

Таксономическое определение неопознанных гербарных образцов из фонда гербария МГУ имени М.В.Ломоносова с помощью секвенирования ДНК-баркодов

Научный руководитель – Сперанская Анна Сергеевна

Пензина Дарья Сергеевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра высших растений, Москва, Россия

E-mail: penzinadaria@gmail.com

В гербарии МГУ им. М.В. Ломоносова хранится более миллиона образцов растений, многие из которых не определены [4]. Причем в некоторых случаях анатомо-морфологических признаков оказалось недостаточно для идентификации растения хотя бы до семейства. Данная проблема может быть решена с помощью молекулярно-биологических методов. Таксономическая идентификация таких образцов путем секвенирования полного генома не представляется целесообразным ввиду дороговизны. В таком случае для идентификации гербарных образцов можно использовать короткие маркерные последовательности, или ДНК-баркоды. Суть состоит в том, что в геноме присутствуют вариативные нуклеотидные последовательности, различающиеся между видами и фланкированные консервативными участками. Последние используются в качестве праймеров для амплификации целевого фрагмента ядерного или хлоропластного генома. Затем последовательность амплифицированного фрагмента секвенируют, сопоставляют с референсными последовательностями из баз данных и находят наилучшее соответствие. Секвенирование по Сэнгеру является наиболее подходящим способом установить последовательность ДНК-баркода, если в пробирке присутствует ДНК строго одного вида и определенной длины. Однако ДНК гербарных образцов может находиться в настолько деградированном состоянии, что ее фрагменты не будут содержать ДНК-баркоды целиком. В таком случае приходится прибегать к другим, более ухищренным методам, таким как NGS - секвенирование нового поколения, или высокопроизводительное секвенирование.

В ходе проведенного исследования для определения было отобрано 49 неидентифицированных гербарных образцов из гербария МГУ, собранные во Вьетнаме в разные промежутки времени. Далее из каждого образца была выделена ДНК методом с применением бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ). Для выделения использовались сухие листья. Далее проводилась ПЦР каждого образца с тремя различными парами праймеров на следующие участки пластидной и ядерной ДНК:

1. Ядерная последовательность ITS1 - внутренний транскрибируемый спейсер между ядерными генами 18S и 5.8S рРНК ($\approx 150-350$ пн);
2. Пластидный ген *matK* (≈ 800 пн);
3. Межгенный участок *psbA-trnH* - спейсер между пластидными генами *trnH* и *psbA* (≈ 450 пн).

Наилучшие результаты были получены в результате ПЦР ITS1: продукт амплификации был получен в 40 из 49 случаев. Ампликоны участков *matK* и *psbA-trnH* были получены в 6 и 10 случаях из 49 соответственно.

Следующий шаг в идентификации - секвенирование. Так как для секвенирования по Сэнгеру необходима минимальная концентрация ДНК около 20 нг/мкл, то были отобраны такие препараты, которые удовлетворяли данному требованию. Для 15 из 20 образцов удалось получить результаты секвенирования. Поиск по базе данных Genebank показал,

что установленные последовательности гомологичны на 88,97-99,65 % последовательностям из растений, относящихся к родам *Duperrea*, *Ophiorrhiza*, *Stauranthera*, *Saraca*, *Aglaia*, *Kadsura*, *Hypserpa*, *Dalbergia*, *Aporosa*, *Symplocos*, *Canarium*, *Tecomella*, *Claoxylon*, *Piper*, *Viburnum*.

В результате, на данном этапе исследования были идентифицированы 15 гербарных образцов, как минимум, до семейства (возможно, до рода). Для идентификации были использованы молекулярные методы ДНК-баркодинга с применением секвенирования по Сэнгеру. Дальнейшее исследование предполагает использование методов NGS.

Источники и литература

- 1) Криницына А. А., Сизова Т. В., Заика М. А., Сперанская А. С., Сухоруков А. П. Простой и быстрый метод выделения ДНК из гербарных образцов долгого срока хранения // Биохимия, 2015, т. 80, вып. 11, с. 1698-1706.
- 2) Сперанская А. С., Криницына А. А., Шипулин Г. А., Хафизов К. Ф., Логачев М. Д. Анализ состава пищевых продуктов с помощью высокопроизводительного секвенирования: проблемы и перспективы // Генетика, 2018, т. 54, № 9, с.988-998.
- 3) Doyle, J. J., and Dickson, E. E. Preservation of plant species for DNA restriction endonuclease analysis // Taxon. 1987, vol. 36, No. 4, pp. 715-722.
- 4) <https://plant.depo.msu.ru/> (Цифровой гербарий МГУ).