



Инвентаризация генетических ресурсов: роль генетических банков в сохранении генетических ресурсов и использование ДНК-штрихкодирования как современного молекулярно-генетического инструмента видового скрининга флоры

Кильчевский Александр Владимирович

академик, руководитель Республиканского банка ДНК
человека, животных, растений и микроорганизмов

Михаленко Елена Петровна

заместитель руководителя Республиканского банка ДНК

Банк ДНК

Банк ДНК — это новое направление, развивающееся как самостоятельная область исследования со многими специфическими компонентами и требующая специализированного персонала.

Банк ДНК представляет собой коллекции образцов ДНК и биологического материала различных организмов, предназначенные для длительного и качественного хранения в специально оборудованных помещениях. Формирование таких коллекций представляется чрезвычайно важным как для сохранения биологического разнообразия, так и для создания депо биологического материала, пригодного для исследования различными методами как сейчас, так и в будущем.



Банк ДНК

Преимущества:

- доступность использования в молекулярных исследованиях
- низкая стоимость
- рассматривается в качестве «резервного копирования» образцов семенного банка или *in vitro* коллекций, особенно для редких видов



Требования:

- хорошая лабораторная оснащённость
- квалифицированный персонал

Основные задачи:

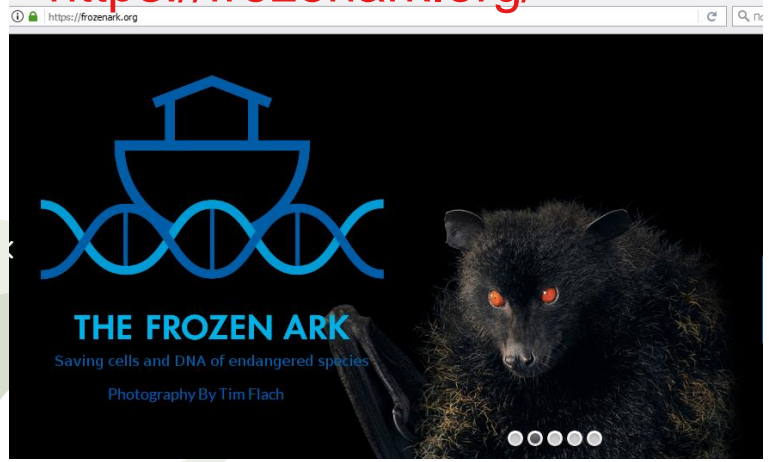
- повышение биобезопасности страны
- сохранение биоразнообразия Земли



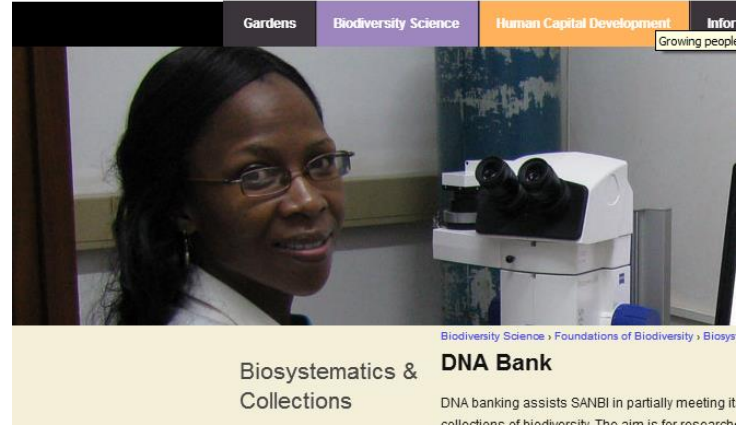
Немного истории

В Германии, Англии, России, ЮАР, Австралии и Польше созданы банки для хранения генетического материала, растений и животных. В том числе редких видов животных и растений, которые могут исчезнуть в ближайшие пять лет.

<https://frozenark.org/>



<http://www.sanbi.org/>



DNA Bank Network Germany



microorganisms



German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig

invertebrates II, vertebrates



Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Bonn



plants, algae and protists



Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem

invertebrates I and fungi



Zoologische Staatssammlung München

Банк ДНК – это не только собранный материал, но и информация характеризующая этот материал. Всю информацию можно разделить на два блока:

- 1) Общебиологическая информация;**
- 2) Результаты молекулярно-генетических исследований и их анализ.**

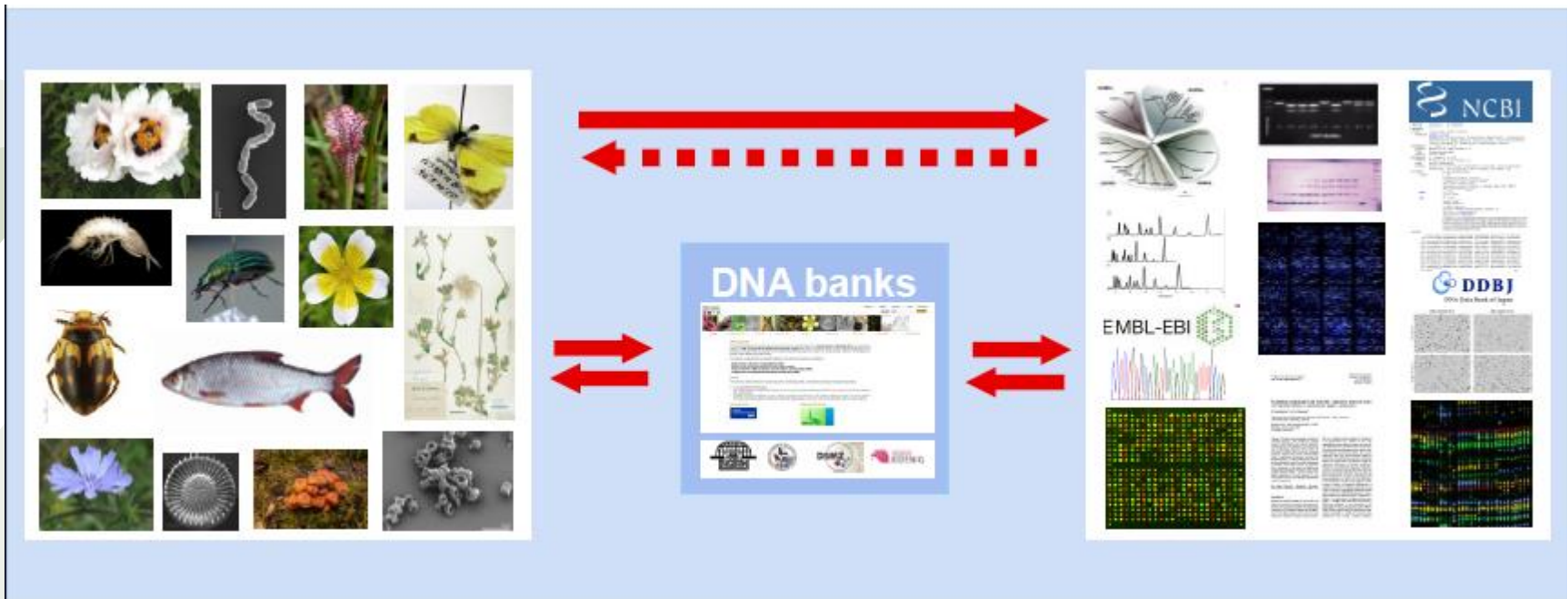


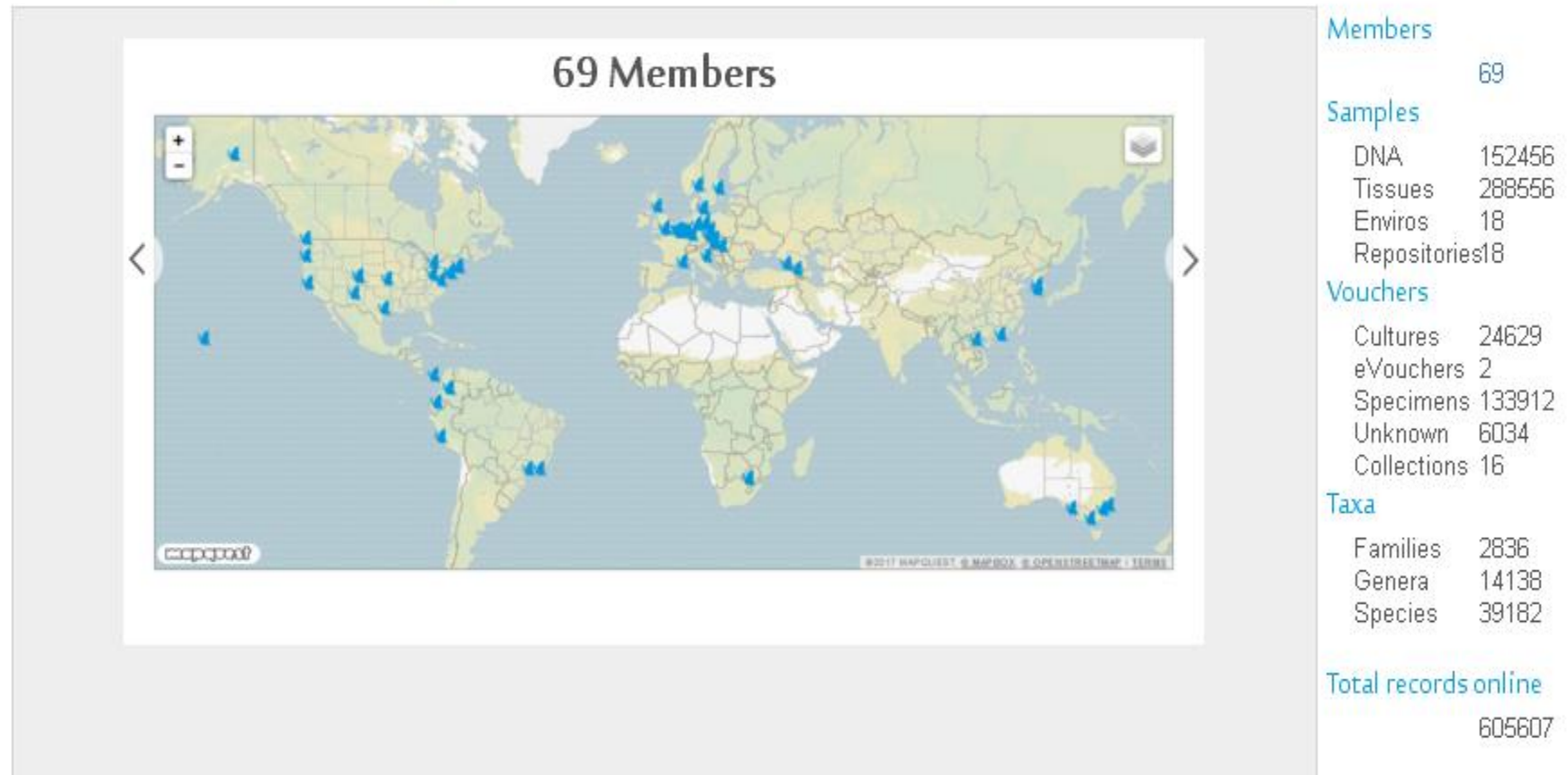
Рис. Структура DNA Bank Network (Thomas Knebelberger)

Международная глобальная сеть банков ДНК

Global Genome Biodiversity Network создана в 2011 году.

<http://www.ggbn.org/>

Global Genome Biodiversity Network



Республиканский банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов

создан в 2013 г.

во исполнение поручений Премьер-министра Республики Беларусь М.В. Мясниковича, данных на совещании по вопросам развития биотехнологической отрасли в Республике Беларусь (пункт 2 протокола от 24.05.2013), и для обеспечения сохранности уникальных коллекций ДНК Института генетики и цитологии НАН Беларуси

Руководитель банка: д.б.н., академик НАН Беларуси Кильчевский А.В.



Национальное достояние

**«Республиканский Банк ДНК человека,
животных, растений и
микроорганизмов»**

**в 2016г. получил статус национального
достояния**

**(постановление Совета Министров
Республики Беларусь № 629 от 13
августа 2016г.).**

Значение Республиканского банка ДНК

- Республиканский банк ДНК – это уникальная платформа для ведения крупномасштабных комплексных исследований
- Наличие банка ДНК создает условия для развития биотехнологии в нашей стране, для ведения научной работы в рамках крупномасштабных, мультидисциплинарных и мультицентровых исследований, как внутри страны, так и для сотрудничества в рамках выполнения международных научно-исследовательских проектов и программ
- **Возможность ДНК-инвентаризации генетических ресурсов редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных Республики Беларусь**



Республиканский банк ДНК по своей широкопрофильности и многофункциональности не имеет аналогов в СНГ

Состоит из тематических секций:

- Банк ДНК человека
- Банк ДНК животных
- Банк ДНК растений
- Банк ДНК микроорганизмов
- Банк ДНК редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных Республики Беларусь



Условия хранения образцов

- ✓ В Институте оборудовано хранилище с низко-температурными морозильными камерами (-80°C), в которых организовано хранение коллекций образцов ДНК и биологического материала.
- ✓ Установлена миниэлектростанция с синхронным типом генератора, которая обеспечивает работу низко-температурных морозильных камер во время обесточивания здания.
- ✓ Введена в эксплуатацию система криохранилища для длительной консервации уникальных образцов ДНК и биологического материала человека, животных и растений в жидком азоте (-196°C).
- ✓ Разработана информационная система учета образцов ДНК, контроля их использования и пополнения банка.



ЧТО ХРАНИТСЯ В РЕСПУБЛИКАНСКОМ БАНКЕ ДНК?

- Собраны болезнь ориентированная коллекция ДНК человека, коллекция ДНК коренных жителей Беларуси, коллекция ДНК спортсменов национальных команд;
- Созданы коллекции образцов ДНК картофеля, зерновых, овощных, плодовых и технических культур;
- Созданы коллекции ДНК крупного рогатого скота, свиней, лошадей, рыб, зубра европейского;
- Хранится около четырех сотен образцов ДНК штаммов микроорганизмов;
- Создана коллекция фитопатогенных грибов.

По состоянию на январь 2018 г. на хранении в Республиканском Банке ДНК находится 12 208 образцов (ДНК – 6629, биологического материала – 5579).

В 2016-2017 г. создана коллекция образцов ДНК редких и охраняемых видов растений, полученных из Национальных парков: «Нарочанский» и «Беловежская пуща».

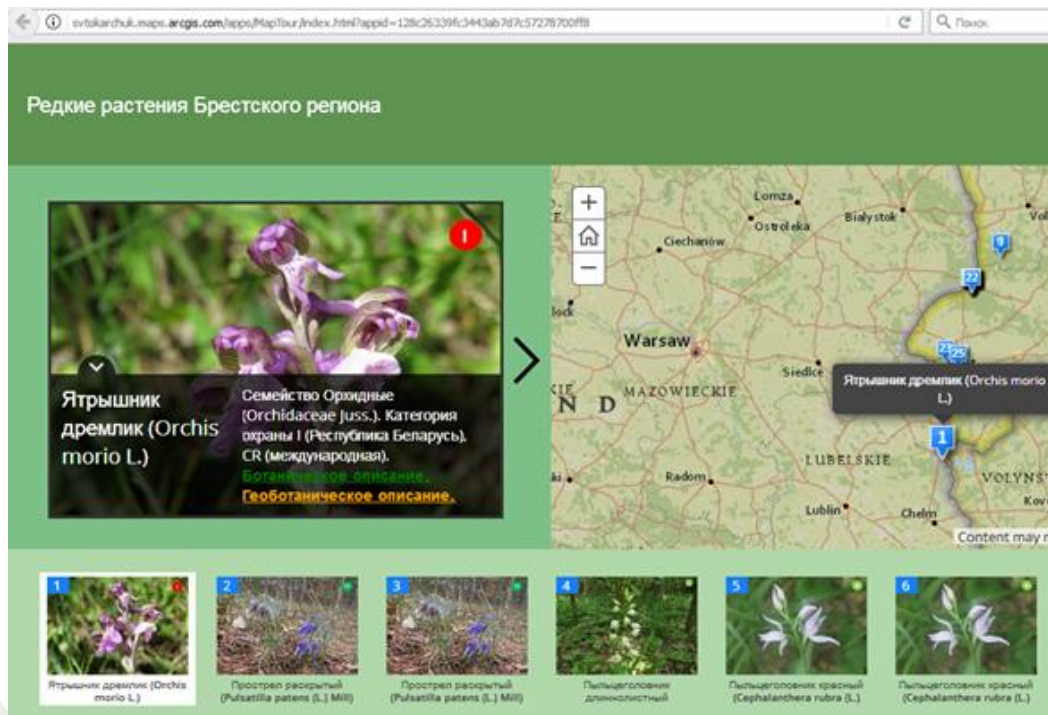
Материал собран без изъятия растения из мест произрастания сотрудниками Национального парка «Нарочанский» и сотрудниками кафедры ботаники и экологии биологического факультета Брестского государственного университета имени А.С. Пушкина.

Перечень видов редких и находящихся под угрозой исчезновения растений Республики Беларусь в коллекции Банк ДНК.

№ ID	Kind (lat.)	category protection
1	Betula nana	2
2	Gentiana Cruciata	1
3	Anemona sylvestris	4
4	Digitalis grandiflora	4
5	Iris sibirica	4
6	Dracocephalum ruyschiana	3
7	Salvia pratensis	4
8	Tulipa sylvestris	3
9	Prúnus spinósa	3
10	Abies alba	1
11	Scorzonera austriaca	1
12	Pulmonaria mollis	3
13	Anemóne nemorósa	4
14	Núphar lútea	
15	Orchis morio	2
16	Osmunda regalis	1
17	Pulsatilla pátens	4

№ ID	Kind (lat.)	category protection
18	Cephalanthera longifolia	3
19	Cephalanthera rubra	3
20	Melittis sarmatica	3
21	Lathyrus palustris	
22	Arnica montana	4
23	Botrychium multifidum	3
24	Botrychium matricariifolium	2
25	Quércus pétraea	2
26	Tróllius europaéus	4
27	Potentilla alba	3
28	Cardamine bulbifera	4
29	Lilium martagon	4
30	Lathyrus laevigatus	3
31	Thesium ebracteatum	4
32	Hedera helix	2
33	Laserpitium latifolium	3
34	Gladiolus imbricatus	4
35	Dáphne cneórum	1

Картографическое web-приложение



Сайт доступа <http://arcg.is/2hssjpw>

Сотрудниками кафедры ботаники и экологии Брестского университета разработано картографическое web-приложение популяций редких растений произрастающих на территории Национального парка «Беловежская пуца» и в Брестском регионе.

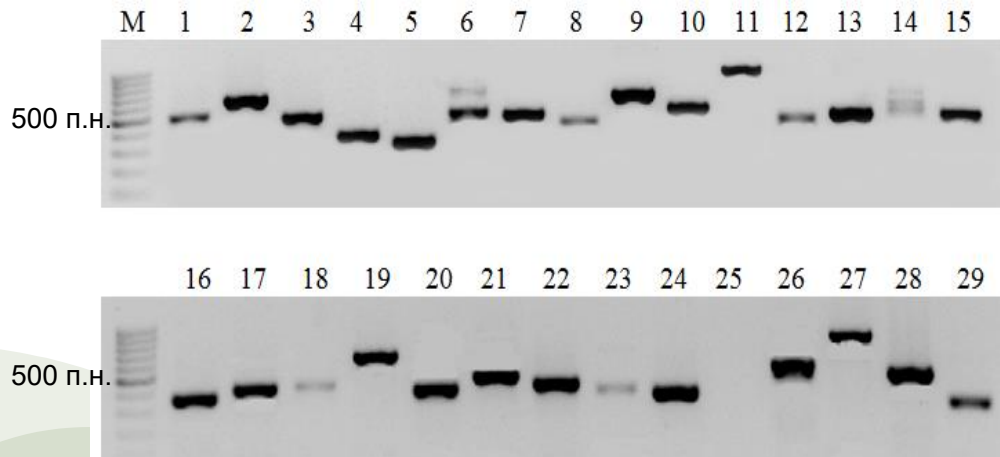
Данное web-приложение предназначено для служебного использования сотрудниками банка ДНК, научными сотрудниками Брестского университета и сотрудниками Беловежской пуцы.

ДНК-штрихкодирование в Беларуси

- **Одной из задач Республиканского банка ДНК является работа по использованию метода ДНК-штрихкодирования для подтверждения таксономической принадлежности редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных Республики Беларусь.**
- **В качестве идентификации растений на разных таксономических уровнях (родовом, видовом и подвидовом) были использованы маркеры хлоропластного (*rbcl*, *matK* и *psbA-trnH*) и ядерного (ITS2) генома.**

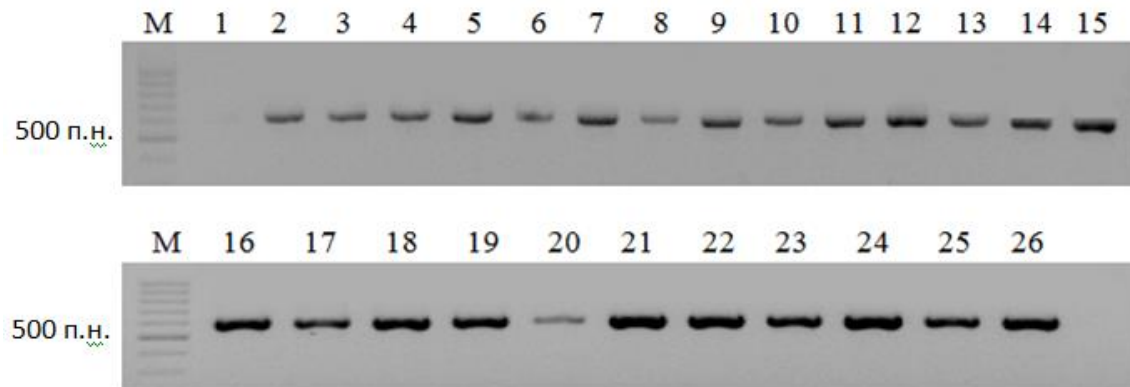
Амплификация маркерной последовательности

Рисунок– Результат амплификации маркерной последовательности **psbA-trnH** с ДНК 29 видов растений



1 – арника горная, 2 – касатик сибирский, 3 – береза карликовая, 4 – ветреница дубравная, 5 – гладыш обыкновенный, 6 – горечавка легочная, 7 – змееголовник Руйша, 8 – зубянка обыкновенная, 9 – горечавка крестообразная, 10 – козелец голый, 11 – пыльцеголовник красный, 12 – лапчатка белая, 13 – лилия кудреватая, 14 – ленец бесприцветничковый, 15 – кадило сарматское, 16 – медуница мягонькая, 17 – наперстянка крупноцветковая, 18 – прострел раскрытый, 19 – пихта белая, 20 – слива колючая (терн), 21 – тюльпан лесной, 22 – шалфей луговой, 23 – чина гладкая, 24 – чина болотная, 25 – чистоуст величавый, 26 – дуб скальный, 27 – ятрышник-дремлик, 28 – плющ обыкновенный, 29 – ветреница лесная; М – молекулярный маркер веса (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific)

Рисунок – Результат амплификации маркерной последовательности **rbcL** с ДНК 26 видов растений

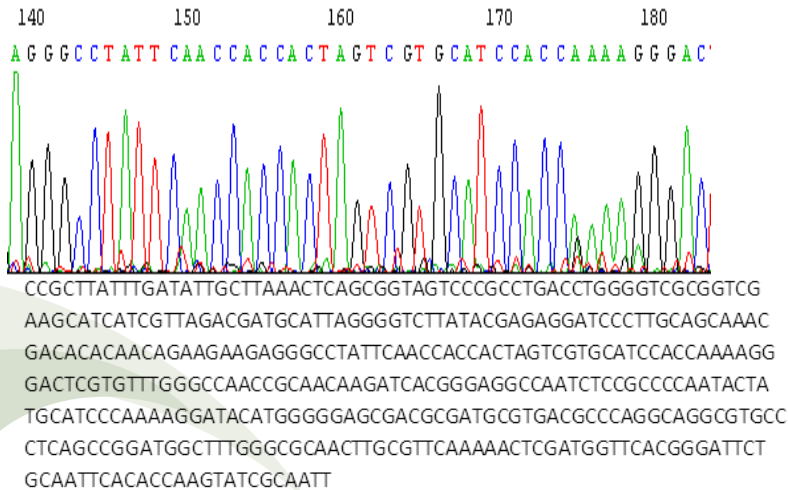


1 – чистоуст величавый, 2 – касатик сибирский, 3 – береза карликовая, 4 – ветреница дубравная, 5 – гладыш обыкновенный, 6 – горечавка легочная, 7 – змееголовник Руйша, 8 – зубянка обыкновенная, 9 – горечавка крестообразная, 10 – козелец голый, 11 – пыльцеголовник красный, 12 – лапчатка белая, 13 – лилия кудреватая, 14 – ленец бесприцветничковый, 15 – медуница мягонькая, 16 – наперстянка крупноцветковая, 17 – пихта белая, 18 – слива колючая (терн), 19 – шалфей луговой, 20 – чина гладкая, 21 – чина болотная, 22 – дуб скальный, 23 – ятрышник-дремлик, 24 – плющ обыкновенный, 25 – ветреница лесная, 26 – кадило сарматское; М – молекулярный маркер веса (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific)

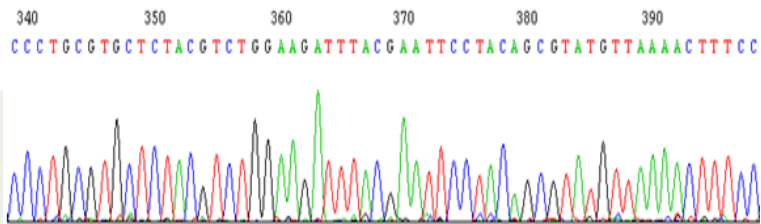
Определение последовательности ДНК

Козелец голый (*Scorzonera austriaca*)

ITS2

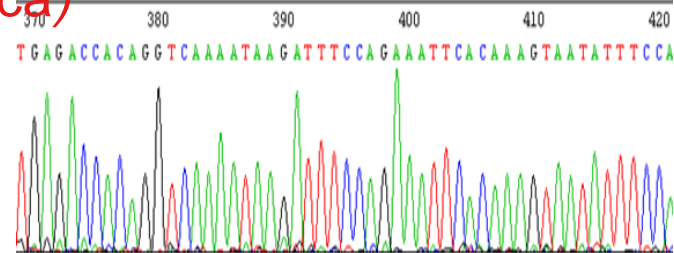


RbcL



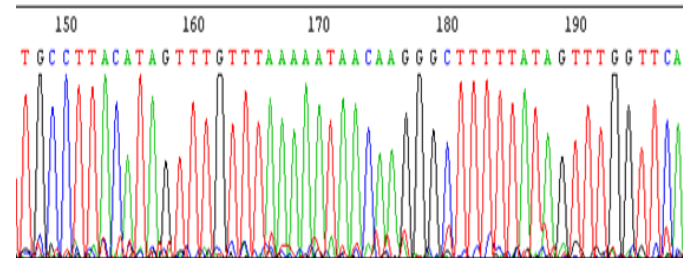
TGTTAAGATTATAAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATCAAACCAAGGATACTGATAT
CTGGCAGCATTTCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCGCTTGAAGAAGCAGGGGCCG
CAGTAGCTGCCAATCTTACTGTTACATGGACAAGTGTGGACCGATGGACTTACGAG
CCTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTATGGAATCGAGCCTGTTCTGGAGAAGAAAATCA
ATATATGGCTTATGTAGCTTACCATTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACAT
GTTTACTTCCATTGTAGGTAATGATTTGGGTTCAAAGCCTGCGTGTCTACGTCTGGA
AGATTTACGAATCCTACAGCGTATGTTAAAACCTTCAAGGTCCGCCCTACGGCATCCA
AGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTGTCCCTGTTGGGATGACTATTAACC
TAAATTGGGGTTATCCGCTAAAACACTCGGTAGAGCTGTTATGAATGTCTTCGCGGTG
ACTTGATTTGACAAAAA

Matk



GAGAGACAGGATCTTCTSTATTATTTACTCGATACAAACTCTTTTTTTTTGAAGATCCAC
TATGATAATGAGAAAAGATTTCTGTATATACGCCAAAGCGATCAATAATATCAGAACTCG
ACAAAATCGGCCAAATCGCCTTACCAATAGGATGCCCAATGCCTTACAAAATTTAGATT
TAGCCAATGATCAATTAGAGGCATAATTGGAACAATAGTCTCAAACCTTCTAATAGCAT
TTTCGATTAGAAAATGCATTTTCTAGCATTGACTGCGTACCATTGAAGGCTTTAGCCGCA
CACTTGAACGATAAACCAGAAAAGTCAAGGGAATGATTGGATAAATGGTTTATAAATCG
TTCTGGTTGAGACCACAGGTCAAATAAGATTTCCAGAAATTCACAAAGTAAATTTCC
ATTTATTCATCAAAAAGAACGTCCTTTTGAAGCAAGATAGATTTTCTTGATACCTAA
CATAATGCATGAAAGGATCTTTGAACAACCATAAAATTTGCTTGAAGGCTTGGCAAAGA
CTCTACAAGATGCTTTATTTTTCCATAGAAAATGGATTCTGTTCAATAAGGGCTCCAGAAG
ATGTTGATCGTAAGTGAGAAGATTGGTTACGGAGAAAGAGGAAGCCAGATTCATATTCAC
ATACATGAGAAGTATATAGGAAGAAGATAGTCTGTGATTTCTTTTGAAGAAAGAAAC
CGGCTTTCTTTGAATTTGAAGTAAAGACTATCCAATTATGACACTCATGGAGAAAGC
ATCTTAATAAATGCAAAGAGGAGCATCTTTATCCAATAGCGRAGAGCCTGAAACCAAG
ATTTCCAGATGGRAMTGGGKT

psbA-trnH



TCGTKTTAAGTAATTATCGAGTCCATCTACAATGGATAAGACTTTGGTCTGATTGTATA
GGAGTTTTTGAACATAAAAAAGGAGCAATAACGCTCTCTTGATAAAAACAAGAGGGAGCTAT
TGCTCCTTTTTTATTAGTAGTATTTGCCTTACATAGTTTGTAAAAAATAACAAGGGC
TTTTTATAGTTTGGTTCAATTAGCATGTTTCTCTTTGATTAATTTAGAGGTTTATATA
TCCTTTCCAATCTTTATGAAGTTTGATTTCCAATTTAATTTCAATCTAAAATAGATA
AAAATGAGAATTTGCTTATTTATTACTTTGATTTTCAAGAAATAAGAAAAAAAATAATA
TG

Идентификация образца

Полученные нуклеотидные последовательности могут быть проанализированы с помощью программ:

- **NCBI BLAST** позволяет сравнивать любые нуклеотидные последовательности
- **BOLD Systems v.4 (The Barcode of Life Data System)** (<http://www.boldsystems.org>) позволяет вести поиск маркерных последовательностей rbcL и matK размером более 500п.н.

BOLDSYSTEMS DATABASES IDENTIFICATION TAXONOMY WO

ANIMAL IDENTIFICATION [COI] FUNGAL IDENTIFICATION [ITS] **PLANT IDENTIFICATION [RBCL & MATK]**

The BOLD Identification System (IDS) for rbcL and matK is the default identification tool for Plant barcodes and accepts sequences from the Ribulose-b returns a species-level identification when possible. Further validation with independent genetic markers will be desirable in some forensic application. The BLAST algorithm is employed in place of the standard BOLD identification engine for rbcL and matK sequences.

There are very few rbcL and matK records on BOLD so most queries will likely not return a successful match.

Search Database:

- Plant Sequences
Every rbcL and matK barcode record on BOLD with a minimum sequence length of 500bp (warning: unvalidated database that includes records includes many species represented by only one or two specimens as well as all species with interim taxonomy. This search only returns a list of probability of placement to a taxon.

Enter sequences in fasta format:

```
GAGAGACAGGATCTCTATTATTTACTCGATACAAACTCTTTTTTTTGAAGATCCAC
TATGATAATGAGAAAGATTTCTGTATATACGCCCAAAGCGATCAATAATATCAGAATCTG
ACAAATCGGCCAAATCGCTTACCAATAGGATGCCCAATGCGTTACAAAATTTAGATT
TAGCCAATGATCCAATTAGAGGCATAATTGGAAACAATAGTCTCAAACCTCTTAATAGCAT
TTTCGATTAGAAATGCATTTCTAGCATTGACTGCGTACATTGAAGGCTTTAGCCGCA
```

BLAST » **blastn suite** » RID-18C4E0EU013 Home

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Job title: Nucleotide Sequence (861 letters)

RID	18C4E0EU013 (Expires on 11-22 20:56 pm)
Query ID	IdlQuery_39297
Description	None
Molecule type	nucleic acid
Query Length	861

Database Name	nr
Description	Nucleotide collection (nt)
Program	BLASTN 2.7.1+ Citation

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

■ <40	■ 40-50	■ 50-80	■ 80-200	■ >=200
-------	---------	---------	----------	---------

Query

Идентификация образца

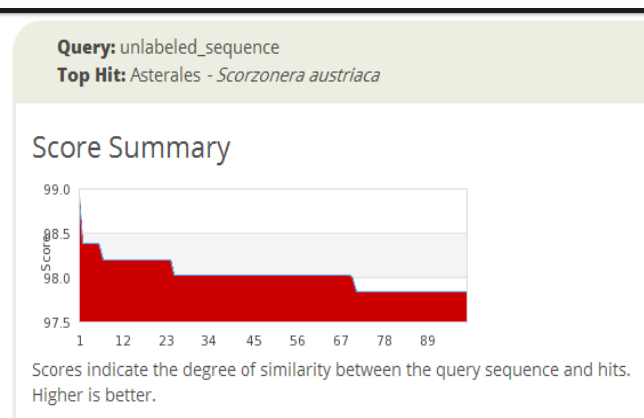
Маркер RbcL совпадение 99%

Идентификация в NCBI BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Scorzonera austriaca voucher PS0700MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloro	994	994	99%	0.0	99%	GQ436482.1
<input type="checkbox"/> Tarchonanthus camphoratus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	977	977	99%	0.0	98%	KC589903.1
<input type="checkbox"/> Brachylaena discolor ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	977	977	99%	0.0	98%	KC589801.1
<input type="checkbox"/> Brachylaena ilicifolia voucher A. Kqopa 7 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloropla	977	977	99%	0.0	98%	JQ014159.1
<input type="checkbox"/> Tarchonanthus camphoratus ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast	977	977	99%	0.0	98%	EU385023.1
<input type="checkbox"/> Tarchonanthus camphoratus chloroplast partial rbcL gene for ribulose bisphosphate carboxylase large subunit, specimen voucher Logie C.	977	977	99%	0.0	98%	AM234916.1

Идентификация в BOLD Systems v.4

Rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Score	Similarity
1	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	<i>Scorzonera</i>	<i>austriaca</i>		544	98.92
2	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	<i>Tarchonanthus</i>	<i>camphoratus</i>		538	98.38
3	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	<i>Brachylaena</i>	<i>discolor</i>		538	98.38
4	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	<i>Tarchonanthus</i>	<i>camphoratus</i>		538	98.38



для идентификации данного вида **Козелец голый** (*Scorzonera austriaca*) оптимальным выбором является 3-х локусная комбинация **rbcL+ITS2+ Matk**

СБОР ОБРАЗЦОВ 2018

Национальный парк «Нарочанский»

Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина

Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси

Название вида
1. Тайник яйцевидный
2. Осока войлочная
3. Омела австрийская
4. Пыльцеголовник длиннолистный
5. Кадило сарматское
6. Любка зеленоцветковая
7. Венерин башмачок настоящий
8. Зубянка клубненосная
9. Дремлик морозниколистный
10. Пальчатокоренник майский
11. Ятрышник дремлик
12. Чистоуст величавый
13. Меч-трава обыкновенная
14. Неккера перистая
15. Дремлик темно-красный
16. Шпажник черепитчатый

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



Государственное научное
учреждение
Институт генетики и цитологии
НАН Беларуси