

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА»

Факультет химико-биологических и географических наук
Кафедра зоологии и ботаники

Допущена к защите

«7» апреля 20 21 г.

Заведующий кафедрой

 С.А. Дорофеев

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА
ИНВАЗИВНЫХ ВИДОВ БОРЩЕВИКОВ
Специальность – 1-31 80 01 «Биология»

Пирханов Гапланг Гадамович,
магистрант 2 года обучения

Руководитель:
Колмаков Павел Юрьевич,
доцент кафедры зоологии и ботаники,
кандидат биологических наук

Витебск 2021

Реферат

Магистерская диссертация 51 с., 4 табл., 13 рис., 22 источников.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР), АМПЛИФИКАЦИЯ, ТОТАЛЬНАЯ ДНК, RAPD-МАРКЕРЫ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, *HERACLEUM SPP.*

Цель: с помощью RAPD диагностики выявить генетический полиморфизм у инвазивных растений из родов *Heracleum*.

Практическое значение работы: полученные данные помогут на практике разработать эффективные методы борьбы с инвазивными видами *Heracleum spp.*

Предмет исследования: биоматериал инвазивных видов растений.

Объект исследования: *Heracleum spp.*

Научная новизна: данный вид исследования на территории Витебской области Республики Беларусь проводится впервые.

Область применения работы: в сельском хозяйстве, в вопросах охраны окружающей среды.

Метод исследования: лабораторно-аналитический.

Место проведения работ: Научно-исследовательская лаборатория ПЦР-анализа Витебского государственного университета имени П.М. Машерова.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение.....	4
1	Обзор аналитической литературы.....	7
1.1	Систематика и происхождение рода <i>Heraclium</i> L.....	7
1.2	Распространение борщевиков как инвазивных видов.....	8
1.3	Молекулярно-генетические маркеры, их применение для изучения генетического разнообразия, филогении растений.....	10
1.4	Теоретические основы полимеразной цепной реакции.....	12
2	Материалы и методы исследования.....	19
2.1	Материал исследования.....	19
2.2	Адаптированный протокол выделения тотальной ДНК из растительного биоматериала: фенол–хлороформным методом.....	19
2.3	Стандартный протокол выделения тотальной ДНК: метод выделения ДНК набором «Нуклеосорб С».....	22
2.4	Особенности постановки реакции амплификации с праймерами из серии ОРА.....	25
2.5	Условия реакции амплификации с неканоническими RAPD праймерами.....	31
2.6	Статистический анализ полученных данных в результате научного эксперимента.....	33
3	Результаты и их обсуждение.....	35
3.1	Результаты, полученные при секвенировании образцов.....	35
3.2	Результаты подготовки образцов для выявления генетической разнородности.....	39
3.3	Результаты проведения RAPD-ПЦР.....	42
3.4	Статистический анализ данных.....	45
	Заключение.....	48
	Список использованных источников.....	49

Введение

Генетический полиморфизм есть длительное разнообразие генотипов, при котором даже наименее распространенные генотипы в популяциях превышают 1% от общей численности. Мутации и рекомбинации генетического материала являются источником генетического полиморфизма. Согласно ряду проведенных исследований, распространение генетического полиморфизма достаточно велико [1].

Адаптация к среде обитания и скорость эволюционного процесса зависят от запаса генетического полиморфизма, находясь в прямой пропорциональности. Оценка количества полиморфных аллелей при этом традиционными генетическими методами весьма затруднительна, ведь присутствие определенного гена в генотипе обусловлено скрещиванием особей с различным проявлением фенотипических особенностей, кодируемых данным геном. Выявлению количества аллелей, формирующих данный признак, способствует вычисление доли особей с различными фенотипами в популяции [2].

В методологии исследования молекулярно-генетического полиморфизма растений за последнее время сделан шаг вперед, благодаря использованию ДНК-маркеров и, в частности, маркеров, полученных на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Быстрота получения результатов и относительная дешевизна полимеразной цепной реакции – это то, что особенно прельщает в этом методе [1].

Вариант полимеразной цепной реакции с единичным коротким произвольным праймером (ПП-ПЦР или RAPD - Random Amplified DNA) является наиболее распространенным методом в исследовании молекулярно-генетического полиморфизма. Вышеназванный метод доказал свою

эффективность в дифференциации и идентификации организмов, в работах по использованию ПП-ПЦР на сое и микроорганизмах. В настоящее время в молекулярной генетике данный метод используется повсеместно. Сложно найти и организмы, геномы которых бы не исследовали с помощью полимеразной цепной реакции. Это особенно заметно по тем мировым проектам, которые сегодня используют ДНК-маркеры для наиболее детального исследования особенно ценных в народном хозяйстве организмов [2].

Указанный метод заключается в амплификации нескольких участков ДНК клетки (тотальной ДНК), включая ДНК митохондрий, или хондриом, с использованием коротких праймеров, в результате чего есть возможность получить набор фрагментов, называемых RAPD- маркерами. Степень родства между индивидами Оценка степени родства между особями проводится, учитывая наличие или отсутствие конкретных фрагментов на электрофореграмме и степени интенсивности полос на ней [2].

В данной работе уровень ДНК-полиморфизма оценивался как отношение числа полиморфных ДНК-фрагментов и интенсивности их свечения к общему числу ДНК-маркеров с использованием статистических методов.

Цель: с помощью RAPD диагностики выявить генетический полиморфизм у инвазивных растений из родов *Heracleum*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить тотальную ДНК из растений;
2. Амплифицировать участки тотальной ДНК при помощи неканонических RAPD праймеров;
3. Визуализировать амплифицированную ДНК при помощи геля электрофореза и Gel Doc XR⁺ BIO RAD;
4. Провести секвенирование ампликонов нескольких образцов;
5. Выполнить статистический анализ полученных данных;
6. Сделать выводы.

Практическое значение работы: полученные данные помогут на практике разработать эффективные методы борьбы с инвазивными видами *Heracleum spp.*

Предмет исследования: биоматериал инвазивных видов растений.

Объект исследования: *Heracleum spp.*

Научная новизна: данный вид исследования на территории Витебской области Республики Беларусь проводится впервые.

Область применения работы: в сельском хозяйстве, в вопросах охраны окружающей среды.

Метод исследования: лабораторно-аналитический.

Место проведения работ: Научно-исследовательская лаборатория ПЦР-анализа Витебского государственного университета имени П.М. Машерова.

Список использованных источников

1. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. – 1994. – 127 с.
2. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство / В.А. Великов – 2013. – 156 с.
3. Юрченко, Е.О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК / Е.О. Юрченко, М.Г. Синявская. – 2007. – 176 с.
4. Ежова, Т.А. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. Учебно – методическое пособие по генетике растений / Т.А. Ежова, О.В. Лебедева, О.А. Огаркова, А.А. Пенин, О.П. Солдатова, С.В. Шестакова. – М.: Макс-Пресс. – 2003. – 198 с.
5. Коничев, А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова – 2008. – 279 с.
6. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрик. – 1984. – 201 с.
7. Сиволоп, Ю.М. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus*) / Ю.М. Сиволоп, А.Е. Солоденко, В.В. Бурлов // Генетика. – 1998. – С. 28 – 37.
8. Сиволоп, Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (Научно-методическое руководство) / Ю.М. Сиволоп, Р.Н. Календарь, Т.Г. Вербицкая и др. – 1998. – 227 с.
9. Сингер М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг – 1998. – 376 с.
10. Коллектив авторов «Практическое пособие по борьбе с гигантскими борщевиками (на основе европейского опыта борьбы с инвазивными сорняками)» / ред. Ш. Нильсен, Г. П. Равн, В. Нетвиг, М. Вэйд. Hoersholm, Denmark, 2005. – 43 с.

11. Кудинов, М.А. Чекалинская И. И., Черник В. В., Чурилов А. К. Интродукция борщевиков в Белоруссии / М.А. Кудинов, А.Е. Касач // Мн.: Наука и техника, 1980. – 200 с.
12. Матвеева, Т.В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д. И. Богомаз, А. Е. Демкович, Л. А. Лутова // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9. – №. 1. – С. 32-43.
13. Соловьева, А.И. Выявление полиморфизма борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi*) с помощью RAPD, ISSR, REMAP / А.И. Соловьева, Ю.И. Долгих, Е.С. Осипова, А.Ю. Степанова, О.Г. Яворская // Биология растений и биотехнология. – Белая Церковь, 2011. – С. 64.
14. Пирханов, Г.Г. Экстракция ДНК и выявление генетического полиморфизма чужеродных видов растений с помощью RAPD-диагностики / П.Ю. Колмаков, Г.Г. Пирханов, А.Ю. Леонов, Ю.И. Высоцкий // Веснік ВДУ, 2018, № 1 (98). – С. 16 – 25.
15. Электронный ресурс «Пример использования кластерного анализа STATISTICA...» <http://statistica.ru/local-portals/actuaries/example/1573>.
16. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб. - справ. Пособие / С.Н. Щелкунов. – 2004. – 179 с.
17. Шумова, Э.М. Морфология главного побега борщевика Мантегацци (*Heracleum mantegazzianum* Somm. et Lev.) в ювенильный период / Э.М. Шумова // Доклады ТСХА. 1972, вып.180, ч.2. – С.235–242.
18. Хлесткина, Е.К. Молекулярные методы анализа структуро функциональной организации генов и геномов высших растений / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. - № 4. – С. 757-768.

19. Alvarez, I. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference / I. Álvarez, J. F. Wendel // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2003. – T. 29. – №. 3. – C. 417-434
20. Ecology and management of giant hohweed (*Heracleum mantegazzianum*) / edited by P. Pysek, M.J.W.Cock, W. Nentwig, H. P. Ravn. CABI, 2007. – 324 p.
21. Harris S.A. Chloroplast DNA and biosystematics: the effect of intraspecific diversity and plastid transmission / S. A. Harris, T. Ingram // *Taxon*. – 1991. – C. 393-412.
22. Williams, J.G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey // *Nucleic acids research*. – 1990. – T. 18. – №. 22. – C. 6531-6535.