

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ БЕЛАРУСИ НА ПРИМЕРЕ *POLYPODIUM VULGARE L.* И *ALLIUM URSINUM L.*

О. В Дзюбан

Сохранение биологического разнообразия занимает особое место среди глобальных проблем современности. Основой биологического разнообразия является его генетическая компонента. Сокращение видо-вого и генетического разнообразия представляет реальную угрозу для биосферы, поскольку устойчивость воспроизводства природных экосистем и агроэкосистем непосредственно связана с их генетически обусловленным потенциалом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Изучение генетического разнообразия селекционного материала, образцов коллекций генбанков и диких видов растений проводится с помощью молекулярно-генетических маркеров, и позволяет получить так называемые генетические фингерпринты – набор маркеров определенного размера, уникальный для изучаемого образца. Генетическая паспортизация линий и сортов сельскохозяйственных культур с помощью ДНК-маркеров принята в ряде стран, в том числе и в Республике Беларусь. Проведение аналогичных исследований генофонда редких и исчезающих видов не менее важно, поскольку позволит как оценить внутривидовой полиморфизм, так и создать типичные «генетические паспорта» для охраняемых видов растений с целью поддержания и сохранения биоразнообразия.

Многие виды охраняемых на территории Беларуси растений являются сложными комплексами внутри- и надвидовых таксонов. Изучение этих видов на молекулярно-генетическом уровне позволит решить главную проблему в поддержании биоразнообразия – отбор наиболее типичных представителей популяций и создание генетически обоснованных программ по их сохранению, а также стать решающим аргументом для таксономической дифференциации объектов исследования.

Многие охраняемые растения (*Pulsatilla pratensis s.l.*, *Cotoneaster melanocarpus s.l.*, *Prunus spinosa s.l.*, *Trapa natans s.l.*, *Gentianella amarella s.l.*, *Allium ursinum s.l.*, *Gymnadenia conopsea s.l.* и др.) относятся к группам, в которых на сегодняшний день весьма активно протекают эволюционные процессы. Зачастую имея послеледниковое происхождение, такие группы, наряду с реликтовыми видами, наиболее адекватно отражают направления миграционных потоков при формировании флор и процессы флорогенеза на ограниченных территориях.

*Allium ursinum* L. – Черемша – широко распространенный в Европе вид. На территории Беларуси этот реликтовый, по происхождению средневропейский вид находится на северо-восточной границе равнинной части ареала. Произрастает черемша по всей территории республики в тенистых широколиственных и широколиственно-еловых лесах, вблизи рек и ручьев, по окраинам болот (Красная книга..., 2005). На территории Европы данный вид представлен двумя подвидами: *Allium ursinum* subsp. *ursinum* и *Allium ursinum* [1]. В Беларуси внутривидовая дифференциация черемши не изучалась, хотя по территории республики должна проходить граница распространения этих двух подвидов. Так, к примеру, на территории Украины распространен только subsp. *ucrainicum* [2], тогда как в Литве – только типовой подвид [3].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка методики идентификации и паспортизации генофондов видов растений, относящихся к охраняемым видам флоры Республики Беларусь, и выявление закономерностей их морфолого-генетической дифференциации.

## ЗАДАЧИ

1. Выбор модельных групп растений.
2. Сбор популяционного материала по изучаемым комплексам и изучение их внутри- и межпопуляционной изменчивости.
3. Определение наиболее полиморфных стабильных ДНК-маркеров и разработка методов оценки полиморфизма геномной ДНК на основе ISSR-маркеров с целью оптимизации исследования генофондов растений.
4. Установление видового и внутривидового состава изучаемых групп.

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и /или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых локусах гомологичных хромосом [4]. ISSR-маркеры (англ. Inter Simple Sequence Repeats) – это неспецифические ПЦР-маркеры, праймером для полимеразной цепной реакции которых служит микросателлитная последовательность. Продукты ISSR амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера. Микросателлиты (или простые короткие повторы) – это варьирующие участки в ядерной ДНК и ДНК ор-

ганелл, состоящие из повторяющихся фрагментов длиной от 1 до 6 пар оснований. Используются как молекулярные маркеры в определении родства, принадлежности к конкретной популяции, для исследования гибридизации. Микросателлитные последовательности небольшой длины используются также при картировании геномов в работе с редкими видами. Нами был выбран ISSR-анализ как один из наиболее доступных, быстрых, воспроизводимых и не требующих использования радиоактивных меток. Амплифицированные продукты обычно составляют 200 – 2000 п.н. и могут быть выявлены с использованием как агарозного, так и полиакриламидного электрофореза. [5]

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы десяти видов редких растений, отработка методики производилась на растениях из семейства *Polypodiaceae* (на многоножке обыкновенной (*Polypodium vulgare L.*)) и *Liliaceae* (на луке медвежьем (*Allium ursinum L.*)). Зеленая масса многоножки обыкновенной была взята из пяти различных популяций: с Кавказа (Краснодарский край, окр. д. Пшада), из западной части Беларуси (Воложинский р-н, окр. д. Юржишки), из Брестской области (окр. д. Орехово), Витебской области, изъятые из дикой природы и культивируемые сейчас в ЦБС и на ботанических площадках БГУ. Для исследования морфологических структур был проанализирован гербарий НАН РБ и БГУ. Черемша была взята из двух мест произрастаний: из Минской области на приусадебном участке в окр. г. Осиповичи и из Березинского заповедника.

Для выделения использовали 100 мг листьев индивидуальных растений. Для каждого индивидуального растения брали 2 повторности для избегания артефактов и оценки генетической неоднородности. Растительный материал измельчали в присутствии ТЕ-буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA), суспензировали в 400 мкл экстракционного буфера (Lysis solution, из набора Genomic DNA Purification Kit, #K0512, фирмы Thermo scientific). Образцы инкубировали 15 мин при 65<sup>0</sup>С. После экстракции хлороформовой смесью (по 600 мкл) супернатант переносили в другие пробирки. ДНК осаждали добавлением 0,6–0,8 объема изопропилового спирта с последующим центрифугированием. Затем ДНК промывали в 70%-ном этиловом спирте, подсушивали и растворяли в ТЕ буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA). Качество и чистоту полученной ДНК анализировали в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Концентрацию ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 *pro*.

Адаптирование методик производилось для каждой из культур. Для ПЦР использовали 7 коммерческих декамерных праймеров (ОДО «Праймтех», табл. 1), которые давали максимальное число фрагментов амплификации по результатам предварительных исследований.

ПЦР-реакция проводилась по следующей схеме: реакционная смесь включала от 50 до 100 нг геномной ДНК, по 0,25 mM прямого и обратного праймера, 0,2 mM каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, от 1,5 до 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> и 1 единицу Taq-полимеразы в инкубационном буфере. Нуклеотидная последовательность использованных праймеров, температура отжига и размер ПЦР-продукта представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для выявления полиморфных локусов**

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'-3')	Температура отжига, °C
ISSR-04	(ac) <sub>8</sub> ag	57
ISSR-09	(atg) <sub>6</sub>	52
ISSR-10	(gaa) <sub>6</sub>	57
ISSR-17	(gaca) <sub>4</sub>	58,3
ISSR-22	(ac) <sub>8</sub> aa	52
ISSR-23	(ac) <sub>8</sub> ta	54
ISSR-24	(ac) <sub>8</sub> tc	58,3

Условия проведения реакции: денатурация – 2 мин при 94<sup>0</sup>C; циклы 2 – 35: 30 сек. при 94<sup>0</sup> C, 45 сек. при 56–60<sup>0</sup>C в зависимости от праймера и 1 мин 30 сек при 72<sup>0</sup>C; цикл 36 – 5 мин при 72<sup>0</sup>C.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В результате ISSR-анализа коллекции папоротников *Polypodium vulgare* и черемшы *Allium ursinum* было получено по 21 полиморфному продукту амплификации. Количество информативных амплифицируемых фрагментов в зависимости от праймера колебалось от 2 до 9, их размеры варьировали от 250 до 1600 пн. Уровень полиморфизма для всех образцов коллекции составлял от 33 % до 100 % (в среднем 68, 5 % для многоножки и 78,8 % для лука медвежьего) (табл. 2, табл. 3). В то время уровень полиморфизма контрольных групп томатов и перцев с использованием праймера ISSR 09 составил лишь 11 % и 14 % соответственно, что свидетельствует о намного более высоком полиморфизме диких видов растений по сравнению с культурными (табл. 4).

Степень полиморфизма, превышающая 20 %, говорит о межвидовом характере полиморфизма исследуемых растений, что подтверждается также и морфологическими данными. Так, полиподиумы характеризовались различной формой вайи, различной степенью заостренности отдель-

ных листочков (от длинных вытянутых до затупленных), различным количеством клеток кольца спорангия (9–12). По литературным данным было отмечено несколько признаков у исследуемых папоротников, сближающих их с *Polypodium interjectum*, широко распространенным в соседних государствах. Для черемши различающим морфологическим признаком послужило наличие и количество волосков на цветоножке (встречались как густоопушенные цветоножки, так и малоопушенные, и голые).

Таблица 2

**Сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК *Polypodium vulgare* с ISSR-праймерами**

Праймер	Количество ПЦР-фрагментов		Общий уровень полиморфизма, %
	Всего	полиморфных	
ISSR 08	4	2	50
ISSR 09	7	7	100
ISSR 10	4	3	75
ISSR 17	9	7	78
ISSR 22	4	3	75
ISSR 23	3	1	33
	Всего 31	Всего 21	Средний 68,5

Таблица 3

**Сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК *Allium ursinum* с ISSR-праймерами**

Праймер	Количество ПЦР-фрагментов		Общий уровень полиморфизма
	всего	полиморфных	
ISSR 09	6	5	83
ISSR 10	2	1	50
ISSR 17	9	7	78
ISSR 22	3	3	100
ISSR 23	6	5	83
	Всего 26	Всего 21	Средний 78,8

Таблица 4

**Сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК у разных культур с использованием праймера ISSR-09**

Уровень полиморфизма, %			
Полиподиум	томаты	Перец	черемша
100	11	14	83

В результате проведенных работ была подобрана коллекция праймеров, информативных для анализа, адаптированы условия проведения анализа, выявлены видоспецифичные и полиморфные фрагменты.

Основываясь на результатах молекулярного и морфологического анализа, а также принимая во внимание литературные данные, можно предположить, что на территории Беларуси отмечаются промежуточные разновидности исследуемых растений гибридного происхождения.

## Литература

1. *Stearn W. T. Allium L. In: T.G. Tutin V. H. Heywood N.A. Burges D.M. Moore D.H. Valentine S.M. Walters D.A. Webb (eds.). Flora Europaea 5. Cambridge, 1980. P. 49–69.*
2. Червона книга України. Рослинний світ/ за ред. Я.П. Дідуха. К.: Глобалконсалтинг, 2009.
3. *Karpavičienė B. Distribution of Allium ursinum L. in Lithuania / B. Karpavičienė // Acta Biol. Univ. daugavp. 2006. Vol. 6, N 1–2. P.117–121.*
4. *Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений, Вавиловский журнал генетики и селекции, 2011. Том 15. № 4. С. 757.*
5. *Semagn K, Bjornstad, Ndjiondjop MN (2006). An overview of molecular markers for plants. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (25): 2540–2568.*

## НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА ШКОЛЬНИКОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

А. Д. Другакова, М. Л. Минец

Организация научно-исследовательской деятельности в школе рассматривается сегодня как мощная инновационная образовательная технология, позволяющая развить интеллектуальный потенциал личности школьника от накопления знаний и навыков к самовыражению в творчестве и науке. Работа над исследовательскими проектами делает мышление учащихся раскрепощенным, свободным, творческим и позволяет получить дополнительный образовательный опыт, который они не всегда смогут получить на обычном уроке в классе. В последние годы происходит резкий рост заявленных докладов на участие в Республиканской конференции учащихся (рис.1).

Наибольшее количество докладов по биологии, занявших призовые места на Республиканской конференции учащихся в период с 2010 по 2013 годы, относятся к секции «физиология и биохимия живых систем» (38 %). Приблизительно одинаковый процент занимают доклады секций «ботаника» (14 %), «зоология» (25 %) и «микробиология» (14 %). Наименьшее количество докладов представлено в секции «экология и природопользование» – (7 %) [1]. По итогам Республиканской конференции учащихся из числа работ, удостоенных диплома I степени, происходит отбор докладов для участия в ряде Международных конференций школьников. Наиболее часто белорусские школьники участвуют в: Международной конференции юных ученых (ICYS), Международной конференции школьников стран Евросоюза (EUCYS) и Международном научно-техническом конкурсе (Intel ISEF).