

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск, 28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок [и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

ПОДБОР МОЛЕКУЛЯРНЫХ IPBS И SCOT МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *HERMINIUM MONORCHIS*

Самохвалова Н. В.

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,
N. Samakhvalava@cbg.org.by

Резюме. Для сбора генетической информации о находящихся под угрозой исчезновения растений, например, об уровне и распределении генетической изменчивости внутри природных популяций и между ними, а также для облегчения процедуры отбора проб для сохранения редких видов необходимо использовать молекулярные маркеры. Для проведения молекулярных исследований популяций *Herminium monorchis* был произведен подбор iPBS и SCoT маркеров, которые будут использоваться для определения различных популяционных параметров, необходимых для выбора оптимальных стратегий сохранения данного вида. В результате было определено что наиболее подходящими маркерами являются 3 iPBS маркера (2375, 2272, 2078) и 3 SCoT маркера (S6, S29, S32), так как они позволили получить четкие фрагменты ДНК с полиморфными локусами.

SELECTION OF IPBS AND SCOT MOLECULAR MARKERS FOR ASSESSING THE GENETIC DIVERSITY OF *HERMINIUM MONORCHIS*

Samokhvalova N. V.,

Summary. Molecular markers should be used to collect genetic information about endangered plants, such as the level and distribution of genetic variation within and between natural populations, and to facilitate sampling for the conservation of rare species. To conduct a molecular study of *Herminium monorchis* populations, iPBS and SCoT markers were selected, which will be used to determine the various population parameters necessary to select the optimal conservation strategies for this species. As a result, it was determined that the most suitable markers are 3 iPBS markers (2375, 2272, 2078) and 3 SCoT markers (S6, S29, S32), as they made it possible to obtain clear DNA fragments with polymorphic loci.

Н*erminium monorchis* – один из 40 видов семейства Орхидные (*Orchidaceae*) занесенных в Красную книгу Республики Беларусь, имеет высокий национальный (1 категория природоохранной значимости) и международный (CR) охранный статус и занесен в Приложение II к Конвенции СИТЕС. *H. monorchis* это многолетнее травянистое растение с небольшим округлым обычно одиночным клубнем. Стебель высотой 8–30 см, при основании с двумя (редко тремя) ланцетными или продолговато-яйцевидными сидячими листьями длиной до 10 см. Цветки мелкие, желтовато- или беловато-зеленые, с резким медовым запахом, собраны в многоцветковое колосовидное соцветие. Энтомофил. Размножение семенное и вегетативное. Анемохор. Является микосимбионтом [1].

Для определения текущих уровней и моделей генетического разнообразия внутри и между популяциями исчезающих и редких видов растений, выбора оптимальных стратегий сохранения и приоритетных популяций для которых следует принять срочные меры по сохранению, необходимо проводить молекулярно-генетические исследования. Кроме того, генетические исследования необходимы, когда оценку риска вымирания трудно сделать только на основе экологических и демографических данных [2, 3]

Системы ДНК маркеров считаются лучшими инструментами для определения генетического разнообразия видов, так как они демонстрируют высокий полиморфизм и не зависят от факторов окружающей среды, в отличии от морфологических маркеров [4].

В настоящее время существуют различные маркеры на основе ДНК для генетического анализа популяций растений. В данном исследовании используются SCoT и iPBS маркеры.

SCoT являются доминантными и воспроизводимыми маркерами, которые основаны на короткой консервативной области в генах, окружающей кодон инициации трансляции ATG. Для анализа ПЦР используют один 18-мерный праймер [5].

Еще один тип доминантных ДНК маркеров это iPBS, который основан на LTR-ретротранспозонах. Ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (LTR) хорошо подходят в качестве молекулярных маркеров. Как общая структура ретротранспозонов, так и домены, ответственные за различные фазы их репликации, высоко консервативны у всех эукариот, поэтому iPBS маркеры могут быть применены ко всем видам эукариотических организмов [6].

Маркеры визуализируются стандартным гель-электрофорезом с агарозными гелями и окрашиванием, что делает эти маркеры подходящими для подавляющего большинства лабораторий по исследованию растений со стандартным оборудованием.

Сбор образцов *H. monorchis* для подбора молекулярных маркеров проводили из двух популяций: 1-я популяция находится в окрестностях озера Мурого в Ушачском районе Витебской области, 2-я популяция расположена недалеко от д. Церковно, Верхнедвинский район Витебская область (рис. 1).



Рис. 1. Точки сбора образцов *H. monorchis*: окрестности озера Мурого в Ушачском районе Витебской области (MR), д. Церковно, Верхнедвинский район Витебская область (CR)

Учитывая особенности размножения *H. monorchis*, а именно способность к вегетативному размножению, сбор листьев производили с растений, расположенных на расстоянии не менее 1.5 метра друг от друга, чтобы избежать отбора генетически идентичных образцов.

Для проведения ПЦР с использованием молекулярных маркеров, из литературных источников выбрано 25 SCoT маркеров (S1, S3, S4, S6, S8, S9, S10, S11, S13, S14, S16, S17, S18, S19, S21, S23, S24, S25, S27, S28, S29, S31, S32, S35, S36) [7] и 30 iPBS маркеров (2074, 2389, 2373, 2277, 2376, 2375, 2377, 2378, 2383, 2374, 2095, 2083, 2237, 2239, 2272, 2077, 2232, 2390, 2273, 2394, 2220, 2242, 2076, 2271, 2415, 2078, 2080, 2081, 2270, 2079) [6].

ПЦР с iPBS маркерами проводили в 25 μ L реакционной смеси, содержащей 25–50 нг ДНК, 5 μ L готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген), 5 μ M праймера и воды. Программа ПЦР состояла из: 1 цикла при 94 °C в течение 5 мин; 35 циклов при 94 °C в течение 60 с, 50–65 °C (в зависимости от праймера) в течение 60 с и 68 °C в течение 60 с; финальная элонгация 72 °C в течение 5 мин.

ПЦР с SCoT маркерами проводили в 25 μ L реакционной смеси, содержащей 25–50 нг ДНК, 5 μ L готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген), 5 μ M праймера и воды. Программа ПЦР состояла из: 1 цикла при 94 °C в течение 5 мин; 40 циклов при 94 °C в течение 60 с, 50–57 °C (в зависимости от праймера) в течение 60 с и 68 °C в течение 60 с; финальная элонгация 72 °C в течение 5 мин.

Аmplификации проводили в программируемом терморегуляторе C1000 Touch Thermal Cycler (MJ Research Inc., Bio-Rad Laboratories, США). Электрофорез проводили при напряжении 75V 2 часа в 1.5 % агарозном геле. Окрашивание геля проводили бромидом этидия

в течении 30 минут и визуализировали с использованием системы UV Imager Gel Doc XR + (Bio-Rad, США).

В результате работы наиболее подходящими маркерами для дальнейшего исследования генетического разнообразия популяций *H. monorchis* были выбраны 3 iPBS маркера (2375, 2272, 2078) и 3 SCoT маркера (S6, S29, S32). Результаты электрофореза ПЦР с маркерами 2272 и S6 представлены на рисунке 2.

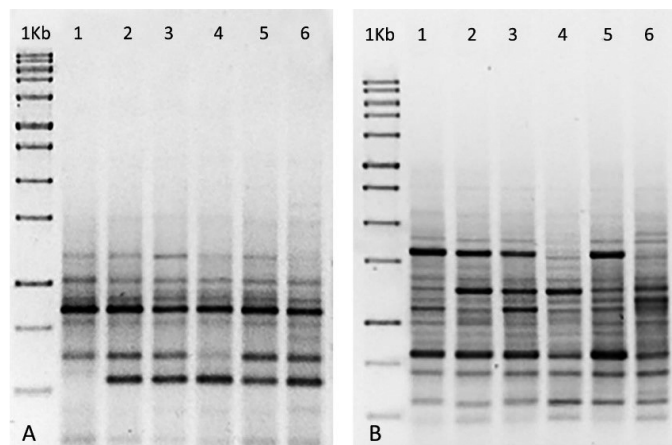


Рис. 2. Электрофорез результатов ПЦР с использованием 2272 iPBS праймера (А) и S6 SCoT маркера (В) для популяции *H. monorchis* из Ушачского района Витебской области (1-6 дорожки). Первая дорожка - маркер молекулярного веса 1Кб

Маркеры 2375, 2272, 2078, S6, S29 и S32 выбраны для изучения генетического разнообразия и генетической дифференциации *H. monorchis*, так как позволили получить четкие фрагменты ДНК с полиморфными локусами.

Список литературы

1. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / М-во природ. ресурс. и охран. окруж. среды Респ. Беларусь, Нац. акад. наук Беларуси; гл. редкол.: И. М. Качановский (предс.) [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. – 448 с.
2. Martínez-León T., Clark-Tapia R., Campos J. E., Peinado-Guevara L. I., Campista-León S., Molina-Freaner E., Pacheco-Cruz N., González-Adame G., José Von Thaden Ugalde J., and Alfonso-Corradó C. A Change in Conservation Status of *Pachyphytum caesium* (Crassulaceae), a Threatened Species from Central Mexico Based on Genetic Studies // *Biology* (Basel). – 2022. – Vol. 11, № 3. – 379 p.
3. Thomas W. J. W., Anthony J. M., Dobrowolski M. P., Krauss S. L. Optimising the conservation of genetic diversity of the last remaining population of a critically endangered shrub // *AoB PLANTS*. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. plab005.
4. Samantaray S., Ngangkham U. Evaluation of Genetic Diversity in *Chlorophytum borivilianum* (Santp. and Fernan.) Using Molecular Markers: An Endangered Medicinal Plant // *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. – 2017.
5. Zhang J., Xie W., Wang Y., Zhao X. Potential of Start Codon Targeted (SCoT) Markers to Estimate Genetic Diversity and Relationships among Chinese *Elymus sibiricus* Accessions // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 4. – P. 5987–6001.
6. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – Vol. 121, № 8. – P. 1419–1430.
7. Collard, B.C.Y., Mackill D. J. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants // *Plant Mol Biol Rep.* – 2008. – Vol. 27, № 1. – P. 86.