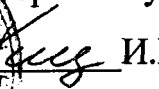



Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»
(ВГУ имени П.М. Машерова)

УДК 582.999:581.524.2 (476.5)

№ госрегистрации 20190569

Инв. № _____

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
 И.М. Прищепа
декабрь 2019 г.



О Т Ч Е Т

о научно-исследовательской работе

Морфологическая и генетическая разнородность

образцов заносных видов борщевиков,

как характеристика степени их эврибионтности в Витебской области

(заключительный)

Грант аспирантов, докторантов и студентов

Министерства образования Республики Беларусь

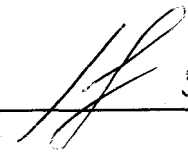
Научный руководитель

НИР,

Соискатель Гранта,

студент


Нормоконтролёр

 31.12.2019

П.Ю. Колмаков

 31.12.2019

А.Ю. Леонов

 31.12.2019

Т.В. Харкевич

РЕФЕРАТ

Отчёт 39 с., 1 ч., 10 рис., 4 табл., 16 источников, 2 прил.

БОРЩЕВИК, *HERACLEUM*, ИНВАЗИВНЫЕ ВИДЫ, ПОЛИМОРФИЗМ, ДНК, ПЦР-ДИАГНОСТИКА, RAPD, ФЕНОЛ-ХЛОРОФОРМНЫЙ МЕТОД.

Объект исследования – образцы тотальной ДНК *Heracleum sp.*

Цель работы – дать оценку экологической эврибионтности заносным видам борщевиков, распространённых в Витебской области, на основании морфологической и генетической разнородности их образцов.

Работа выполнена на базе кафедры ботаники учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Научная значимость полученных результатов – выявление внутривидовой гетерогенности и гибридизации рода *Heracleum*.

Основные результаты работы:

1. Сбор образцов для создания достоверной выборки.
2. Адаптация методов выделения и выделение тотальной ДНК из растительных образцов.
3. Подбор условий и последующее проведение реакции амплификации образцов.
4. Визуализация полученных результатов и их статистическая обработка.
5. Формирование выводов.

Практическая значимость научно-исследовательской работы заключается в выявлении степени морфогенетической гетерогенности инвазивных борщевиков, что позволяет разрабатывать новые приёмы борьбы и контроля очагов распространения *Heracleum sp* в разных регионах Беларуси. Полученные данные доказывают о проходящих процессах адаптивного мутагенеза, что ведёт к появлению новых, более устойчивых,

форм борщевика. Адаптированная для этой работы методика выделения тотальной ДНК и условия проведения ПЦР могут применяться для экологического мониторинга степени гетерогенности очагов инвазивных растений.

Социальная и экономическая значимость выполненной работы заключается в том, что её результаты расширяют и углубляют современные знания о текущем состоянии морфогенетической гетерогенности заносных видов растений на территории Витебской области.

Область применения работы:

- 1) усовершенствование экологического мониторинга контроля гетерогенности инвазий методом ПЦР;
- 2) дальнейшая разработка методов борьбы и контроля распространения борщевиков исходя из степени их генетической гетерогенности.

Содержание

РЕФЕРАТ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 Аналитический обзор литературы	8
1.1 Теоретические основы полимеразной цепной реакции.....	8
Глава 2 Материалы и методы исследований.....	15
2.1 Материал исследования.....	15
2.2. Методы экспериментальных исследований	15
2.2.1 Адаптированный протокол выделения тотальной ДНК из растительного биоматериала: фенольный метод.....	15
2.2.2 Адаптированный протокол выделения тотальной ДНК из растительного биоматериала: СТАВ метод	17
2.2.3 Особенности приготовления реакционной смеси для проведения реакции амплификации	19
2.2.4 Особенности реакции амплификации	23
2.2.5 Визуализация амплифицированных участков ДНК в агарозном геле и Gel Doc XR+ BIO RAD.....	25
2.2.6 Статистическая обработка результатов.....	27
Глава 3 Результаты исследований и их обсуждение	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	40
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	42

ВВЕДЕНИЕ

Под генетическим полиморфизмом понимается состояние длительного разнообразия генотипов, когда частота даже наиболее редко встречающихся генотипов в популяциях превышает 1%. Генетический полиморфизм поддерживается за счёт мутаций и рекомбинаций генетического материала. Как показывают многочисленные исследования, генетический полиморфизм широко распространён [1].

Чем больше запас генетического полиморфизма в данной популяции, тем легче ей адаптироваться к новой среде и тем быстрее протекает эволюция. Однако, оценить количество полиморфных аллелей посредством традиционных генетических методов практически невозможно, поскольку сам факт присутствия какого-либо гена в генотипе устанавливается путём скрещивания особей, обладающих различными формами фенотипа, определяемого этим геном. Зная, какую долю в популяции составляют особи с различными фенотипами, можно выяснить, сколько аллелей участвуют в формировании данного признака [2].

В методологии исследования молекулярно-генетического полиморфизма растений за последнее время сделан шаг вперёд, 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].

Наибольшее развитие в исследовании молекулярно-генетического полиморфизма получил вариант полимеразной цепной реакции с единичным коротким произвольным праймером (ПП-ПЦР или RAPD - Random Amplified DNA). Первые работы по использованию ПП-ПЦР были проведены на сое и микроорганизмах где данный метод показал себя как наиболее эффективный способ дифференциации организмов и их идентификации. Сегодня уже сложно найти в молекулярной генетике область, где не использовался бы

данный метод. 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-маркёры для наиболее детального исследования особо ценных в народном хозяйстве организмов [2].

Данный подход состоит в амплификации нескольких участков всей ДНК клетки (тотальной ДНК), включая ДНК митохондрий, или хондриом, посредством коротких праймеров, в результате которой получают набор фрагментов, или RAPD – маркеров. Степень родства между индивидами оценивают по наличию или отсутствию конкретных фрагментов и степени интенсивности полос на электрофореграмме [2].

Цель работы – дать оценку экологической эврибионтности заносным видам борщевиков, распространённых в Витебской области, на основании морфологической и генетической разнородности их образцов.

Задачи исследования:

1. Сбор растительных образцов *Heracleum sp.*
2. Адаптирование методики и выделение тотальной ДНК из растительных образцов.
3. Подбор оптимальных условий для проведения RAPD-ПЦР при помощи неканонических RAPD-праймеров.
4. Визуализация результатов цепной полимеразной реакции.
5. Статистическая обработка полученных данных и формирование выводов.

Объект исследования: образцы тотальной ДНК *Heracleum sp.*

Предмет исследования: выявление степени гетерогенности *Heracleum sp.*

Научная новизна: данным видом научных работ ранее никто не занимался на территории Витебской области Республики Беларусь.

Результаты исследования применимы при экологическом мониторинге очагов растительных инвазий, планировании землепользования, в других природоохранных и производственных мероприятиях.

Достоверность результатов работы подтверждается корректностью и высокой специфичностью методов исследования; исследования осуществлялись с использованием сертифицированного оборудования.

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., Синявская М.Г. 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 Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб. - справ. Пособие / С.Н. Щелкунов. – 2004. – 179 с.
- 11 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.

12 Ламан, Н.А. Гигантские борщевики – опасные инвазивные виды для природных комплексов и населения Беларуси / Н.А. Ламан, В.Н. Прохоров, О.М. Масловский. – Минск: НАН РБ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича». – 2009. – 40 с.

13 Гельтман, Д.В. Борщевик Сосновского на Северо-Западе России / Д.В. Гельтман // Доклад. Круглый стол «Биологические инвазии – поиск путей решения проблемы». – Санкт-Петербург. 2007 г.

14 Богданов, В.Л. Биологическое загрязнение территории экологически опасным растением борщевиком Сосновского / В.Л. Богданов, Р.В. Николаев, И.В. Шмелева // Фундаментальные медико-биологические науки и практическое здравоохранение: сб. науч. трудов 1-й Международной телеконференции. Томск 20 января – 20 февраля, 2010. – Томск: СибГМУ. – 2010. – С. 27–29.

15 Pyšek, P. Ecology & management of giant horweed (*Heracleum mantegazzianum*) / P. Pyšek, M.J.W. Cock, W. Nentwig, H.P. Ravn. – Hørsholm, Denmark: Royal Veterinary and Agricultural University. – P. 324.

16 Колмаков, П.Ю. 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.