

УДК 577.212.3+582

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ *RBCL* и ITS2 АНТАРКТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИИ

В.П. Дуплий¹, Н.А. Матвеева¹, А.М. Шаховский¹, Е.М. Кищенко¹, Л.Е. Курбатова²

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: jojna56@gmail.com

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской Академии наук
Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2

Реферат. Оптимизирована методика выделения суммарной ДНК для ряда растений Антарктики, культивируемых *in vitro*. Изучена возможность использования применяемых в ДНК-штрихкодировании праймеров для амплификации участков хлоропластной и ядерной ДНК (*trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS) растений Антарктики *Decshampsia antarctica* E. Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp. (2 образца), *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. Показано, что праймеры, специфичные к гену *rbcL* и межгенному спейсеру ITS2, могут быть использованы в ДНК-штрихкодировании как для сосудистых растений, так и для мохообразных Антарктики. Секвенированы амплифицированные участки гена *rbcL* и межгенного спейсера ITS2, по сиквенсам этих участков один из исследуемых образцов был определен с точностью до вида, а три образца – с точностью до рода.

Секвенування послідовностей *rbcL* та ITS2 антарктичних рослин для визначення можливості їх використання у ДНК-штрихкодіванні. Дуплій В.П., Матвєєва Н.А., Шаховський А.М., Кищенко О.М., Курбатова Л.Є.

Реферат. Оптимізовано методику виділення загальної ДНК для ряду рослин Антарктики, що культивуються *in vitro*. Вивчено можливість застосування відповідних праймерів для ампліфікації ділянок хлоропластної і ядерної ДНК (*trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS) рослин Антарктики *Decshampsia antarctica* E. Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp. (2 зразки), *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. з метою подальшого використання цих ділянок для ДНК-штрихкодівання. Показано, що зазначені праймери можуть бути використані для ампліфікації гена *rbcL* та міжгенного спейсера ITS2 як судинних рослин, так і мохоподібних Антарктики. Секвеновано ампліфіковані ділянки гена *rbcL* та міжгенного спейсера ITS2, за сиквенсами цих ділянок один з досліджуваних зразків було визначено до виду, а три – до роду.

Antarctic plant *rbcL* and ITS2 sequencing for determination of possibility in DNA barcoding. Duplij V., Matvieieva N., Shakchovsky A., Kishchenko O., Kurbatova L.

Abstract. The extraction technique of total DNA of Antarctic plants cultivated *in vitro* was optimized. The possibility of application of used in DNA barcoding primers for amplification of chloroplast and nuclear DNA (*trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS) of Antarctic plants such as *Decshampsia antarctica* E. Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp. (2 samples), *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. was investigated. It was shown that primers for *rbcL* gene and intergenic spacer ITS2 can be used in DNA barcoding both Vascular plants and Bryophyta of Antarctica. After the sequence analysis of *rbcL* and ITS2 one sample has been determined to within a species, and three samples to within a genus.

Keywords: molecular taxonomy, DNA barcoding, Antarctic plants, *in vitro* culture

1. Введение

С тех пор как в 2003 г. П. Хебертом было предложено использовать ДНК-штрихкодирование для видовой идентификации особей, включая трудно определяемых, поврежденных и находящихся на личиночной стадии развития, с помощью короткой стандартной последовательности цепи ДНК (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b), эта идея бурно развивается в рамках международной программы “Barcode of life”. В проект вовлечены уже более 40 стран. В первые же годы технология нашла широкую поддержку среди систематиков, генетиков и эволюционных биологов, которые подтвердили, что она недорога, удобна и позволяет проводить достаточно точную идентификацию живых организмов (Захаров и др., 2007).

Для видового определения животных успешно используется последовательность митохондриального гена цитохром С оксидазы I (*coxI*). Однако оказалось, что эта последовательность не может быть использована для идентификации растений. В настоящее время предлагаются к изучению, например, хлоропластные гены или межгенные спейсеры *trnH-psbA*, *matK*, *rpoC*, *rpoB*, *rbcL*. Кроме того, представляют интерес также участки ядерной ДНК – внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) ядерных рибосомных генов (18S-5.8S-26S) (Kress & Erickson, 2005, Kress & Erickson, 2007, Chiou et al., 2007, Gao et al., 2011, Hollingsworth et al., 2009, Chen et al., 2010).

В настоящей работе нами исследована возможность применения используемых другими авторами (Kress & Erickson, 2007, Chiou et al., 2007, White et al., 1990) праймеров для амплификации участков *trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS антарктических растений при определении участка, пригодного для их ДНК-штрихкодирования. Материалом для исследований являлись растения, культивируемые в стерильных условиях. Использование именно такого материала гарантирует их видовую чистоту и отсутствие возможной чужеродной ДНК в исследуемом материале.

2. Материалы и методы

Материалом для исследований служили культивируемые *in vitro* растения *Decshampsia antarctica* E. Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp. (2 образца), *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. Для их введения в культуру поверхность нативных образцов стерилизовали и культивировали *in vitro* на агаризованной среде МС (Murashige & Skoog, 1962) при +24°C и 16-часовом световом фотопериоде.

Таблица 1 Праймеры, которые были использованы для амплификации

№	Гены	Праймеры	Источник
1	<i>rbcL</i>	5' – atg tca cca caa aca gag act aaa gc – 3' 5' – ctt ctg cta caa ata aga atc gat ctc – 3'	Kress & Erickson, 2007
2	ITS2	5' – atg cga tac ttg gtg tga at – 3' 5' – gac gct tct cca gac tac aat – 3'	Chiou et al., 2007
3	ITS	5' – gga agt aaa agt cgt aac aag g – 3' 5' – tcc tcc gct tat tga tat gc – 3'	White et al., 1990
4	<i>trnH-psbA</i>	5' – act gcc ttg atc cac ttg gc – 3' 5' – cga agc tcc atc tac aaa tgg – 3'	Kress & Erickson, 2007

Для выделения общей ДНК использовали оптимизированную нами методику. 35–70 мг растительного материала гомогенизировали в 0,5 мл 2-кратного ЦТАБ буфера с 2% меркаптоэтанола, инкубировали 20 мин. при 56°C; обрабатывали 0,5 мл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (10–15 мин); центрифугировали 15 мин. при 14 тыс. об/мин (микрочентрифуга

Erppendorf 5415C); к супернатанту добавляли 2/3 объема изопропанола и оставляли на 1 час при -20°C . Далее центрифугировали 10 мин. при 14 тыс. об/мин., осадок растворяли в 1M растворе NaCl, добавляли РНКазу (конечная концентрация 10 мкг/мл), инкубировали при 37°C 30 мин.; обрабатывали хлороформ-изоамиловым спиртом 5–10 мин, центрифугировали 10 мин. К супернатанту добавляли 2 объема этанола, оставляли на 1 час при -20°C . Осадок промывали последовательно 70% и 85% этанолом, подсушивали и растворяли в 50 мкл ТЕ буфера. Условия амплификации: начальная денатурация: 94°C – 3 мин.; 94°C – 30 сек, 56°C – 30 сек, 72°C – 45 сек; количество циклов – 33, окончательная элонгация: 72°C – 5 мин. При проведении ПЦР использовали праймеры, приведенные в таблице 1.

Результирующий контиг секвенирования получали сравнением прямой и обратно-комплементарной последовательностей, используя программу CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологичные последовательности подбирали из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) при помощи алгоритмов BLAST (Altschul et al, 1990). Автоматическое выравнивание, подсчет количества замен на сайт и построение дерева методом максимального правдоподобия проводились в программе MEGA5 (Tamura et al., 2011).

3. Результаты и обсуждение

Как известно, условиями, которым должны соответствовать участки ДНК – потенциальные маркеры для ДНК-штрихкодирования, являются: относительно небольшой размер (до 800 пар нуклеотидов); наличие консервативных фланкирующих последовательностей; превышение межвидовой вариабельности над внутривидовой. Участки ДНК *trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS растений разных видов изучались в ряде работ (Kress & Erickson, 2007, Chen, 2010, Hollingsworth et al., 2009) с целью определения возможности их использования для штрихкодирования растений. Однако растения Антарктики, как высшие сосудистые, так и мохообразные, до сих пор не были объектами подобных исследований. Мы использовали предложенные в этих работах праймеры с целью определения возможности использования для амплификации указанных выше участков ДНК растений, которые встречаются в Антарктике, а также определения размеров этих участков.

При амплификации хлоропластной ДНК праймерами № 4 были получены множественные сигналы (рис. 1г) как для сосудистых, так и для мохообразных растений. Наличие нескольких продуктов амплификации ставит нас перед необходимостью выбора одного из них, что противоречит идее автоматизации ДНК-штрихкодирования. Таким образом, существует необходимость подбора других праймеров, для того чтобы участок *trnH-psbA* мог бы быть использован для наших задач. При применении праймеров № 3 размеры ампликонов для растений *D. antarctica*, *C. quitensis* и *B. archangelicum* находились в допустимых пределах (около 750 п.н), в то время как у двух видов (*W. fontinaliopsis* и *B. pseudotriquetrum*) они превышали 1000 п.н. (рис. 1в), что больше рекомендованного из-за трудности секвенирования в один проход. Продукты амплификации праймерами № 1 (для *rbcL*) и № 2 (для ITS2) имели размеры порядка 700 (рис.1а) и 550 п.н (рис.1б) соответственно и в дальнейшем использовались нами для секвенирования четырех образцов антарктических мхов (табл. 2 и 3).

Три образца (образцы 1, 2, 4) имели совпадающие последовательности ДНК обоих участков и были определены с точностью до рода (*Bryum*). Нативные образцы, из которых были получены эти *in vitro* коллекционные линии, предварительно были определены как *B. archangelicum* (образцы 1, 2) и *B. pseudotriquetrum* (образец 4). Учитывая их различную морфологию в культуре *in vitro* и регенерационную способность, логично предположить, что это всё-таки различные генотипы, не различающиеся по данным маркерам. Кроме того, в Генбанке представлены и другие виды данного рода, имеющие одинаковые сиквенсы исследуемых участков. Возможно, нужна иная комбинация маркерных последовательностей для более точного определения как представителей этого рода, так и других бриофитов.

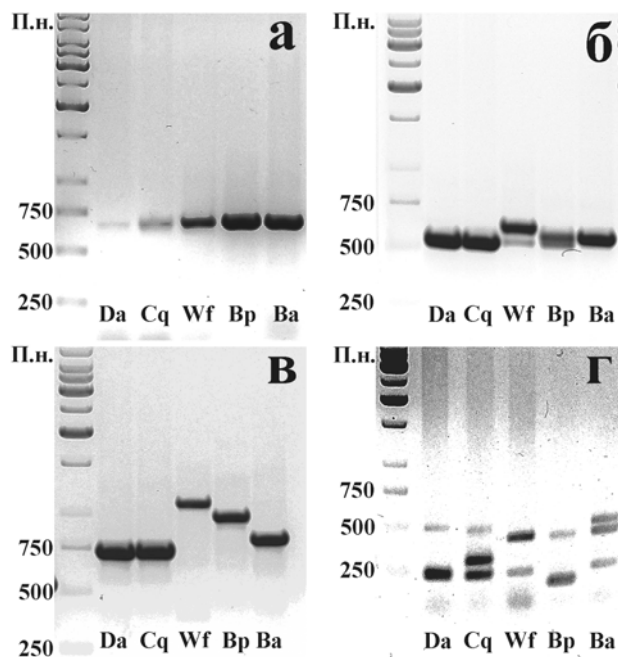


Рис. 1. Электрофореграммы результатов ПЦР: амплификация участков ДНК *rbcL* (а), ITS2 (б), ITS (в), *trnH-psbA* (г); Da – *D. antarctica*, Cq – *C. quitensis*, Bp – *B. pseudotriquetrum*, Ba – *B. archangelicum*, Wf – *Warnstorfia fontinaliopsis*

Таблица 2. Результат секвенирования ампликонов, полученных с использованием праймеров № 1 (*rbcL*) для четырех образцов мохообразных

Образец 1	<p>ACAGAGACTAAAGCAGGTGTTGGATTAAAGCTGGTGTTAAAGATTACAGAT TAAATTTACTCCAGATTATCAGACTAAAGAAACTGATATTTTAGCAG CATTTCGAATGACTCCTCAACCAGGAGTACCAGCTGAAGAGGCAGGAGCTG CAGTAGCTGCGGAATCTCCACTGGTACATGGACCACTGTTTGGACTGATG GACTTACTAGTCTTGATCGTTATAAAGGACGATGCTATGATATTGAAGCAG TTGCTGGAGAAGATAATCAATATATTGCTTATGTTGCTTACCCATTAGACTT ATTTGAAGAAGGTTCTGTTACCAATTTATTTACTTCTATTGTTGGTAATGTTT TTGGATTTAAAGCTTTACGAGCTTTACGTCTAGAAGATTTACGTATTCTCC AGCTTATTCCAAAACSTTTTCAAGGCCACSTCATGGTATTCAAGTTGAACGA GATAAATTAACAATAATGGTTCGTCATTTAGGATGTAATAAGCCA AAATTAGGTTTATCTGCTAAAAACTATGGTCGAGCTGTATATGAATGTC</p>
Образец 2	<p>CAGAGACTAAAGCAGGTGTTGGATTAAAGCTGGTGTTAAAGATTACAGAT TAAATTTACTCCAGATTATCAGACTAAAGAAACTGATATTTTAGCAG CATTTCGAATGACTCCTCAACCAGGAGTACCAGCTGAAGAGGCAGGAGCTG CAGTAGCTGCGGAATCTCCACTGGTACATGGACCACTGTTTGGACTGATG GACTTACTAGTCTTGATCGTTATAAAGGACGATGCTATGATATTGAAGCAG TTGCTGGAGAAGATAATCAATATATTGCTTATGTTGCTTACCCATTAGACTT ATTTGAAGAAGGTTCTGTTACCAATTTATTTACTTCTATTGTTGGTAATGTTT TTGGATTTAAAGCTTTACGAGCTTTACGTCTAGAAGATTTACGTATTCTCC AGCTTATTCCAAAACSTTTTCAAGGCCACSTCATGGTATTCAAGTTGAACGA GATAAATTAACAATAATGGTTCGTCATTTAGGATGTAATAAGCCA AAATTAGGTTTATCTGCTAAAAACTATGGTCGAGCTGTATATGAATGTCCTC GTGGTGGACTTGATTTACAAAAGATGATGAAAACGTAATTTCTCAACSTT TTATGCGTTGGAGAGATCGATTTC</p>

Продолжение таблицы 2

Образец 3	GACTAAAGCAGGTGTTGGATTTAAAGCTGGTGTAAAGATTATAGATTTAAAT TATTACACTCCAGATTATCAGACTAAAGAACTGATATTTTAGCAGCATTT CGAATGACTCCTCAACCAGGAGTACCAGCTGAAGAGGCAGGAGCAGCAGT AGCTGCGGAATCTTCCACTGGTACATGGACTACTGTTTGGACTGATGGACTT ACTAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTATGATATTGAAGCAGTTCCT GGAGAAGATAATCAATATATCGCTTATGTTGCTTACCCATTAGATTTATTTG AAGAAGGTTCTGTTACCAATTTATTTACTTCTATTGTTGGTAATGTTTTTGG TTAAAGCTTTACGGCTTTACGTCTAGAAGATTACGTATTCCTCCAGCTT ATACSSAAAACCTTCCAAGGTCCACCTCATGGTATTCAAGTTGAAAGAGATA AATTA AACAAATATGGTCGTCCATTATTAGGATGCACTATTAAGCCAAAAT TGGGTTTATCTGCTAAAAACTATGGTAGAGCTGTATATGAATGTCTTCGTGG TGGACTTGATTTACAAAAGATGATGAAAACGTAATTCAGCCTTTCAT GCGTTGGAGAGATCGAT
Образец 4	AGAGACTAAAGCAGGTGTTGGATTTAAAGCTGGTGTAAAGATTACAGATT AAATTATTACACTCCAGATTATCAGACTAAAGAACTGATATTTTAGCAGC ATTTTCGAATGACTCCTCAACCAGGAGTACCAGCTGAAGAGGCAGGAGCTGC AGTAGCTGCGGAATCTTCCACTGGTACATGGACCACTGTTTGGACTGATGG ACTTAGTAGTCTTGATCGTTATAAAGGACGATGCTATGATATTGAAGCAGTT GCTGGAGAAGATAATCAATATATTGCTTATGTTGCTTACCCATTAGACTAT TTGAAGAAGGTTCTGTTACCAATTTATTTACTTCTATTGTTGGTAATGTTTTT GGATTTAAAGCTTTACGAGCTTTACGTCTAGAAGATTACGTATTCCTCCAG CTTATTTCCAAAACCTTTTCAAGGCCACCTCATGGTATTCAAGTTGAACGAGA TAAATTA AACAAATATGGTCGTCCATTATTAGGATGTA CTATTAAGCCAAA ATTAGGTTTATCTGCTAAAAACTATGGTCGAGCTGTATATGAATGTCTTCGT GGTGGACTTGATTTACAAAAGATGATGAAAACGTAATTCACACCTTTT ATGCGTTGGAGAGATCGAT

Таблица 3. Результат секвенирования ампликонов, полученных с использованием праймеров № 2 (ITS2) для четырех образцов мохообразных

Образец 1	CAAGTTGCGCCCCGAGGCTTGTCCGAGGGGCATTTCCGTTAGAGCGTCACCGCGC CCCCCACCACACTCCCCAAGTACTTTTTGTA CTTGTGCGCCAGTTTGAGTGG GAACTGGCCGTCCCGGAGTGCTAAGGTACCCGGGTCGGCTGAAATGGAGGG GAATTTGGCCCGCCGTGGCATCACTTGCCCCGCGATCAGGTGTGATTACGAAC TCCCACGGCACTTAGTGTCGTGGGACTTGGGTCTTCCAAGTGCGGGGCTCCC GGTGAGCCCGAGTGCGTGCGAGTTCCACAGCAGGCTACCTTATACTCAAGG CCTTCCACTCTGTGGAAGGCCTCGAGGAAACGAAGAGGTAACGCATCAGAC CTCTAATCGGAAAAGACTACCCGCCGAGTTTAAGCATATCACTAAGCGGAG GACAAGAAACTAACCAGGATTTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGAAAGA GCCAGCT
Образец 2	AGTTGCGCCCCGAGGCTTGTCCGAGGGGCATTTCCGTTAGAGCGTCACCGCGCC CCCCCACCACACTCCCCAAGTACTTTTTGTA CTTGTGCGCCAGTTTGAGTGG AACTGGCCGTCCCGGAGTGCTAAGGTACCCGGGTCGGCTGAAATGGAGGGA ATTTGGCCCGCCGTGGCATCACTTGCCCCGCGATCAGGTGTGATTACGAACT CCACGCACTTAGTGTCGGGACTTGGGTCTTCCAAGTGCGGGGCTCCCGT GAGCCCGAGTGCGTGCGAGTTCCACAGCAGGCTACCTTATGCTCAAGGCCTT CCTCTGTGGAAGGCCTCGAGGAAACGAAGAGGTAACGCATCAGACCTCT AATCGGAAAAGACTACCCGCCGAGTTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGACA AGAAACTAACCAGGATTTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGAAAGAGCC

Продолжение таблицы 3

Образец 3	TGAATTGCAGAATTCGCGAATCATTGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCG AGGCTTGTCCAAGGGCATTTCGCTAGAGCGTCACCGCGCCCCCCCCACCGGG TCCCAAACCGGCCCGAGTGAAACTGGCCGTCCCAGCGAGGTACGCCGCGAG CGTGCTGGCTGGGTCTGGCTGAAAATAGAGGGAAACTCGTATCGCCGTGGCGA CATTCGCCCCGCGATCAGGTGCTCACATTGTGTTCGTCAAAGTGCGGGGTTG CAGGTCGCCCCAAGTGCGAGCGAGTTCCAAAGCAGGTCCAAATTTTTTCTTA GTCCCGGCTCGCGCCGGGACTAAGTTGAGTTAAGTCACGCATCAGACCTCTA ATCGGAAAAGACCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAGAA GAAACTAACCCAGGATTTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGAAAGAGCCCA GCTTGAAAATCGCGCCCGCGAAGGCGGCGCAATTGTAGTCTG
Образец 4	GTGAATTGCAGAATTCGCGAATCATTGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCG GAGGCTTGTCCGAGGGCATTTCGCTAGAGCGTCACCGCGCCCCCCCCACCA ACTCCCAAGTACTTTTTGTACTTGTGCGCCAGTTTGAGTGGAAGTGGCCGT CCCGGAGTGCTAAGGTACCCGGGTCGGCTGAAATGGAGGGAATTTGGCCGC CGTGGCATCACTTGCCCCGCGATCAGGTGTGATTACGAACTCCACGGCACT TAGTGTCGTGGGACTTGGGTCTTCCAAGTGCGGGGCTCCCGGTGAGCCCGAG TGCGTGCGAGTTCCACAGCAGGCTACCTTATACTCAAGGCCTTCCACTCTGT GGAAGGCCTCGAGGAAACGAAGAGGTAACGCATCAGACCTCTAATCGGAAA AGACTACCCGCGAGTTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGACAAGAAACTAA CCAGGATTTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGAAAGAGCCAGCTTGAAA ATCGGGGCGCCTTGCGCCCGAATTG

Один из исследуемых образцов (образец 3) имел последовательность ITS2, идентичную имеющейся в Генбанке последовательности *Pohlia nutans* (gi24397254). По участку *rbcL* наиболее близкая последовательность (gi47606991) относилась к тому же виду и отличалась от нашего образца на 3 п.н. Следует отметить, что этот образец был *in vivo* определен как *Bryoerythrophyllum recurvirostrum*. Нативные образцы мохообразных, полученные нами из нескольких регионов Антарктики, как правило, были поливидовыми, т.е. в них было представлено от двух до четырёх видов. Вероятно, растения *P. nutans* в исходном нативном образце были представлены минимально, однако после поверхностной стерилизации именно растения этого вида были введены в асептическую культуру.

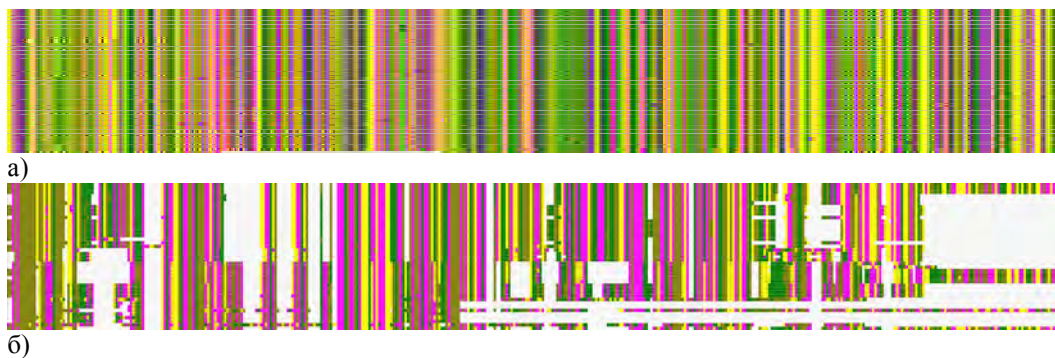


Рис. 2. Результат выравнивания гомологичных последовательностей фрагмента гена *rbcL* (а) и внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (б).

В ряде публикаций предложено использовать комбинацию нескольких участков ДНК для видового определения растений. Так, предлагаются участки *rbcL+trnH-psbA* (Kress, 2007), *matK+rpoC1+rpoB* (Chase, 2007), *matK+rpoC1+trnH-psbA* (Chase, 2007), *matK+atpF-atpH+trnH-psbA* (Lee, 2007), *matK+atpF-atpH+psbK-psbI* (Lee, 2007). В 2009 году

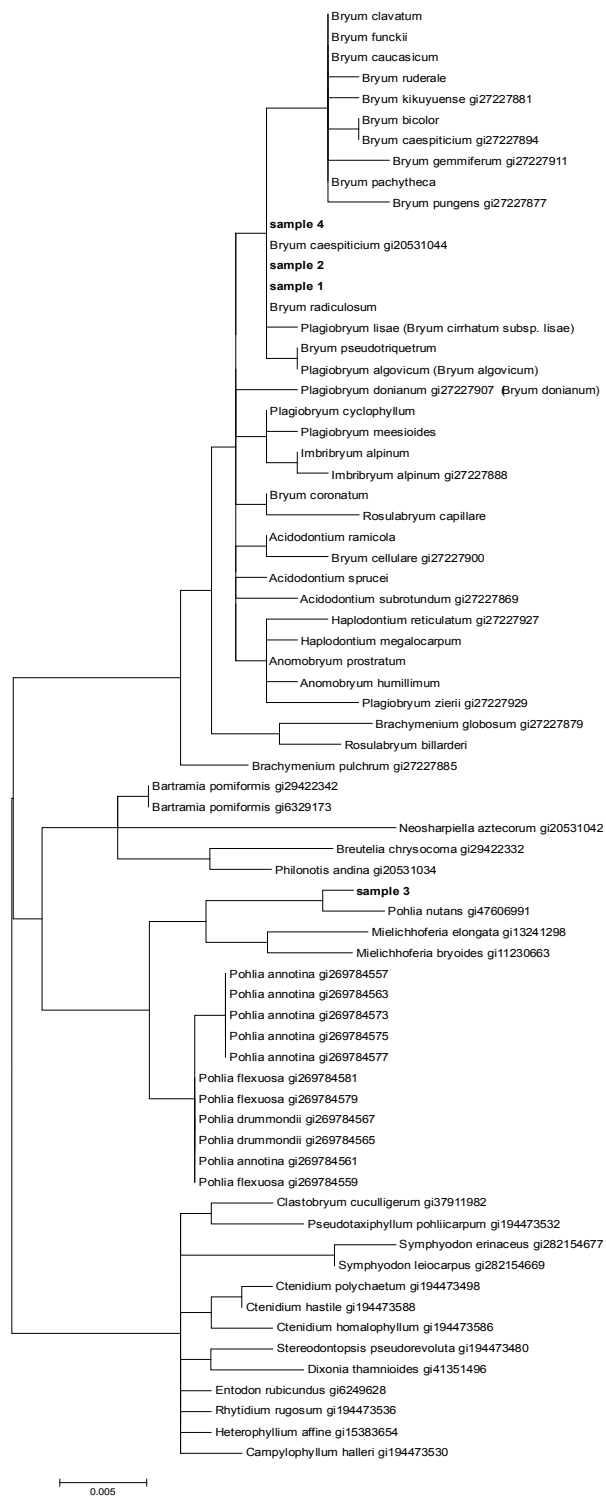


Рис. 3. Отличие изучаемых последовательностей *rbcl* образцов (1–4) антарктических растений (выделены жирным шрифтом) от наиболее гомологичных им, полученных из Генбанка.

(Hollingsworth et al., 2009) рабочая группа CBOL Plant Working Group предложила в качестве стандартной для растений использовать комбинацию хлоропластных генов *rbcL* и *matK*, однако подводить черту под поиском адекватного набора участков ДНК и соответствующих праймеров для видового определения растений ещё рано. В указанной работе приводятся данные, свидетельствующие о высокой разрешающей способности *rbcL* (87%) для криптогам (нецветковых), которыми являются большинство растений Антарктики, но саму эту группу не рассматривали при анализе комбинаций кандидатных участков. Мы вынуждены были временно отказаться от работы с *matK*, так как в Генбанке для мхов нам удалось найти только около двух десятков последовательностей этого участка, в то время как для *rbcL* их были тысячи. По той же причине мы не использовали специализированные для ДНК-штрихкодирования базы данных. Мы надеялись привлечением ITS2 получить дополнительные данные, которые бы позволили более точно определить виды исследуемых образцов. Однако, как показали исследования, использование двух участков – *rbcL* и ITS2 не дало дополнительной информации по сравнению с идентификацией только по одному участку (*rbcL*).

Нами была оптимизирована методика выделения суммарной ДНК для ряда растений Антарктики (*D. antarctica*, *C. quitensis*, *B. pseudotriquetrum*, *B. archangelicum*, *W. fontinaliopsis*, *P. nutans*), культивируемых *in vitro*, а также изучена возможность использования предложенных ранее праймеров для амплификации участков хлоропластной и ядерной ДНК (*trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS) этих растений с целью дальнейшего использования для ДНК-штрихкодирования. Показано, что праймеры, использованные ранее в работах (Kress & Erickson, 2007, Chiou et al., 2007), могут успешно применяться для амплификации участков хлоропластной (*rbcL*) и ядерной (ITS2) ДНК растений Антарктики *D. antarctica*, *C. quitensis*, *B. archangelicum*, *W. fontinaliopsis* и *B. pseudotriquetrum*, *P. nutans*. Было секвенировано по два участка ДНК (*rbcL* и ITS2) четырёх образцов антарктических мхов и показана возможность определения трёх из них до рода и одного до вида как по фрагменту хлоропластного гена *rbcL*, так и по межгенному спейсеру ITS2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального антарктического научного центра.

Литература

- Захаров И.А., Шайкевич Е.В., Ившин Н.В. ДНК-штрихкодирование в энтомологии // Природа. – 2007. – № 9. – С.3-9.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // J Mol Biol. – 1990 – vol.215, № 3. – P. 403-410.
- Chase M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M. et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants// Taxon. – 2007. – vol.56. – P. 295–299.
- Chen S., Yao H., Han J. et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species // PLoS One. – 2010. – vol.5, № 1. – e8613.
- Chiou S.J., Yen J.H., Fang C.L. et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. // Planta Med. – 2007. – vol.73. – P. 1421–1426.
- Gao T., Sun Z., Yao H. et al. Identification of Fabaceae Plants Using the DNA Barcode *matK* // Planta Med. – 2011. – vol. 77, № 1. – P.92-94.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. et al. Biological identifications through DNA barcodes. // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003a. – vol. 270. – P. 313–322.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003b. – vol.270(Suppl.). –P. S596–S599.
- Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L. et al. A DNA barcode for land plants // PNAS. – 2009. – vol.106, № 31. – P. 12794–12797.

Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E.A et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // PNAS . – 2005. – vol. 102, № 23. – P. 8369–8374.

Kress W.J., Erickson D.L. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region// PLoS ONE. – 2007. – vol. 2, № 6. – e508.

Lee H-L, Yi D-K, Kim J-S, Kim K-J. Development of plant DNA barcoding markers from the variable noncoding regions of chloroplast genome. // Second International Barcode of Life Conference. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 18-20 September, 2007. – 2007. – P. 23.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – vol. 15, № 3. - P.473-497.

Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – vol.28. – P. 2731-2739.

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. // In: InnisMA, GelfandDH, SninskyJJ, WhiteTJ eds. PCR protocols: A guide to methods and applications. – New York: Academic Press. – 1990. – P. 315–322.