

Е.Н. Макеева<sup>1</sup>, Е.П. Михаленко<sup>1</sup>, С.В. Кубрак<sup>1</sup>, Н.В. Савина<sup>1</sup>, Е.И. Кузьминова<sup>1</sup>, Л.В. Милько<sup>1</sup>, К.А.Пантелей<sup>1</sup>, А.П. Колбас<sup>2</sup>, Н.М. Матусевич<sup>2</sup>, О.С. Ежова<sup>3</sup>, В.С. Люштык<sup>3</sup>, А.В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ТЕХНОЛОГИЯ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ В БЕЛАРУСИ: ПЕРСПЕКТИВЫ И ПОТРЕБНОСТИ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси  
ул. Академическая 27, г. Минск, 220072-ВУ, БЕЛАРУСЬ  
E-mail: [E.Makeeva@igc.by](mailto:E.Makeeva@igc.by)

<sup>2</sup>Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина  
Бульвар космонавтов 21, г. Брест, 224016-ВУ, БЕЛАРУСЬ  
E-mail: [ecocenter@brsu.brest.by](mailto:ecocenter@brsu.brest.by)

<sup>3</sup>Государственное природоохранное учреждение «Национальный парк «Нарочанский»  
ул. Ленинская 11., к.п. Нарочь, Мядельский район, 222395, Минская область, БЕЛАРУСЬ  
E-mail: [nauka@narochpark.by](mailto:nauka@narochpark.by)

ДНК-идентификация редких и исчезающих видов растений началась в 2017 году в Республиканском банке ДНК. ДНК-штрихкодирование представляет собой наилучший подход и инструмент для изучения флоры и фауны, а также организации полученных данных в специальной базе данных. В настоящее время база данных содержит штрих-коды (ITS2, rbcL, psbA-trnH) 35 видов диких растений, произрастающих на территории Республики Беларусь. Это первая попытка Беларуси создать библиотеку эталонных ДНК-штрихкодов для идентификации редких и исчезающих видов растений на охраняемых территориях и в биологических коллекциях.

**Ключевые слова:** таксономическая идентификация, *ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*, Красная книга Республики Беларусь.

### Введение

Республика Беларусь присоединилась к Нагойскому протоколу по доступу к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции о биологическом разнообразии. С целью выполнения статьи 17 «Мониторинг использования генетических ресурсов» необходимо проводить таксономическую верификацию генетических ресурсов.

ДНК-штрихкодирование – это наилучший подход и инструмент для изучения флоры и фауны, а также организации полученных данных в специальной базе данных. ДНК-штрихкодирование – новый метод каталогизации биологического разнообразия с помощью небольших фрагментов генома (ДНК-штрихкодов). С этой целью по инициативе Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси совместно с научно-практическим центром Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам создается центр по ДНК-штрихкодированию флоры и фауны Республики Беларусь. Научное сотрудничество и обучение использованию методов ДНК-штрих-кодирования представляют собой острую необходимость для специалистов Беларуси.

ДНК-идентификация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений началась в 2017 году в Республиканском банке ДНК человека, растений, животных и микроорганизмов для активного участия в деятельности и с целью приближения к использованию методов ДНК-штрихкодирования для оценки разнообразия видов и их распределения в общем генофонде растений. Республиканский Банк ДНК был создан в 2013 г. на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси и в 2016 г. получил статус национального достояния. Банк ДНК – широкопрофильная и многофункциональная структура, его коллекции представляют собой депо биологического материала, пригодного для длительного научного изучения. Для сохранения и изучения генетического материала диких видов растений, произрастающих на территории Республики Беларусь, в Республиканском Банке ДНК создана секция «Банк ДНК редких и находящихся под угрозой исчезновения видов дикой флоры и фауны Республики Беларусь». Природоохранная деятельность Банка ДНК основывается как на изучении генетического разнообразия природных популяций диких видов, так и на молекулярно-генетической идентификации видов и уточнении их таксономического статуса.

Естественная растительность занимает 67% территории Республики Беларусь и представлена 230 типами растительных сообществ, которые образованы 12 тыс. видами растений. Сохранение биологического разнообразия и обеспечение его устойчивого использования являются приоритетными направлениями государственной политики и реализуются путем применения различных механизмов. Наиболее эффективный среди них – это развитие системы особо охраняемых природных территорий, которые занимают 7,7% площади страны. Необходимым механизмом является инвентаризация и картирование редких и исчезающих видов, поиск новых местонахождений, периодический мониторинг за состоянием популяций, определение численности охраняемых и ресурсообразующих видов [1].

Редкие и исчезающие виды растений характеризуются более низкой способностью выживать в условиях изменения климата и давления антропогенных факторов, что ведет к утрате ценных генотипов и снижению биоразнообразия в целом. В настоящее время в Красную книгу Республики Беларусь (4-е издание, 2015 г.) внесены 303 вида дикорастущих растений, в том числе 189 видов сосудистых растений I, II, III и IV национальных природоохранных категорий, что соответствует международным категориям CR (critically endangered (находящиеся в критической опасности), EN (endangered (находящийся под угрозой исчезновения), VU (vulnerable (уязвимый вид), NT (near threatened (виды, близкие к уязвимому положению), соответственно [2].

Цель нашего исследования заключалась в инвентаризации ботанических ресурсов методом ДНК-штрихкодирования и создании справочной библиотеки

штрихкодирование-ДНК для редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений.

## Материалы и методы

Мероприятия по ДНК-штрихкодированию редких видов растений осуществляются совместно с Национальным координационным центром по вопросам доступа к генетическим ресурсам. Сбор биологического материала для молекулярно-генетических исследований на природоохранных территориях проводится сотрудниками природоохранных учреждений и специалистами-ботаниками без изъятия растений из мест произрастания. Были разработаны специальные методические рекомендации, регламентирующие сбор, хранение и транспортировку растительного материала для выделения высококачественной ДНК без признаков деградации и примесей. Одновременно с ДНК-штрихкодированием уточняется эколого-географическое описание редких растений, что вместе с морфологическим описанием размещается в базе данных коллекции редких растений [3].

Нами исследован биологический материал 35-ти редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений, собранных в Национальных парках «Нарочанский» и «Беловежская пуца» в 2016-2017 гг. (таблица 1).

Таблица 1 – Список растений, исследованных методом ДНК-штрихкодирования

№	Вид растения	Категория охраны *
1	<i>Abies alba</i>	I (CR)
2	<i>Anacamptis morio</i>	II (EN)
3	<i>Anemone nemorosa</i>	**
4	<i>Anemone sylvestris</i>	IV (NT)
5	<i>Arnica montana</i>	IV (NT)
6	<i>Betula nana</i>	II (EN)
7	<i>Botrychium matricariifolium</i>	II (EN)
8	<i>Botrychium multifidum</i>	III (VU)
9	<i>Cardamine bulbifera</i>	IV (NT)
10	<i>Cephalanthera longifolia</i>	III (VU)
11	<i>Cephalanthera rubra</i>	III (VU)
12	<i>Daphne mezereum</i>	**
13	<i>Digitalis grandiflora</i>	IV (NT)
14	<i>Dracocephalum ruyschiana</i>	III (VU)
15	<i>Gentiana cruciata</i>	I (CR)
16	<i>Gentiana pneumonanthe</i>	**

17	<i>Gladiolus imbricatus</i>	IV (NT)
18	<i>Hedera helix</i>	II (EN)
19	<i>Iris sibirica</i>	IV (NT)
20	<i>Laserpitium latifolium</i>	III (VU)
21	<i>Lathyrus laevigatus</i>	III (VU)
22	<i>Lathyrus palustris</i>	**
23	<i>Lilium martagon</i>	IV (NT)
24	<i>Melittis melissophyllum</i>	III (VU)
25	<i>Nuphar lutea</i>	**
26	<i>Potentilla alba</i>	III (VU)
27	<i>Prunus spinosa</i>	III (VU)
28	<i>Pulmonaria mollis</i>	III (VU)
29	<i>Pulsatilla patens</i>	IV (NT)
30	<i>Quercus petraea</i>	II (EN)
31	<i>Salvia pratensis</i>	IV (NT)
32	<i>Scorzonera austriaca</i>	I (CR)
33	<i>Thesium ebracteatum</i>	IV (NT)
34	<i>Trollius europaeus</i>	IV (NT)
35	<i>Tulipa sylvestris</i>	III (VU)

\* Категории охраны: I (CR) – critically endangered; II (EN) – endangered; III (VU) – vulnerable; IV (NT) – near threatened.

\*\* Растения (*Nuphar lutea*, *Lathyrus palustris*, *Gentiana pneumonanthe*) не включенные в 4-е издание Красной книги Республики Беларусь, но охраняемые на территории соседних государств (Россия, Украина).

Сбор растительного материала (листья или их апикальная часть, лепестки) проведен без изъятия растений из мест произрастания. Собранный растительный материал до изоляции ДНК хранили при 4°C, перед выделением ДНК образцы замораживали в жидком азоте и растирали в фарфоровой ступке. Total DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) extraction protocol as per the manufacturer's guidelines. DNA was normalized by adjusting its concentration to 15 ng $\mu$ L

Для идентификации редких и находящихся под угрозой исчезновения видов дикорастущих растений использовали три маркерные последовательности: *rbcL*, *psbA-trnH* и *ITS2*. Маркер *ITS2* представляет собой участок ядерной последовательности, который входит в состав рибосомального кластера и локализуется между структурными генами рибосомальной РНК 5.8S и 28S. Ген *rbcL* – наиболее подробно охарактеризованный хлоропластный ген растений. Участок пластидной ДНК *rbcL* кодирует большую субъединицу рибулозобисфосфаткарбоксилазы, ключевого фермента фиксации CO<sub>2</sub> в темновой

фазе фотосинтеза. Некодирующий участок пластидной ДНК *psbA-trnH* представляет собой Intergenic spacer (IGS) regions и расположен между геном, контролирующим синтез белка D1 фотосистемы II и геном гистидиновой тРНК [4-5].

Аmplification маркерных последовательностей *rbcL*, *psbA-trnH* и *ITS2* проводили с использованием специфических праймеров (таблица 2) в финальном объеме реакционной смеси 10 мкл (термоциклер C1000 Touch Thermal Cycler, BioRad, США). Количество ДНК, вносимое в реакционную смесь – 30 нг/мкл. Состав ПЦР-смеси – стандартный (буфер 10x, 25M MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 3% DMSO, 10μM каждого праймера, 5U/μl ДНК-полимераза). Последовательности праймеров и базовые рекомендации по условиям проведения амплификации представлены в свободном доступе на сайте международного центра по ДНК-баркодингу – CCDB (Канадский центр ДНК-баркодинга) [6]. Результаты амплификации проверяли в агарозном геле: 1%-м для маркеров *ITS2* и *rbcL*, для маркера *psbA-trnH* использовали 2%-й гель из-за значительной вариабельности продуктов амплификации по этому маркеру.

Таблица 2 - Праймеры для амплификации маркерных последовательностей

ДНК-штрихкод	Последовательность праймеров	Ожидаемый размер ПЦР продукта, п.о.
<i>psbA-trnH</i>	5'- gttatgcatgaacgtaatgctc-3' 5'- cgcgcatggaggattcacaatcc-3'	~509 п.н. [7]
<i>rbcL</i>	5'-atgtcaccacaacagagactaaagc-3' 5'- gtaaaatcaagtccaccgcg-3'	~654 п.н. [7]
<i>ITS2</i>	5'-atgcgatacttggtgtaat-3' 5'-gacgcttctccagactacaat-3'	~494 п.н. [8]

Продукты амплификации очищали с помощью ферментов Exonuclease I и Shrimp Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, USA), согласно рекомендациям производителя. Терминирующую реакцию проводили с использованием коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) с последующей очисткой продукта реакции этанолом. Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). Хроматограммы сиквенсов проанализировали в программе ChromasPro 13.3 и сохранили в формате FASTA. Полученные нуклеотидные последовательности при помощи программы NCBI BLAST сравнивали с последовательностями ДНК, хранящимися в международных базах данных [9].

## Результаты и обсуждение

Для каждого из 35-ти растений было получено по три фрагмента при амплификации с маркерами *ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*. В результате амплификации маркерной последовательности *ITS2* размер продукта во всех случаях не превышал 550 п.н., а в случае амплификации *rbcL* – 600-650 п.н., что не противоречит данным других авторов [8,10]. Продукты амплификации маркерных последовательностей *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH* были секвенированы в прямом и обратном направлении. Обнаружение в NCBI нуклеотидной последовательности известного биологического вида, полностью совпадающей с анализируемой нами, являлось подтверждением видовой принадлежности изучаемого растения.

Общая схема проведения видоидентификации представлена нами на примере растения *Daphne sneorum* L., относящегося ко II-й категории национальной природоохранной значимости. Это реликтовый вид, растение в Республике Беларусь встречается единичными экземплярами или небольшими группами. При амплификации ДНК *Daphne sneorum* L. с маркером *ITS2* был получен фрагмент размером ~ 500 п.н.; с *rbcL* ~ 600 п.н.; в результате амплификации с маркером *psbA-trnH* было получено несколько продуктов, что исключило проведение анализа по этому ДНК-штрихкоду. Продукты амплификации *ITS2* и *rbcL* были секвенированы, получено 4 качественных сиквенса участка *ITS2* (длина прочтения составила 457 п.о.) и 3 качественных сиквенса участка *rbcL* (длина прочтения составила 560 п.о.). Маркерная последовательность *ITS2* для *Daphne sneorum* L. из Национального парка «Беловежская пуца» на 99% совпала с представленной в NCBI последовательностью KX166606.1 для вида *Daphne mezereum*. Маркерная последовательность *rbcL* на 100% совпала с представленной в NCBI последовательностью JN891807.1 также для вида *Daphne mezereum*. Таким образом, результаты секвенирования двух маркерных последовательностей *ITS2* и *rbcL* для образца *Daphne sneorum* L., поступившего в Республиканский Банк ДНК как редкое растение II-й категории охраны, позволили определить этот вид как *Daphne mezereum*, не относящийся к охраняемым на территории Республики Беларусь. Использование ДНК-баркодирования, как эффективного инструмента молекулярной систематики, позволяет исправить подобные проблемные случаи и ошибки традиционных таксономических методов.

В ходе выполнения работы для всех трех маркеров продемонстрирована хорошая воспроизводимость результатов амплификации, что соответствует критерию универсальности [5]. Относительно качества сиквенсов, маркеры *ITS2* и *rbcL* лучше отвечали этому требованию. С помощью самостоятельного применения одного из трех маркеров удалось видоидентифицировать 66% изучаемых нами растений (23 вида). При этом вклад маркера *ITS2* был максимальным – 20 видов

растений из 35. В таблице 3 представлены результаты видоидентификации растений из Красной книги Беларуси с помощью маркера *ITS2*.

Таблица 3 – Результаты identification of 20 rare and endangered plant species с помощью маркера *ITS2*

№ п/п	Вид растения	Идентичность вида,* %	Код маркерной последовательности **
1	<i>Abies alba</i>	99	EF187251.1
2	<i>Anacamptis morio</i>	100	Z94092.1
3	<i>Anemone nemorosa</i>	91	KX167066.1
4	<i>Arnica montana</i>	99	FM177855.1
5	<i>Betula nana</i>	99	KX167561.1
6	<i>Cardamine bulbifera</i>	99	KX167752.1
7	<i>Cephalanthera longifolia</i>	99	AY146447.1
8	<i>Daphe mezereum</i>	100	KX166606.1
9	<i>Gentiana cruciata</i>	99	DQ398634.1
10	<i>Hedera helix</i>	99	AM503887.1
11	<i>Laserpitium latifolium</i>	100	FJ415131.1
12	<i>Lathyrus laevigatus</i>	98	DQ311967.1
13	<i>Lathyrus palustris</i>	99	KX166469.1
14	<i>Lilium martagon</i>	99	AF088203.1
15	<i>Melittis melissophyllum</i>	99	KX165838.1
16	<i>Nuphar lutea</i>	100	KX165445.1
17	<i>Pulmonaria mollis</i>	99	KT737694.1
18	<i>Quercus petraea</i>	99	FM244114.1
19	<i>Salvia pratensis</i>	100	KX1667555.1
20	<i>Scorzonera austriaca</i>	97	AM117047.1

\* – % сходства полученного нами сиквенса участка *ITS2* анализируемого вида с последовательностью, представленной в NCBI BLAST

\*\* – код маркерной последовательности *ITS2* в NCBI BLAST

Последовательности *ITS* рассматриваются как эталонные благодаря ряду преимуществ: они локализованы в ядерном геноме и являются высоковариабельными; скорость накопления в них нуклеотидных замен и перестроек, то есть скорость их эволюции, выше по сравнению с митохондриальными и хлоропластными генами; они высококопийны – встречается

до 30000 копий на клетку, что обеспечивает успешную амплификацию участка даже при малом количестве материала; на участке *ITS* ядерной ДНК преобладают точечные мутации и редко встречаются протяженные *InDel*, именно поэтому последовательности *ITS* у разных растений незначительно различаются по длине, что удобно для сравнения сиквенсов разных видов [4,11]. Сходство по *ITS2* у изучаемых нами видов с данными NCBI варьировало от 91 до 100 %, чаще всего эта маркерная последовательность совпадала с базой данных на 99%. Полученные результаты подтверждают возможность использования последовательности *ITS2* для идентификации дикорастущих видов растений на разных таксономических уровнях: родовом, видовом и, возможно, подвидовом.

Маркер *rbcL* оказался максимально эффективным по критерию «качество сиквенса». Для него характерно наиболее качественное секвенирование: высокая длина прочтения, незначительные ошибки с возможностью последующего ручного исправления. Однако, разрешающая способность этого маркера недостаточна для самостоятельного использования – большая часть изучаемых растений была определена только до рода. Исключение составили виды *Laserpitium latifolium* и *Potentilla alba*, которые были идентифицированы с помощью *rbcL* на 100% (KJ746247.1 и KJ746216.1). Систематика в пределах семейства или совместное использование с другими маркерами позволяют рассматривать *rbcL* как маркерную последовательность, также подходящую для ДНК-штрихкодирования редких растений.

Результаты амплификации с Intergenic spacer *psbA-trnH* не были столь однозначными. Этот маркер оказался наиболее варибельным по длине – размеры полученных ампликонов варьировали от 300 до 1000 п.н., что согласуется с данными литературы об его особенностях [11]. В отличие от участка *ITS* ядерной ДНК, для которого характерно преимущественное накопление точечных мутаций, на участке *psbA-trnH* хлоропластной ДНК чаще всего происходят структурные перестройки, свойственные хлоропластному геному в целом. *InDel*, обнаруженные в спейсере *psbA-trnH*, чаще всего представляют собой небольшие инверсии. Именно вставки и делеции определяют разницу в размерах спейсера *psbA-trnH* между сравниваемыми таксонами [10-11]. Для трех видов растений (*Gentiana pneumonanthe*, *Thesium ebracteatum*, *Daphne sneorum*) в ходе амплификации маркера *psbA-trnH* нами было получено несколько продуктов, что требует в этом случае выбора другого маркера.

По критерию «качество сиквенса» маркер *psbA-trnH* значительно уступал *ITS2* и *rbcL*, несмотря на оптимальную длину прочтения – до 732 п.н. При использовании маркера *psbA-trnH* получались сиквенсы с неоднозначным прочтением нуклеотидов, что согласуется с мнением других авторов о том, что для фрагмента *trnH-psbA* существенная варибельность данного маркера по длине затрудняет процедуру выравнивания последовательностей [4,7]. Однако для трех



видов в нашем исследовании разрешающая способность *psbA-trnH* как самостоятельного маркера оказалась достаточно высокой. *Melittis melissophyllum*, *Botrychium multifidum* и *Potentilla alba* были идентифицированы с его помощью с точностью 94-99% (HG800544.1, KF700625.1 и GQ384976.1, соответственно). Однако, в других случаях (*Betula nana*, *Tulipa sylvestris* и др.) маркер *psbA-trnH* идентифицировал растения только до рода. Для эффективной видоидентификации редких дикорастущих растений следует использовать *psbA-trnH* в комплексе с другими маркерными последовательностями.

Таким образом, используемые нами в работе маркерные последовательности (*ITS2*, *rbcL*, *psbA-trnH*) позволяют проводить таксономическую идентификацию редких и исчезающих видов растений. Сочетание ДНК анализа с классическими методами ботанических исследований дает возможность точно идентифицировать дикорастущие растения, что способствует эффективной инвентаризации генетических ресурсов.

**Выводы.** Прямой анализ нуклеотидных последовательностей ДНК позволит усовершенствовать традиционно используемые системы классификации. Это первая попытка в Беларуси создать референсную библиотеку ДНК-штрихкодов для идентификации редких и исчезающих видов растений в Национальных парках и для выявления ошибок или расхождений в идентификации таксонов. Научное сотрудничество и обучение использованию методов ДНК-штрихкодирования остро нужны специалистам Беларуси.

### Список использованных источников

1. Бученков, И.Э. Растительные ресурсы Беларуси, рациональное использование и охрана: краткий курс лекций / И.Э. Бученков. – Минск, МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2012. – 73 с.
2. Красная книга Республики Беларусь. Растения / гл. редкол. И.М. Качановский и др. – 4-е изд. – Минск: Беларус.Энцыкл. им. П.Броуки, 2015. – 448 с.
3. <http://arctg.is/2hssjpw>
4. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т. В. Матвеева [и др.] // Экологическая генетика. – 2011. – Том IX, № 1. – С.32-43.
5. Kress, W.J., Erickson, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE, 2(6). 1-10. e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.

6. <http://plantarum.ca/botany/silica/>
7. Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE, 6(5): 1-28. e19254. doi: 10.1371/journal.pone.0019254.
8. Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y. et al. 2010. PLoS ONE, 5(10): 1-9. e13102. doi: 10.1371/journal.pone.0013102.
9. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
10. Hollingsworth, M. et. al. CBOL Plant Working Group 2009. A DNA barcode for land plants PNAS, 106(31) 1-4. doi: 10.1073/pnas.0905845106
11. Gonzalez, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S. A., Petronelli P., Riera, B. et al. 2009. Identification of Amazonian Trees with DNA Barcodes PLoS ONE, 4(10).1-7. e7483. doi: 10.1371/journal.pone.0007483.