

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА *ALLIUM URSINUM* L. ИЗ ОТДАЛЕННЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЙ

А. А. Горбацевич, З. Е. Грушецкая, О. В. Дзюбан

Умение точно и эффективно определять видовую принадлежность исследуемых организмов очень актуально в эколого-генетических исследованиях. Вопросы эффективной идентификации видов различных организмов, а также отслеживания их филогенетических отношений вызвали интерес на всем протяжении развития биологической науки [1]. Изучение разнообразия видов *Allium ursinum* L. на молекулярно-генетическом уровне позволит решить главную проблему в поддержании биоразнообразия – стать решающим аргументом для таксономической дифференциации вида.

Таким образом, **цель настоящей работы** – провести молекулярно-генетический анализ подвидов *Allium ursinum* L., произрастающих в странах Европы, в том числе в Беларуси.

### **Задачи работы:**

1. Проанализировать литературные данные о распространении и таксономическом статусе подвидов *Allium ursinum* L.
2. Собрать коллекцию образцов для выделения ДНК из отдаленных мест произрастания на территории Европы и несколько популяций на территории Беларуси.
3. Выделить ДНК из материала.
4. Поставить ISSR-ПЦР-реакции, разделить ПЦР-продукты в агарозном геле с помощью электрофореза.
5. Оценить полиморфизм образцов вида *Allium ursinum* L. из отдаленных мест произрастаний на территории Европы.

**Объектом исследования** является Лук медвежий (черемша) – *Allium ursinum* L. Это пищевое и лекарственное растение, содержащее много аскорбиновой кислоты. Растение занесено в Красную книгу Республики Беларусь и имеет 3 категорию охраны [2]. В настоящее время все более остро стоит проблема в сохранении *Allium ursinum* L., а именно решение вопроса что сохранять и как отбирать то, что нуждается в сохранении в первую очередь. Оценку степени угрозы генофондам, а также разработку стратегии защиты генетического разнообразия можно получить благодаря **молекулярно-генетическим подходам**.

Уровень генетического полиморфизма растений наиболее эффективно определяется с помощью ДНК-маркеров. Молекулярные маркеры представляют собой полиморфные последовательности ДНК. Вне зависимости от деталей методики результатом эксперимента будет набор фрагментов ДНК, число которых и электрофоретическая подвижность различаются между генотипами. Идеальной является ситуация при которой каждый генотип характеризуется своим набором фрагментов. Определение профиля фрагментов ДНК получило название генетический **фингерпринтинг**. Чем больше совпадающих фрагментов в полученных профилях, тем более родственны исследуемые генотипы [3]. Для проведения исследования нами был выбран ISSR-анализ как один из наиболее доступных, быстрых и воспроизводимых методов, так как он не требует предварительных знаний о последовательности ДНК и не требует использования радиоактивных меток [4].

Для грамотной оценки молекулярно-генетических результатов ISSR-ПЦР анализа *Allium ursinum* L. авторы работы воспользовались литературными данными, описывающими морфологию вида. Итак, по результатам авторов [5–8] выделяются следующие два подвида медвежьего лука, которые отличаются структурой цветоножек: у *Allium ursinum* L. subsp. *ursinum* цветоножки довольно густо покрыты папиллами. Данный подвид встречается в северной и западной частях общего ареала вида. *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum* Kleop. et Oхner имеет гладкие цветоножки без папилл. Произрастает в южной и восточной частях ареала вида. В месте контакта подвидов отмечены популяции, имеющие промежуточные признаки и, по-видимому, возникающие при гибридизации *Allium ursinum* L. subsp. *ursinum* и *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum*. Такие промежуточные по морфологии популяции (*intermediate*) были отмечены в Чехии и Польше.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения анализа ДНК-полиморфизма были взяты 9 популяций *Allium ursinum* L., произрастающих на территории Беларуси (4 образца из Минской области, Любанского района; Гомельской области Кормянского и Лельчицкого районов и Витебской области Миорского района) и за ее пределами (страны: Дания, Франция, Сербия, Венгрия, Украина). Кроме того, для последующего статистического анализа данных и построения филогенетического дерева р. *Allium* была использована аут-группа *Allium cepa* L.

**Выделение геномной ДНК** проводилась методом с использованием готового набора для выделения ДНК «Нуклеосорб».

**Для проведения ПЦР** использовали 8 коммерческих декамерных праймеров (ОДО «Праймтех»), которые давали максимальное число фрагментов амплификации по результатам предварительных исследований. Выделенная ДНК была оценена на качество протекания ПЦР-реакции. Результаты ПЦР проанализированы с помощью электрофоретического разделения продуктов в агарозном геле. Продукты ISSR-анализа визуализировались окрашиванием бромистым этидием с помощью гельдокументирующей системы Fusion Fx / Vilber Lourmat.

#### **Статистический анализ данных**

Построение дерева осуществлялось с помощью метода ближайших соседей (neighbor-joining) [9] вероятность топологии дендрограммы подержана значениями bootstrap, указанными в узлах кластеров. Расчет дистанций и построение дендрограммы, отражающей филогенетические связи между образцами, проводились при помощи программы TREECON for Windows v.1.[10].

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОСУЖДЕНИЯ**

ДНК-анализ по ISSR-маркерам показал, что популяции медвежьего лука сгруппированы в 2 крупных кластера, которые, в свою очередь, подразделяются на более-менее обособленные субкластеры (рис. 1).

Вероятность топологии дендрограммы подтверждена значениями bootstrap в узлах кластеров. Обособившиеся крупные кластеры с высокой вероятностью (100 %) соответствуют морфологическим подвидам *Allium ursinum* L. subsp. *ursinum* и *Allium ursinum* L. subsp. *ucrainicum*. Кластер 1 филогенетического дерева (рис. 1) представлен растениями, произрастающими на юге-востоке Беларуси (Любанский район Минской области, Кормянский и Лельчицкий районы Гомельской области) и в южных странах Европы (Сербия, Украина, Венгрия). Эти образцы соответствуют подвиду *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum*. Кластер 2 (рис. 1) представлен представителями, произрастающими в дикорастущих условиях на территории северо-западных стран Европы – Дании и Франции, так же к этому кластеру относится северный образец, собранный на территории Республики Беларусь в Миорском районе Витебской области. Образцы соответствуют подвиду *Allium ursinum* L. subsp. *ursinum*.

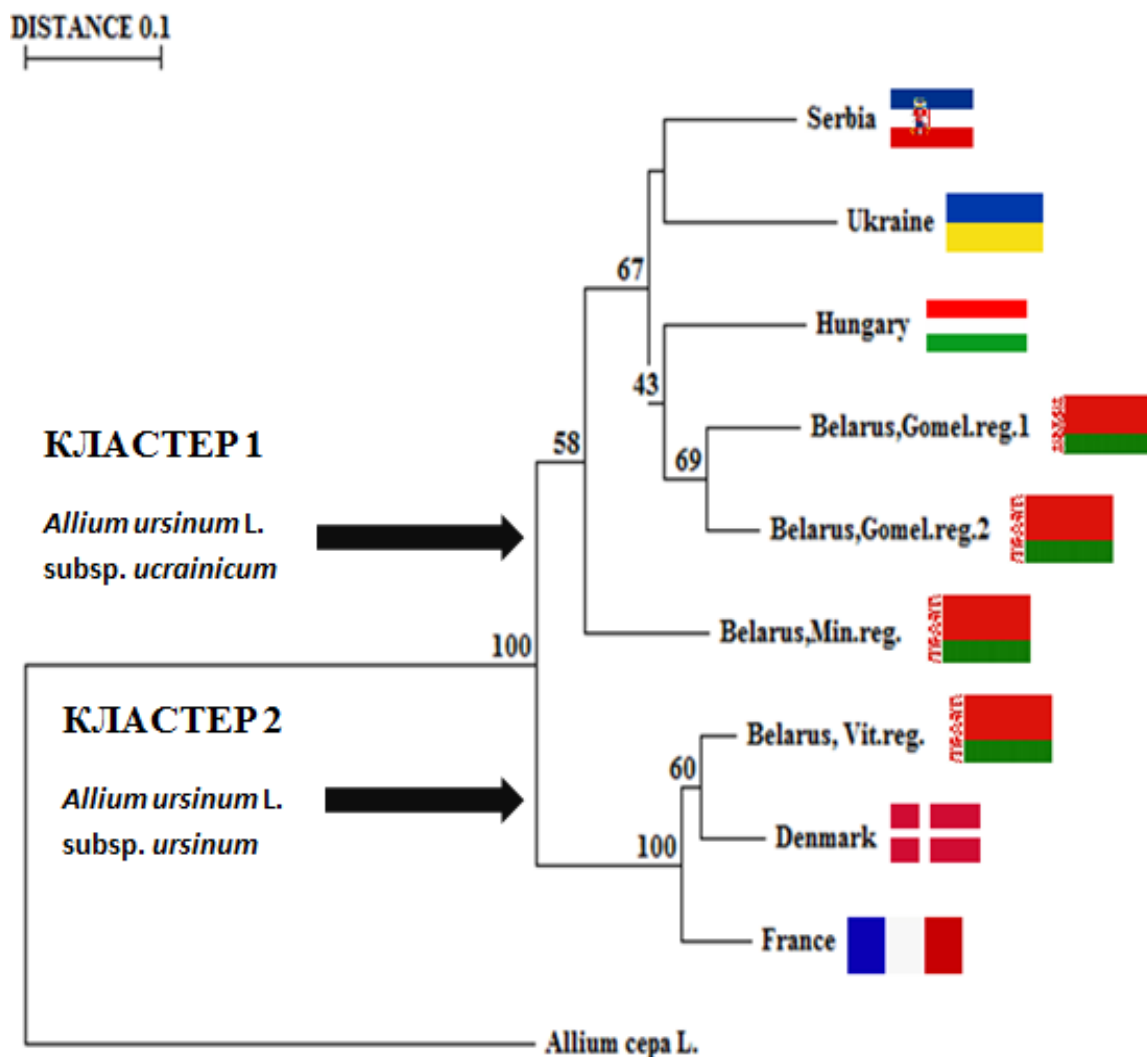


Рис. 1. Дендрограмма генетического сходства популяций, построенная на основании полиморфизма ISSR-маркеров *Allium ursinum* L.:  
шкала сверху – генетические дистанции;  
на дендрограмме в узлах кластеров указаны значения бутстрепа (в %)

ISSR-фингерпринтинг для маркеров ISSR-22 и ISSR-23 представлен на рис. 2. Данные праймеры являются высокоинформативными, так как в результате амплификации с их использованием синтезируется паттерн фрагментов ДНК, отличающихся количеством и весом (от 7 до 12 фрагментов, длиной от 250 до 900 п.н.).

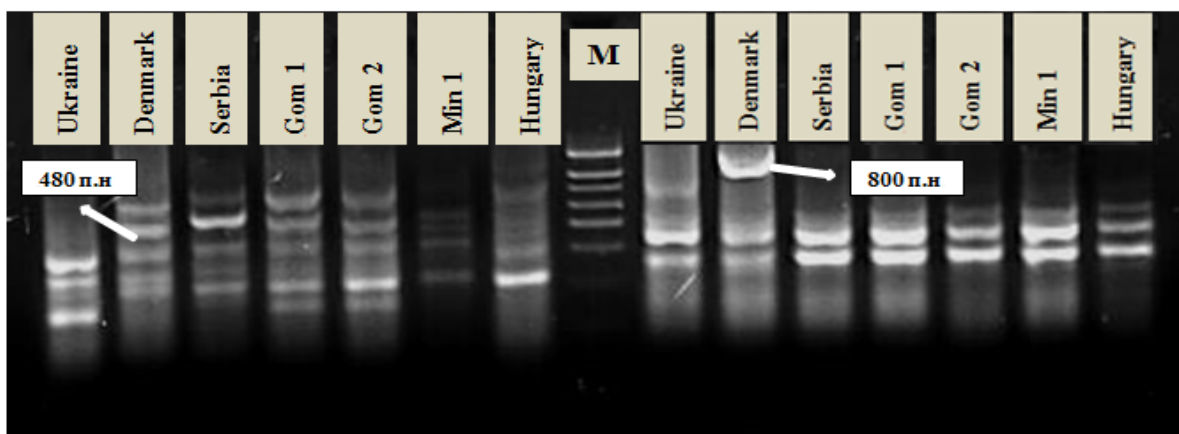


Рис. 2. ISSR-спектр *Allium ursinum* L. с праймерами ISSR-22 и ISSR-23: латинскими буквами обозначены каталожные номера и названия проб; М – маркер молекулярной массой 100 bp; стрелками указаны уникальные фрагменты ДНК для образца Denmark

Таким образом, проведенное изучение молекулярно-генетического анализа *Allium ursinum* L. на территории Республики Беларусь и за ее пределами, подтвердило наличие двух подвидов – *Allium ursinum* subsp. *ursinum* и *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum*, позволило выявить их географическую локализацию. Установлено, что в настоящее время *Allium ursinum* subsp. *ursinum* отмечен в северо-западных странах Европы и регионах Беларуси, а *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum* – на юго-востоке Беларуси и на юге Европы, что так же подтверждено и литературными данными.

### Литература

1. Spooner, D. Molecular markers for genebank management / D. Spooner, R. van Treuren, M.C. de Vicente // Technical Bulletin IPGRI. – Rome, 2005 – № 10. – P. 126.
2. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол. : И.М. Качановский (предс.), М.Е. Никифоров, В.И. Парфенов [и др.]. – 4-е изд. – Минск : Беларус. Энцикл. імя П. Броўкі. – 2015. – 448 с.
3. Рысков А. П., 1999. Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг в генетико-популяционных исследованиях биоразнообразия // Молекуляр. биология. Т. 33. № 6.
4. Хлесткина, Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044–1054.
5. Бордзиловский Е. И. *Allium* // Флора УРСР : в 12 т. Киев, 1950. Т. 3. С. 91–146.
6. Серегин А. П. Флористические материалы и ключ по лукам (*Allium* L., Alliaceae) Европейской России // Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол. 2005. Т. 110, вып. 1. С. 45–51 [Seregina A. P. Floral materials and manual key of *Allium* (*Allium* L., Alliaceae) of the European Russia. Byulleten' Mosk. obshchestva ispyt. prirody. Otd. biologicheskii. 2005. Vol. 110, issue 1. P. 45–51 (in Russ.)].
7. Stearn W. T. European species of *Allium* and allied genera of Alliaceae: a synonymic enumeration // Ann. Mus. Goulandris. 1978. Vol. 4. P. 83–198 [Stearn W. T. European

- species of *Allium* and allied genera of Alliaceae: a synonymic enumeration. Ann. Mus. Goulandris. 1978. Vol. 4. P. 83–198 (in Engl.).
8. Sojak J. Rozšíření plemen *Allium ursinum* L. v Československu // Preslia. 1968. Vol. 40. P. 294–298 [Sojak J. Rozšíření plemen *Allium ursinum* L. v Československu. Preslia. 1968. Vol. 40. P. 294–298 (in Engl.).]
  9. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4, № 4. P. 406–425 [Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4, No. 4. P. 406–425 (in Engl.)]
  10. Van de Peer, Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Applic. Biosci.— 1994.— Vol. 10.— P. 569–570.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ ЦИТОХРОМОВ P450 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (CYP121 И CYP128)

А. А. Добыш

Туберкулёз – хроническая инфекция, приводящая к поражениям органов дыхания, костей, суставов, кожи, мочеполовых органов и др. По данным Всемирной организации здравоохранения около двух миллионов человек в год умирает от этого заболевания. Возбудителями туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. Этот патогенный микроорганизм на данный момент является одним из наиболее опасных, несмотря на наличие вакцин и различных эффективных противомикробных препаратов.

На данный момент для лечения туберкулеза используются рифампицин и изониазид. Однако хотя эти препараты и снизили частоту заболеваний, появление новых устойчивых штаммов *Mtb* приводит к тому, что эти методы становятся неэффективными.

Поэтому актуальным направлением является выявление биохимических путей и макромолекул в *Mtb*, которые могут служить в качестве мишеней для новых анти-микобактериальных препаратов. В связи с этим, цитохромы P450 (CYP), которые содержатся в геноме *Mtb*, (около 20) позволяют предположить, что, по крайней мере, некоторые из них играют важную роль в жизнеспособности и вирулентности. Следовательно, изучение структуры и функций P450 (пространственная структура, метаболический профиль, поиск изоферментных различий резистентных и нерезистентных микобактерий), является перспективным направлением в области разработки новых лекарственных средств для лечения туберкулеза.

Изоформа CYP121 (микоциклозинсинтаза) – первый микобактериальный фермент из группы цитохромов P450 с идентифицированным