

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ЧЕРНУШКА (*NIGELLA* L.)

<sup>1</sup>ЮХИМУК Андрей Николаевич, научный сотрудник лаборатории прикладной биохимии

<sup>2</sup>ЛЕ НГУЕН ТХАНЬ, директор

<sup>1</sup>СПИРИДОВИЧ Елена Владимировна, к.б.н., доцент, заведующий лабораторией  
прикладной биохимии

<sup>1</sup>ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

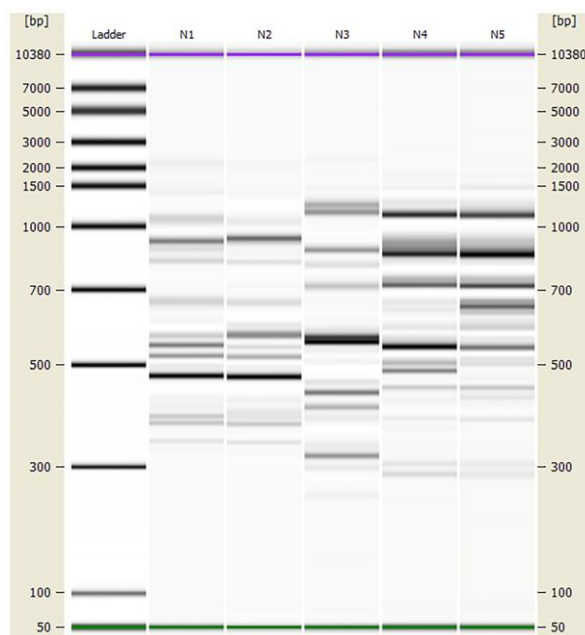
<sup>2</sup>Институт морской биохимии Вьетнамской академии наук и технологий

Растения рода чернушка (*Nigella* L.) – однолетние травянистые растения семейства лютиковых (*Ranunculaceae* JUSS.), произрастают в Западной Европе, Северной и Западной Африке, Юго-Восточной и Западной Азии [1]. Род *Nigella* L. насчитывает около 25 видов. Самыми распространенными являются чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), чернушка посевная (*Nigella sativa* L.), а также чернушка восточная (*Nigella orientalis* L.).

В последнее время физиолого-биохимические особенности чернушки и ее свойства активно изучаются в Беларуси и сопредельных странах. Однако информация о молекулярно-генетическом разнообразии этой культуры в нашей стране отсутствует. Целью данного исследования явилось изучение генетического разнообразия различных видов растений рода и создание их генетических паспортов. Объектами исследования являлись 3 вида рода: *Nigella sativa* L. (культивируемая в ЦБС (далее [BY]) и видообразец, полученный по делектусу из г. Бонна [DE]), *Nigella orientalis* L. [BY], *Nigella damascena* L., (видообразец ЦБС [BY], и полученный по делектусу из г. Тарту [EE]).

Молекулярно-генетическая паспортизация видов рода чернушка (*Nigella* L.) была проведена на основе данных мультилокусного ДНК-маркирования. Препараты ДНК получали методом 2×СТАВ экстракции с модификациями [2]. ДНК-маркирование проводилось с использованием техники ПЦР, для чего были отобраны праймеры, маркирующие произвольные (RAPD-техника) и межмикросателлитные (ISSR-техника) участки ДНК [3]. В общей сложности для генотипирования растений рода чернушка (*Nigella* L.) было отобрано 6 RAPD- и 4 ISSR-праймера, обладающих достаточным полиморфизмом и имеющих воспроизводимую амплификационную активность. ПЦР проводили в объеме 25 µl. Состав ПЦР-смеси был следующим: 1× PCR буфер (ПраймТех, Беларусь), 1× dNTP (ПраймТех, Беларусь), 20 pM праймера (ПраймТех, Беларусь), 1 ед. Таq-полимеразы (ПраймТех, Беларусь) и 60 ng матрицы ДНК. Разделение продуктов амплификации проводили на генетическом анализаторе Bioanalyzer–2100 (Agilent) с использованием DNA 7500 Series Kit.

Все использованные в исследовании праймеры генерировали четкие, воспроизводимые маркеры, набор которых для каждого исследуемого таксона характеризовался уникальностью (рисунок 1). Для таксонов рода чернушка (*Nigella* L.) максимальное количество локусов (ДНК-маркеров) 36 было идентифицировано с помощью праймера OPX–01, минимальное – 7 с использованием праймера UBC–824. В общей сложности было идентифицировано 235 локусов (ДНК-маркеров) – 155 для RAPD- и 80 для ISSR-ПЦР соответственно. Для каждого праймера был рассчитан показатель **Rp**, отражающий разрешающую способность [4]. Максимальной разрешающей способностью обладал праймер OPP–09 (15,5), минимальной – UBC–824 (2,5). Обе ПЦР техники позволили выявить высокий уровень полиморфизма у исследуемых таксонов чернушки – в среднем 95,74%. Максимальный полиморфизм выявлен при использовании праймеров OPA–18, OPP–09 и ISSCR–04 (100,00%), минимальный – 85,71% при использовании праймера UBC–824.



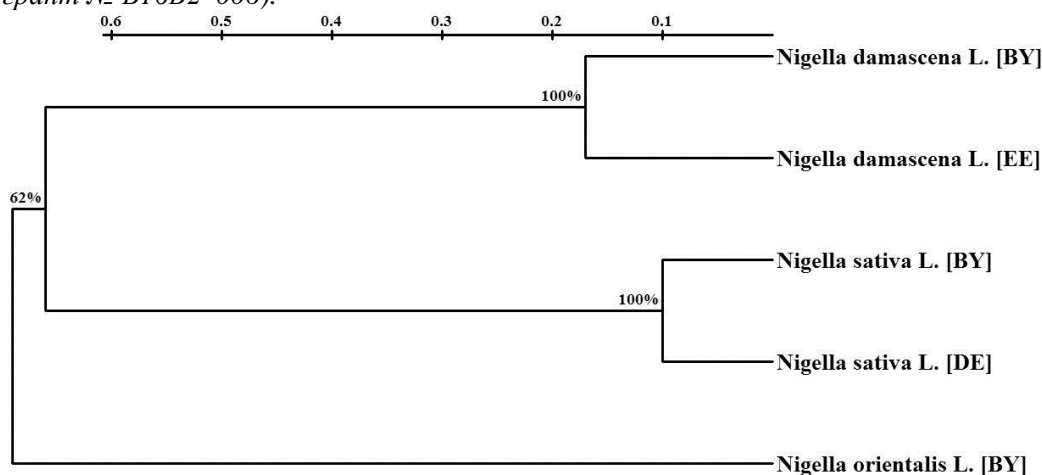
N1 – *Nigella sativa* L. [BY], N2 – *Nigella sativa* L. [DE], N3 – *Nigella orientalis* L. [BY], N4 – *Nigella damascena* L. [BY], N5 – *Nigella damascena* L. [EE].

**Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации тотальной ДНК видов рода *Nigella* L. с праймером *UBC-818***

На основании 235 ДНК-маркеров были рассчитаны генетические дистанции, произведена кластеризация исследованных видов рода чернушка по методу UPGMA и сконструирована консенсусная (RAPD+ISSR) дендрограмма, представленная на рисунке 2. Комплексный RAPD+ISSR анализ данных позволил уточнить топологию и генетические взаимосвязи исследуемых образцов.

Проведенное мультилокусное ДНК-маркирование 3 видов рода чернушка (*Nigella* L.) позволило дифференцировать все исследованные генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них, рассчитать генетические дистанции родства/отдаленности. На основании полученных мультилокусных RAPD/ISSR-спектров для исследованных образцов составлены генетические паспорта. В таблице приведен пример генетического паспорта для вида *Nigella damascena* L.

Работа выполнена при финансовой поддержке ВАИТ (грант VAST.HTQT.Belarus.01/16–17) и БРФФИ (грант № Б16В2–006).



Узлы, имеющие достоверную топологию (более 50%), обозначены соответствующим значением bootstrap-анализа (2000 реплик) в %.

**Рисунок 2 – Дендрограмма, отражающая степень генетического сходства между видами рода чернушка (*Nigella* L.) на основе 235 ДНК-маркеров**

Таблица – Мультилокусный генетический паспорт вида чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.)

<i>Nigella damascena</i> L. [BY]	
<i>Праймер</i>	<i>Маркер</i>
<b>RAPD</b>	
OPA-18 (A18)	A18 <sub>335</sub> , A18 <sub>440</sub> , A18 <sub>490</sub> , A18 <sub>695</sub> , A18 <sub>820</sub> , A18 <sub>1085</sub> , A18 <sub>1455</sub>
OPA-20 (A20)	A20 <sub>370</sub> , A20 <sub>515</sub> , A20 <sub>650</sub> , A20 <sub>690</sub> , A20 <sub>725</sub> , A20 <sub>860</sub> , A20 <sub>940</sub> , A20 <sub>995</sub> , A20 <sub>1410</sub> , A20 <sub>1605</sub>
OPK-01 (K01)	K01 <sub>540</sub> , K01 <sub>645</sub> , K01 <sub>680</sub> , K01 <sub>785</sub> , K01 <sub>1105</sub> , K01 <sub>1455</sub> , K01 <sub>1720</sub> , K01 <sub>1945</sub>
OPP-09 (P09)	P09 <sub>440</sub> , P09 <sub>495</sub> , P09 <sub>525</sub> , P09 <sub>565</sub> , P09 <sub>635</sub> , P09 <sub>675</sub> , P09 <sub>745</sub> , P09 <sub>805</sub> , P09 <sub>940</sub> , P09 <sub>1005</sub> , P09 <sub>1120</sub> , P09 <sub>1395</sub>
OPX-01 (X01)	X01 <sub>345</sub> , X01 <sub>370</sub> , X01 <sub>420</sub> , X01 <sub>435</sub> , X01 <sub>445</sub> , X01 <sub>460</sub> , X01 <sub>515</sub> , X01 <sub>635</sub> , X01 <sub>690</sub> , X01 <sub>735</sub> , X01 <sub>950</sub> , X01 <sub>1420</sub> , X01 <sub>1700</sub>
OPZ-12 (Z12)	Z12 <sub>545</sub> , Z12 <sub>565</sub> , Z12 <sub>585</sub> , Z12 <sub>615</sub> , Z12 <sub>645</sub> , Z12 <sub>830</sub> , Z12 <sub>915</sub> , Z12 <sub>1625</sub> , Z12 <sub>2445</sub>
<b>ISSR</b>	
UBC-818 (818)	818 <sub>290</sub> , 818 <sub>305</sub> , 818 <sub>395</sub> , 818 <sub>455</sub> , 818 <sub>490</sub> , 818 <sub>505</sub> , 818 <sub>545</sub> , 818 <sub>600</sub> , 818 <sub>655</sub> , 818 <sub>660</sub> , 818 <sub>720</sub> , 818 <sub>870</sub>
UBC-824 (824)	824 <sub>645</sub> , 824 <sub>660</sub>
UBC-836 (836)	836 <sub>205</sub> , 836 <sub>225</sub> , 836 <sub>280</sub> , 836 <sub>335</sub> , 836 <sub>350</sub> , 836 <sub>695</sub> , 836 <sub>880</sub>
ISSCR-04 (CR4)	CR4 <sub>305</sub> , CR4 <sub>450</sub> , CR4 <sub>520</sub> , CR4 <sub>620</sub> , CR4 <sub>700</sub> , CR4 <sub>780</sub> , CR4 <sub>835</sub>

#### Список использованных источников

1. Алексеев, Ю.Е. Травянистые растения / Алексеев Ю.Е., Вехов В.Н., Гапочка Г.П. и др. // СССР. – М.: Мысль, 1971. – Т.1. – 488 с.
2. Dempster, E.L. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D., Young J.E., Rogers H.J. // Biotechniques. – 1999. – V. 27(1). – P. 66–68.
3. Poyraz, I. An efficient DNA isolation method from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) seeds for RAPD and ISSR analysis / I. Poyraz // Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, Cilt: 1, Sayı:1, 2014. – P. 22-27.
4. Prevost, A. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars / Prevost A., Wilkinson M.J. // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – V. 98. – P. 107–112.