

УДК 60
ББК 30.16
Б63

Редакционная коллегия:
Шебеко К.К. (гл. редактор),
Волкова Е.М., Жерносеков Д.Д., Кручинский Н.Г., Пигаль П.Б.,
Русина Ю.Н., Цвирко Л.С., Чешевик В.Т.

Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов II международной научно–практической конференции, УО “Полесский государственный университет”, г. Пинск, 7–8 декабря 2017 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2017. – 121с.

ISBN 978–985–516–503–4

Приведены материалы участников II международной научно–практической конференции “Биотехнология: достижения и перспективы развития”.
Материалы изложены в авторской редакции.

УДК 60
ББК 30.16

ISBN 978–985–516–503–4

© УО “Полесский государственный университет”, 2017

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

¹ЮХИМУК Андрей Николаевич, научный сотрудник лаборатории прикладной биохимии

²ЛЕ НГУЕН ТХАНЬ, директор

¹СПИРИДОВИЧ Елена Владимировна, к.б.н., доцент, заведующий лабораторией прикладной биохимии

¹ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

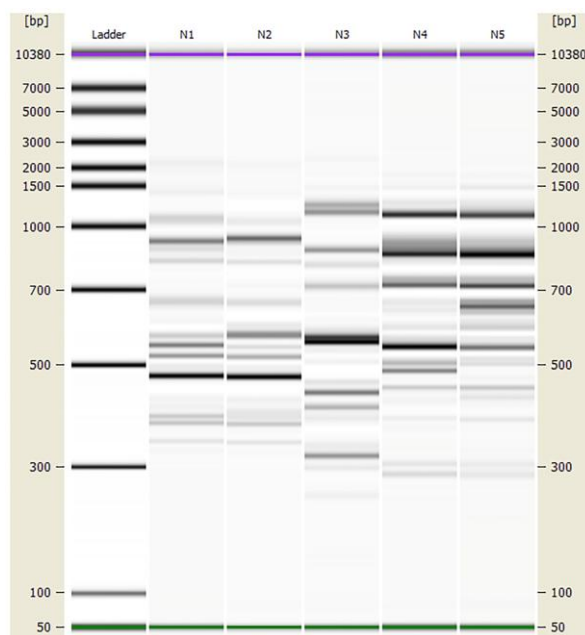
²Институт морской биохимии Вьетнамской академии наук и технологий

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.



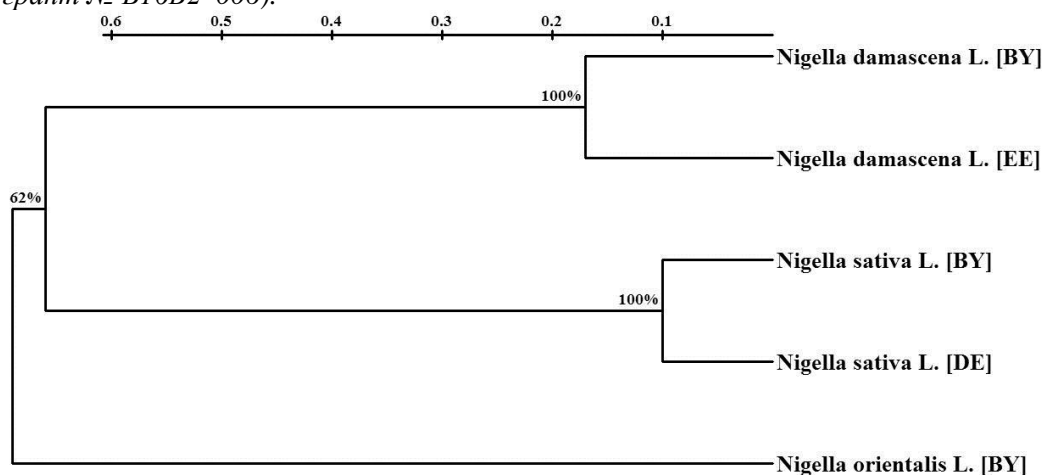
N1 – *Nigella sativa* L. [BY], N2 – *Nigella sativa* L. [DE], N3 – *Nigella orientalis* L. [BY], N4 – *Nigella damascena* L. [BY], N5 – *Nigella damascena* L. [EE].

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

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.