. *Braz. J. Bot.*, vol. 40, no 3, pp. 811-817. DOI 10.1007/s40415-017-0384-1.

Dong W., Liu H., Xu C., Zuo Y., Chen Z. and Zhou S. (2014) A chloroplast genomic strategy for designing taxon specific DNA mini-barcodes: a case study on ginsengs. *BMC genetics*, vol. 15, 138 p. DOI: 10.1186/s12863-014-0138-z.

Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.*, vol. 1, pp. 96-99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.

Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, vol. 270, pp. 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.

Matveeva N.A., Kurbatova L.E., SHahovskij A.M., Kishchenko E.M., Duplij V.P., Kvasko E.YU. (2011) Ispol'zovaniya nekotoryh yadernyh i hloroplastnyh genov dlya vidovogo opredeleniya rastenij Antarktiki [Use some of the nuclear and chloroplast genes to determine the species of Antarctic plants]. *Mater. mezhdunar. nauch. konf. «Sovremennye aspekty geneticheskoy inzhenerii rastenij»* Kiev, pp. 40-43.

Alvarez I., Wendel J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 29, pp. 417-434.

Kress W.J., Wurdac K.J., Zimmer E.A., Weight L.A., Jonsen D.H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, pp. 8369-8374. DOI:10.1073/pnas.0503123102.

Cullings K.W., Vogler D.R. (1998) A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Mol. Ecol.*, vol. 7, pp. 919-923. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00409.x.

Pavlov N.P. (1961) *Flora Kazahstana* [Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata: Nauka, vol. 1-9, 639 p.

Goloskokov V.P. (1972) *Opredelitel' rastenij Kazahstana* [The determinant of plants in Kazakhstan]. vol. 1-2, 571 p.

Iskakov M.A., Muranec A.P., Bajmukanov SH.K. (2014) *Russko-kazahsko-latinskij slovar' nazvanij rastenij* [Russian-Kazakh-Latin Dictionary Plant Names]. Astana, 116 p.

Tasova A.S., Bajmukanov Sh.K. (2014) *Russko-kazahsko-latinskij slovar' nazvanij rastenij* [Russian-Kazakh-Latin Dictionary Plant Names]. Astana, 204 p.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, vol.12, pp. 13-15.

Embong Z., Wan Hitam W.H., Yean C. Y., Rashid N.H., Kamarudin B. et al. (2008) Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology*, vol. 8, 7 p. DOI:10.1186/1471-2415-8-7.

White T. J. et al. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, pp. 315-322. DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

Allex C.F., Shavlik J.W., Blattner, F.R. (1999). Neural network input representations that produce accurate consensus sequences from DNA fragment assemblies. *Bioinformatics*, vol. 15, no 9, pp. 723-728.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 28, pp. 2731-2739. DOI:10.1093/molbev/msr121.

Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 4, pp. 406-425. DOI.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, vol. 39, pp. 783-791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, pp. 11030-11035. DOI:10.1073/pnas.0404206101.

Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter M. et.al. (1995) The ITS region of nuclear Ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 82, pp. 247-277.

Qiang Z., Yu-long D, Chen XU. et.al. (2005) A preliminary analysis of phylogenetic relationships of Arundinaria and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-F intergenic spacer). *Journal of Forestry Research*, vol. 16, no 1, pp. 5-8.

Jun W., Nian-He X. (2012) *Ardisia crenata* Complex (Primulaceae) Studies Using Morphological and Molecular Data. *Botany*, ISBN: 978-953-51-0355-4.