

# ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 577.21:631.52

## ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ

М.М. Воробьёва, А.Д. Пошелюк

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, vorobjeva.m@polessu.by

ДНК-штрихкодирование (ДНК-паспортизация, ДНК-баркодинг) – метод корректной видовой идентификации живых организмов по коротким генетическим маркерам в ДНК. На сегодняшний день, молекулярно-генетические подходы нашли широкое применение в флористических и фаунистических исследованиях и являются эффективным дополнением классических подходов.

Разработчиком концепции и крупнейшим мировым лидером в области ДНК-штрихкодирования живых организмов выступает Институт биоразнообразия в Онтарио (Канада). На базе этого института создана и постоянно пополняется Глобальная база данных ДНК-штрихкодов живых организмов (BOLD). Американским национальным центром биотехнологической информации также разработана база данных нуклеотидных последовательностей – GenBank. Она является бесплатной, общедоступной и содержит последовательности ДНК, РНК и белков, снабженных литературными ссылками и различной биологической информацией.

К категории редкие виды принадлежат растения, имеющие низкую численность и ограниченный ареал, тем не менее они являются составной частью биоразнообразия нашей страны, в связи с чем возникает необходимость в сохранении ценного генофонда. В последние годы в Беларуси и сопредельных ей регионах для скрининга видового разнообразия растений используют метод ДНК-штрихкодирования, в частности корректную идентификацию видовой принадлежности производят по небольшому фрагменту ткани, на самой ранней стадии развития растения, по семенам или гербарному материалу. Применительно к растениям в настоящее время наиболее востребованы ядерные спейсеры — ITS1 и ITS2, пластидные гены – *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* [1].

Поскольку изучение редких видов растений и сохранение их биологического разнообразия является приоритетным направлением Республики Беларусь на 2021–2025 гг. (указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г.) в рамках нашего исследования было принято решение получить ДНК-паспорта для некоторых редких видов растений, занесенных в Красную книгу РБ. Сопровождение образцов редких видов растений ДНК-штрихкодом позволит исключить случаи неверного определения вида, обеспечит контроль чистоты образца и будет служить подтверждением качества биологического материала. Кроме того, определение маркерных ДНК последовательностей может быть полезным при уточнении таксономического статуса отдельных видов.

В качестве объектов исследования определены – зверобой горный (*Hypericum montanum*), дрок германский (*Genista germanica*), горичник олений (*Peucedanum cervaria*), берула прямая (*Berula erecta*), произрастающие на территории Беларуси и занесенные в Красную книгу, 2015 г. (таблица 1) [2].

Таблица 1. – Виды растений, произрастающие на территории Беларуси и занесенные в Красную книгу [2]

№	Вид		Категория охраны	
			РБ	МСОП
1	Зверобой горный	<i>Hypericum montanum</i>	III	VU
2	Дрок германский	<i>Genista germanica</i>	IV	VU
3	Горичник олений	<i>Peucedanum cervaria</i>	III	VU
4	Берула прямая	<i>Berula erecta</i>	III	LC

Образцы для исследования предоставил Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси.

Исследования проводились в лаборатории экологической генетики и биотехнологии, Государственного научного учреждения «Института генетики и цитологии Национальной Академии наук Беларуси». Для выделения использовали коммерческий набор Genomic DNA Purification Kit Thermo Fisher Scientific (USA) без внесения изменений. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически и по средствам электрофоретического разделения.

Для ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: буфер 10x, 25M MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 3% DMSO, 5U/μl Hi-Fi ДНК-полимераза; олигонуклеотиды (таблица 2). Продукты амплификации визуализировали в 1,5% агарозном геле. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе.

Таблица 2. – Праймеры для амплификации маркерных последовательностей, используемые в рамках настоящего исследования [3]

Название праймера	Последовательность праймеров	Размер ПЦР продукта, п.н.
rbcL	5'- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC -3' 5'- GTAAAATCAAGTCCACCGCG -3'	~654
ITS2	5'- ATGCGATACTTGGTGTGAAT -3' 5'- GACGCTTCTCCAGACTACAAT -3'	~494

В рамках настоящего исследования было принято решение оценить представленность ядерных спейсеров – ITS1 и ITS2, пластидных генов – rpoB, rpoC1, rbcL, matK, psbK-psbI, trnH-psbA, atpF-atpH в BOLD, для того чтобы выбрать маркеры, по которым будет осуществляться ДНК-штрихкодирование редких видов растений фауны Беларуси (таблица 3).

Таблица 3. – Оценка представленности последовательностей ядерных спейсеров и пластидных генов в BOLD растений фауны Беларуси, охваченных настоящим исследованием

Вид	Ядерные спейсеры		Пластидные гены							Страна-коллектор
	ITS1	ITS2	rpoB	rpoC1	rbcL	matK	psbK-psbI	trnH-psbA	atpF-atpH	
<i>Hypericum montanum</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	Великобритания, Италия и Дания
<i>Genistagermanica</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Германия, Италия, Россия, Франция, Польша, Швеция,
<i>Peucedanum cervaria</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Австрия
<i>Berula erecta</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	Узбекистан, Кыргызстан, Иран, Турция, Пакистан, Дания, Великобритания, США, Канада
Всего н.п.	4	24	0	0	14	7	0	1	0	

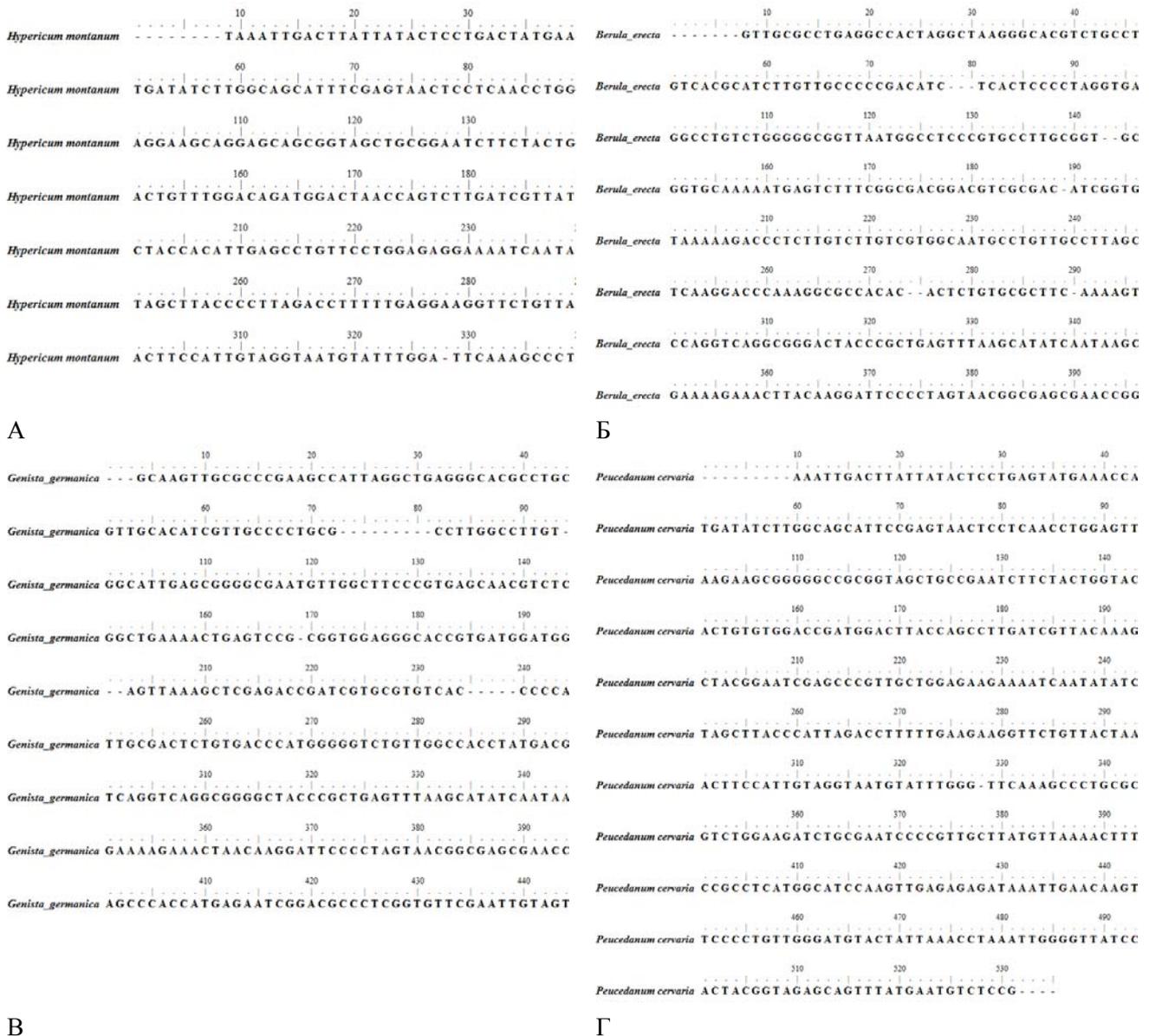
«+»– представлен в BOLD, «-»– отсутствует в BOLD

Среди анализируемых видов растений Беларуси наиболее хорошо представлен – *Berula erecta* (27 н.п.), недостаточно – *Peucedanum cervaria* (2 п.н.). Кроме того, необходимо отметить, что последовательности данных видов растений для Беларуси на сегодняшний день не депонированы в

BOLD [4] и GenBank [5]. Учитывая крайне недостаточную представленность в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей выше представленных растений, а также принадлежность этих растений к охраняемым видам на территории нашей страны, мы приняли решение получить ДНК-паспорта для *H. montanum*, *G. germanica*, *P. cervaria*, *B. erecta*, которые могут быть использованы для идентификации видов, каталогизирования таксонов, определения границ видов, а также изучения генетического полиморфизма.

ДНК-паспорта получены в результате расшифровки последовательностей ITS2 и rbcL, поскольку именно эти маркеры наиболее хорошо представлены в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей.

Результаты секвенирования последовательности rbcL для анализируемых видов растений представлены на рисунке 1.



А – зверобой горный (*Hypericum montanum*); Б – берула прямая (*Berula erecta*);  
В – дрок германский (*Genista germanica*); Г – горичник олений (*Peucedanum cervaria*)

**Рисунок 1. – ДНК-паспорта получены в результате расшифровки последовательностей rbcL**

Результаты секвенирования последовательности ITS2 для анализируемых видов растений представлены на рисунке 2.

10 20 30 40  
*Hypericum montanum* - ACGCAAGTTGGCCCGAAGCCCTCTGGCCGAGGGCACGCCCT  
60 70 80 90  
*Hypericum montanum* GTCACACATCGTCGCCCCCAAATTCGATATCTCGCCAGA  
110 120 130 140  
*Hypericum montanum* GGAAGAGGATGGCCGAAAATGGTCTCCCGTGGCTCCCGTT  
160 170 180 190  
*Hypericum montanum* GCCCAAAATGAGTTCTGGCAAAGCAAAGCCACGACCAGCG  
210 220 230 240  
*Hypericum montanum* AAGACCCTCGGTACAAGTCGTGAGCCTTGCATTGCTCGTAGG  
260 270 280 290  
*Hypericum montanum* GACCCTGAACGTGATCGAGTAACATCGAACACTCACAAGTG  
310 320 330 340  
*Hypericum montanum* TCAGCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCG  
360 370 380 390  
*Hypericum montanum* GAAACTAACAAAGGATTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGG  
410 420 430 440  
*Hypericum montanum* AGCTTGAAAATCGGATGCCCCAGGCGTTCGAATTGTAGTCTG  
  
*Hypericum montanum* TCAA

А

10 20 30 40  
*Peucedanum cervaria* GACGCAAGTTGGCCCGAAGCCACTAGGCCGAGGGCACGCTCT  
60 70 80 90  
*Peucedanum cervaria* GTCACGCATCGTCTTGCCCAAAACCACTCACACCTGAGAAAG  
110 120 130 140  
*Peucedanum cervaria* GTTTGGGGCGGAAACTGGCCCTCCCGTACCTTGTCTGTGGTT  
160 170 180 190  
*Peucedanum cervaria* AACGAGTCTCCGGCGACGGACGTCGCGACATCGGTGGTTGTA  
210 220 230 240  
*Peucedanum cervaria* TCTTGTCTTGTGGGGCAAACCTCGTCATCTTAGCGAGCTCC  
260 270 280 290  
*Peucedanum cervaria* TATGAGCACACACTCTGTGCGCTTCGACTGTGACCCAGGT  
310 320 330 340  
*Peucedanum cervaria* ACTACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG  
360 370 380 390  
*Peucedanum cervaria* AAGGATCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAACAGCCAC  
410 420 430 440  
*Peucedanum cervaria* ATTGGTCGGCTCTGCCGTCGGAATTGTAGTCTGGAGAAGCGT

В

10 20 30 40  
*Genista germanica* - -GCAAGTTGGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGCCCTG  
60 70 80 90  
*Genista germanica* GTTGCACATCGTTGCCCTGGCCCTTGGCTTGTGCTAGGCATT  
110 120 130 140  
*Genista germanica* GGCGAATGTTGGCTTCCCGTGGAGCAACGCTCTCAGGGTTGGCTGA  
160 170 180 190  
*Genista germanica* AGTCCGCGGTGGAGGGCACCGTGATGGATGGTGGATGAGTTAA  
210 220 230 240  
*Genista germanica* GACCGATCGTGCCTGTACCCCACTAGCTTTGGGACTCTGTGA  
260 270 280 290  
*Genista germanica* GGGGTCTGTTGGCCACCTATGACGGGAACCTCAGGTACGGCGGG  
310 320 330 340  
*Genista germanica* CGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAAC  
360 370 380 390  
*Genista germanica* TCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAGAGCCACCATGAGA  
410 420 430 440  
*Genista germanica* CGCCCTCGGTGTTGGAATTGTAGTCTGGAGA

Б

10 20 30 40  
*Berula erecta* - - - -GTTGCGCTGAGGCCACTAGGCTAAGGGCACGCTGCTCCT  
60 70 80 90  
*Berula erecta* GTCACGCATCTTGTGGCCCGACATCTCACTCCCTAGGTGAGCT  
110 120 130 140  
*Berula erecta* CTGTCTGGGGCGGTTAATGGCTCCCGTGCCTTGGGTGCGGTTG  
160 170 180 190  
*Berula erecta* AAAAAAGAGTCTTTCGGCGACGGACGTCGCGACATCGGTGGTTGTA  
210 220 230 240  
*Berula erecta* GACCCTCTTGTCTTGTGCTGGCAATGCCTGTTGCCTTAGCGAGCTC  
260 270 280 290  
*Berula erecta* ACCCAAAGGCGCCACACACTCTGTGCGTTCAAAAGTGACCCAGG  
310 320 330 340  
*Berula erecta* GCGGGACTACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAA  
360 370 380 390  
*Berula erecta* CTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAATTGGCC

Г

А – звербой горный (*Hypericum montanum*); Б –дрок германский (*Genista germanica*); В – горичник олений (*Peucedanum cervaria*); Г – берула прямая (*Berula erecta*)

**Рисунок 2. – ДНК-паспорта получены в результате расшифровки последовательностей ITS2**

Мы решили проверить достоверность полученных нами результатов секвенирования, путем сравнительного анализа расшифрованных нами нуклеотидных последовательностей rbcL и ITS2 с нуклеотидными последовательностями из NCBI. Эффективность определения составила 100% и 99,19% соответственно.

Таким образом, в результате исследования, получены ДНК-штрихкоды для 4 видов растений, занесенных в Красную книгу РБ, что сделано впервые. Эффективность определения последовательностей rbcL составила 100%, а ITS2 – 99,19%. В дальнейшем планируется депонировать последовательности rbcL и ITS2 в GenBank.

#### Список использованных источников

1. Barcoding of life: Беларусь – участник глобальной инициативы по ДНК-штрих-кодированию жизни / Н. В. Воронова [и др.] // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 167–171.
2. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. Энцыкл. ім.П. Броўкі, 2015. – 448 с.

3. Подбор маркеров для ДНК-баркодинга диких видов семейства *Orchidaceae* на примере *Anacamptis morio* L. / Н. В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – 2018. – Т. 24. – С 5–11.

4. NCBI BLAST [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 15.10.2021.

5. BOLD Systems [Electronic resource]: The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). – Mode of access: [http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public\\_Primer\\_PrimerSearch](http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch). – Date of access: 15.10.2021.