

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
”ПОЛЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ“

Кафедра биотехнологии

Допущено к защите
Заведующий кафедрой

Е.М. Волкова
2022

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему: «**Корректная идентификация редких видов растений методами
ДНК-штрихкодирования и ПЦР-ПДРФ анализа**»

Магистрант
Микробиология, 1 курс,
гр. 21М-МБ

_____ Анна Дмитриевна Пошелюк
(подпись) _____ 2022

Научный руководитель
доцент, к.б.н., доцент

_____ Мария Михайловна Воробьева
(подпись) _____ 2022

ПИНСК 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Современные методы корректной видовой идентификации растений и сохранения их генофонда.....	7
1.1.1 ДНК-штрихкодирование: преимущества и недостатки.....	7
1.1.2 ПЦР-ПДРФ анализ альтернатива ДНК-штрихкодированию.....	17
1.1.3 Международные генетические базы данных нуклеотидных последовательностей (GenBank и BOLD).....	21
1.2 Корректная видовая диагностика растений и способы сохранения видового разнообразия.....	28
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	31
2.1 Материалы исследования.....	31
2.2 Методы исследования.....	34
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	38
3.1 Оценка представленности лекарственных и декоративных видов покрытосеменных растений в Красной книге Республики Беларуси и BOLD.....	38
3.2 ДНК-паспортизация <i>H. montanum</i> , <i>G. germanica</i> , <i>P. cervaria</i> и <i>B. erecta</i>	40
3.3 Разработка ПЦР-ПДРФ ключей для идентификации некоторых редких видов растений Республики Беларусь.....	47
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	51
СПИСОК АВТОРСКИХ НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ.....	57
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	58

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время молекулярно-биологические исследования представляют собой интенсивно развивающуюся область, методы которой постоянно модернизируются и совершенствуются. Молекулярно-генетические подходы всё шире используются для решения задач классических направлений биологии. Молекулярно-генетический анализ оказывает ощутимую помощь в вопросах идентификации вида и контроля за природными популяциями [8, с. 12].

ДНК-штрихкодирование (баркодирование ДНК) – это метод молекулярной идентификации, который позволяет по коротким генетическим маркерам в ДНК определять принадлежность организма к определённому таксону в уже существующей классификации [60, с. 985].

Умение точно и эффективно определять видовую принадлежность исследуемых организмов очень важно и в эколого-генетических исследованиях. В основе молекулярных подходов лежит закономерность, согласно которой степень родства между живыми организмами обычно коррелирует с уровнем сходства в гомологичных последовательностях нуклеиновых кислот и белков. Данные методы не могут полностью вытеснить классические подходы, но способны эффективно их дополнить [8, с. 12-13].

Редкие виды растений – это виды растений, не находящийся под прямой угрозой вымирания, но имеющие низкую численность и распространены на ограниченной территории. Также данные виды являются составной частью биоразнообразия нашей страны. Как уникальные продукты эволюционного процесса и ценный генофонд требуют строгой охраны, следовательно, необходимо их изучение [59].

Для редких видов растений метод ДНК-штрихкодирования особенно актуален, так как позволяет производить скрининг видового разнообразия флоры, не снижая численности отдельных экземпляров редких видов, идентифицируя вид по небольшому фрагменту ткани, на самой ранней стадии развития растения, по семенам или гербарному материалу.

В качестве альтернативы методу ДНК-штрихкодирования, который многим может быть не доступен, предлагается использовать метод ПЦР-ПДРФ.

ПЦР-ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции (PCR – RFLP – polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) является широко известной технологией генотипирования и один из первых способов исследования геномной ДНК [37].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами:

Часть исследований получена в рамках указа Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021 – 2025 годы» (№ 156).

Цель исследования: получить ДНК-паспорта для ряда видов покрытосеменных растений (*Magnoliophyta*) класса двудольные (*Magnoliopsida*), произрастающих на территории Беларуси и занесённых в Красную книгу, а также разработать ПЦР-ПДРФ ключи для корректного уточнения таксономического статуса.

Задачи исследования:

1. Оценить представленность нуклеотидных последовательностей генов редких видов растений флоры Беларуси;
2. ДНК-паспортизация Зверобой горный (*Hypericum montanum*), Дрок германский (*Genista germanica*), Горичник олений (*Peucedanum cervaria*) и Берула прямая (*Berula erecta*), произрастающих на территории Беларуси и занесённых в Красную книгу;
3. Разработать ПЦР-ПДРФ ключи для уточнения их таксономического статуса.

Объект исследования: Зверобой горный (*Hypericum montanum*), Дрок германский (*Genista germanica*), Горичник олений (*Peucedanum cervaria*) и Берула прямая (*Berula erecta*).

Предмет исследования: результаты секвенирования последовательностей ITS и *gbcL*, и рестрикционные карты.

Положения, выносимые на защиту:

1. Нуклеотидные последовательности ядерного спейсера – ITS2 и пластидного генов – *gbcL* используются в качестве маркеров для ДНК-штрихкодирования зверобоя горного (*Hypericum montanum*), дрока германского (*Genista germanica*), горичника оленьего (*Peucedanum cervaria*), берулы прямой (*Berula erecta*) – занесённых в Красную книгу РБ, в виду их представленности в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей.
2. ДНК-паспорта, полученные для 4 видов растений: зверобой горный (*Hypericum montanum*), дрок германский (*Genista germanica*), горичник олений (*Peucedanum cervaria*), берула прямая (*Berula erecta*) – занесённых в Красную

книгу РБ, позволяют устанавливать корректную таксономическую принадлежность.

3. ПЦР-ПДРФ ключи, разработанные на основе анализа нуклеотидных последовательностей *rbcl* и *ITS2*, представленных в Международных генетических базах данных и расшифрованных в рамках настоящего исследования, позволяют идентифицировать анализируемые виды растений и выявлять конкретные гаплотипы *rbcl* для видов *Berula erecta* и *Genista germanica*, и гаплотипы *ITS2* для видов *Genista germanica*, *Hypericum montanum* и *Peucedanum cervaria*.

Апробация результатов диссертации и информация по использованию её результатов:

Результаты исследований, опубликованные в магистерской диссертации, были представлены на следующих конференциях:

1. V Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: достижения и перспективы развития» 25-26 ноября 2021, г. Пинск.
2. XVI Молодежная научно-практическая онлайн конференция «Потенциал молодежи – будущее Беларуси» 15 апреля 2022, г. Пинск.
3. IX Молодежная научно-практическая конференция студентов и магистрантов «Молодость. Интеллект. Инициатива» 23 апреля 2022, г. Витебск.

Опубликованность результатов диссертации:

1. Пошелюк, А. Д. Охраняемые лекарственные виды растений Беларуси и оценка представленности их BOLD / А. Д. Пошелюк, М. М. Воробьева // Культурная и дикорастущая флора Белорусского Полесья: сб. материалов Респ. студен. науч.-практ. конф., Брест, 18 нояб. 2020 г. / Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина; редкол.: Н. В. Шкуратова, Н.М. Матусевич, М. В. Левковская. – Брест: БрГУ, 2020. – С. 77-81.

2. Пошелюк, А. Д. ДНК-паспортизация некоторых редких видов растений фауны Беларуси / А. Д. Пошелюк, М. М. Воробьева // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов V международной научно-практической конференции, Пинск, 25-26 ноября 2021 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2021. – С. 4-8.

3. Пошелюк, А. Д. ДНК-штрихкодирование – скрининг видового разнообразия некоторых редких видов растений Беларуси / А. Д. Пошелюк, М. М. Воробьева // сборник статей XVI Международной молодежной научно-практической онлайн конференции «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси», г. Пинск, 15 апреля 2022 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2022. – С. 257-259.

4. Пошелюк, А. Д. Редкие виды растений Беларуси и оценка их представленности в BOLD / А. Д. Пошелюк, М. М. Воробьева // сборник статей IX Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов «Молодость. Интеллект. Инициатива» г. Витебск, 23 апреля 2022. – (в публикации)

5. Результаты научных исследований внедрены в учебный процесс.

Структура и объем диссертации:

Магистерская диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, приложения и списка источников литературы. Диссертация изложена на 70 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 16 рисунков. Список литературы включает 60 библиографических ссылок (из них 28 на английском языке). Список авторских публикаций насчитывает 4 статьи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что из 141 вида анализируемых растений, занесенных в Красную книгу РБ, 98 видов подлежат к классу Двудольные (Magnoliopsida) и 43 вида – классу Однодольные (Liliopsida). Большинство видов являются многолетними травами и принадлежат к мезофитам в условиях нашего региона.

На сегодняшний день, в BOLD наиболее хорошо представлены нуклеотидные последовательности ядерного спейсера – ITS2 и пластидного генов – *rbcl*, в связи с чем принято исследование использовать их в качестве маркера по которому будет осуществляться ДНК-штрихкодирование.

2. В результате исследования получены ДНК-паспорта для 4 видов растений: Зверобой горный (*Hypericum montanum*), Дрок германский (*Genista germanica*), Горичник олений (*Peucedanum cervaria*), Берула прямая (*Berula erecta*) – занесенных в Красную книгу РБ, что сделано впервые. Эффективность определения последовательностей через BOLD для пластидного генов *rbcl* составила 100%, а для ядерного спейсера ITS2 – от 100% до 99,19%.

3. На основе анализа нуклеотидных последовательностей *rbcl* представленных в Международных генетических базах данных и расшифрованных в рамках настоящего исследования были построены рестрикционные карты для двух видов растений – *Berula erecta* и *Genista germanica*, и на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITS2 для трёх видов растений – *Genista germanica*, *Hypericum montanum* и *Peucedanum cervaria*. Кроме того, разработаны ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие идентифицировать анализируемые виды растений и выявлять конкретные гаплотипы *rbcl* для видов *Berula erecta* и *Genista germanica*, и гаплотипы ITS2 для видов *Genista germanica*, *Hypericum montanum* и *Peucedanum cervaria*.