

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 24**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2018

УДК [577.21 + 575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2018. — Т. 24. — 110 с. — ISSN 1999-9127.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский — главный редактор, Л.В. Хотылёва — зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
А.И. Ковалевич, Ф.И. Привалов, А.В. Сукало, В.А. Лемеш, С.А. Лихачёв,
Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова, И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров,
В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычёва, Н.И. Дубовец, В.В. Титок, И.П. Шейко,
О.Н. Харкевич — члены редколлегии;
И.В. Широкая — ответственный секретарь.

УДК [577.21 + 575] (082)
ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.В. Савина, С.В. Кубрак, Е.И. Кузьминова, Л.В. Милько, А.П. Колбас, Н.М. Матусевич, Е.П. Михаленко, Е.Н. Макеева, А.В. Кильчевский</i> Подбор маркеров для ДНК-баркодинга диких видов семейства <i>Orchidaceae</i> на примере <i>Anacamptis morio</i> L.	5
<i>С.И. Вакула, О.А. Орловская, Л.В. Хотылёва, И.Н. Леонова</i> Изменчивость хозяйственно-ценных признаков у интрогрессивных линий <i>T. aestivum</i> / <i>T. timopheevii</i> в агроэкологических условиях Республики Беларусь и Западно-Сибирского региона России	12
<i>Н.В. Савина, А.А. Яцкив, Н.В. Никитченко, Т.Д. Кужур, Е.В. Сечко, А.В. Чичко, А.В. Сукало, Р.И. Гончарова</i> Полиморфизм ряда генов иммунного и воспалительного ответа как фактор предрасположенности к ювенильному идиопатическому артриту	22
<i>Ю.В. Дюбо, Е.А. Николайчик</i> Модификация вирулентных свойств <i>Pectobacterium atrosepticum</i> конъюгативной плазмидой pPA21A.....	37
<i>М.А. Сасинович, А.М. Слуквин, А.В. Алехнович</i> Сравнительный генетический анализ популяций длиннопалого рака (<i>Astacus leptodactylus</i> Esch.) в озерах Брестской области	45
<i>Т.Д. Кужур</i> Ревматоидный артрит: исторические и современные аспекты (Обзорная статья).....	55
<i>Н.И. Рябоконт</i> Генетическая предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям у детей (Обзорная статья).....	74
<i>К.В. Бакунович, И.Б. Моссэ, Е.В. Кобец, А.А. Гордеев, И.В. Головкова, С.П. Питомец, С.Л. Минин</i> Изменение экспрессии генов <i>HIF1A</i> , <i>UCP2</i> и <i>MTHFR</i> у профессиональных спортсменов в ответ на физическую нагрузку.....	94
Правила оформления статьи.....	105

CONTENTS

<i>N.V. Savina, S.V. Kubrak, E.I. Kuzminova, L.V. Milko, A.P. Kolbas, N.M. Matusevich, E.P. Mikhalenko, E.N. Makeyeva, A.V. Kilchevskiy</i> Choosing of DNA-barcoding markers for wild species of the <i>Orchidaceae</i> family by the example of <i>Anacamptis morio</i> L.....	5
<i>S.I. Vakula, O.A. Orlovskaya, L.V. Khotyleva, I.N. Leonova</i> Variability of agronomically valuable traits in <i>T. aestivum</i> / <i>T. timopheevii</i> introgression lines in agroecological conditions of the Republic of Belarus and the West Siberian region of Russia	12
<i>N.V. Savina, H.A. Yatskiu, N.V. Nikitchenko, T.D. Kuzhir, E.V. Sechko, A.M. Tchitchko, A.V. Sukalo, R.I. Goncharova</i> Polymorphism of a set of genes involved in immune and inflammatory responses as a predisposing factor for juvenile idiopathic arthritis	22
<i>Y.V. Diubo, Y.A. Nikolaichik</i> Modification virulent properties of <i>Pectobacterium atrosepticum</i> by conjugative plasmid pPA21A.....	37
<i>M.A. Sasinovich, A.M. Shukvin, A.V. Alekhnovich</i> Comparative genetic analysis of populations of narrow-clawed crayfish (<i>Astacus leptodactylus</i> Esch.) in the lakes of Brest region	45
<i>T.D. Kuzhir</i> Rheumatoid arthritis: historical and current aspects (Review Article).....	55
<i>N.I. Ryabokon</i> Genetic predisposition to pediatric autoimmune diseases (Review Article).....	74
<i>K.V. Bakunovich, I.B. Mosse, E.V. Kobets, A.A. Gordeev, I.V. Golovkova, S.P. Pitomiats, S.L. Minin</i> Changes in <i>HIF1A</i> , <i>UCP2</i> and <i>MTHFR</i> genes expression of professional athletes in response to physical exertion.....	94
Instructions to Authors	105

Н.В. Савина¹, С.В. Кубрак¹, Е.И. Кузьминова¹, Л.В. Мицько¹, А.П. Колбас², Н.М. Матусевич²,
Е.П. Михаленко¹, Е.Н. Макеева¹, А.В. Кильчевский¹

ПОДБОР МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-БАРКОДИНГА ДИКИХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *ORCHIDACEAE* НА ПРИМЕРЕ *ANACAMPTIS MORIO* L.

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: N.Savina@igc.by

²Брестский государственный университет им. А.С. Пушкина

Республика Беларусь, 224016, г. Брест, бул. Космонавтов, 21

Представители флоры Беларуси из семейства *Orchidaceae* известны своими декоративными и фармакологическими свойствами. Одним из способов контроля за состоянием их природных популяций является ДНК-идентификация. На примере ятрышника-дремлика (*Anacamptis morio* L.) продемонстрирована возможность успешного использования комбинации трех маркеров (*ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*) для ДНК-штрихкодирования растений семейства *Orchidaceae*. Наиболее информативными оказались *ITS2* и *rbcL*, позволяющие с точностью 99,82–100% определить вид изучаемого растения. Использование маркерных последовательностей *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH* позволит проводить массовый скрининг растений, произрастающих на охраняемых территориях.

Ключевые слова: ДНК-баркодинг, ДНК-штрихкод, Орхидные, ятрышник-дремлик.

Введение

Семейство Орхидные (*Orchidaceae*), или Ятрышниковые, — одно из крупнейших среди цветковых растений, насчитывающее, по разным данным, от 20 до 35 тысяч видов. Орхидные широко распространены по всему земному шару вплоть до Северного Ледовитого океана, однако большинство видов произрастает в тропических лесах и высокогорьях. В составе флоры Беларуси встречается более 30 видов дикорастущих Орхидных. Из-за сложного и длительного цикла развития и чувствительности к изменениям окружающей среды число видов дикорастущих орхидей постепенно сокращается. В настоящее время в Красную книгу Беларуси внесено 24 представителя *Orchidaceae*, по степени риска исчезновения они относятся к 1–3 категориям национальной природоохранной значимости [1]. Представители семейства Орхидные в первую очередь известны как красивоцветущие декоративные растения. Помимо этого, *Orchidaceae* являются объектом пристального внимания в связи с изучением их фармакологических свойств. В народной медицине Орхидные издавна использовались в качестве тонизирующих, болеутоляющих,

иммуностимулирующих средств. В последнее время изучаются перспективы получения препаратов с противораковым действием на основе растений этого семейства.

Ятрышник-дремлик (*Anacamptis morio* L.) — один из представителей семейства *Orchidaceae*, произрастающий в дикой природе на территории Беларуси. С яркой окраской околоцветника, широко применяемый в народной медицине, этот вид взят под государственную охрану в 1964 г. как исчезающее растение (категория охраны 2). Основными факторами, влияющими на выживание и распространение этого вида, являются хозяйственная трансформация земель, осушительно-мелиоративные работы, чрезмерные рекреационные нагрузки (срыв цветущих растений). Помимо запрещения антропогенных воздействий на места произрастания вида, меры охраны предполагают постоянный контроль за состоянием известных популяций и поиск новых, а также сохранение генофонда вида в условиях культуры и расселение в естественные экотопы [2].

С появлением технологии ДНК-баркодинга задачи идентификации вида и контроля за природными популяциями решаются при

помощи молекулярно-генетического анализа стандартных небольших участков генома изучаемого вида (т. н. ДНК-штрихкодов). В исследованиях по ДНК-баркодированию представителей семейства *Orchidaceae* разными авторами предлагается до 11 маркеров (как по отдельности, так и комбинированных). В работе Tang H. и соавт. (2017) в качестве оптимальной предлагается комбинация маркеров *matK+psbA-trnH+ITS2* [3], в исследованиях Xu S. и соавт. (2015) показана высокая эффективность двух маркеров *ITS+matK* [4], в работе корейских авторов Kim H.M. и соавт. (2014) преимущество отдано трехкомпонентной комбинации маркеров *atpF-atpH+psbK-psbI+trnH-psbA* [5]. Таким образом, подбор мультилокусных комбинаций 2–3 маркеров для ДНК-идентификации диких видов семейства *Orchidaceae* является необходимым предварительным этапом перед массовым скринингом популяций, произрастающих на охраняемых территориях.

Цель данного исследования — установить возможность применения отдельных маркерных последовательностей, используемых в качестве ДНК-штрихкодов, для идентификации редких дикорастущих растений семейства *Orchidaceae*. В работе были использованы два пластидных маркера *rbcL* и *psbA-trnH* и один маркер ядерной последовательности *ITS2*.

Материалы и методы

Сбор растительного материала ятрышника-дремлика (3 растения, апикальная часть листьев) проведен сотрудниками Национального парка «Беловежская пуца» без изъятия

растений из мест произрастания. Собранный растительный материал до изоляции ДНК хранился при 4° С. Перед выделением растительный материал замораживали в жидком азоте и растирали в фарфоровой ступке. Для выделения тотальной ДНК использовали набор *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Германия). Оценку концентрации и чистоты полученных образцов нуклеиновых кислот выполняли с помощью спектрофотометра *Implen P 360* (Implen, Германия). Для визуальной оценки качества полученных матриц ДНК проводили электрофоретический анализ в 2%-ном агарозном геле. Концентрацию образцов растительной ДНК выравнивали путем разведения до 15 нг/мкл.

Аmplification маркерных последовательностей *rbcL*, *psbA-trnH* и *ITS2* проводили с использованием специфических праймеров (табл. 1) в конечном 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, 25ММgCl₂, 2mM dNTPs, 3% DMSO, 10μM каждого праймера, 5U/μl Hi-Fi ДНК-полимераза), все компоненты ОДО «Праймтех» [6]. Последовательности праймеров и базовые рекомендации по условиям проведения амплификации представлены в свободном доступе на сайте международного центра по ДНК-баркодированию — *CCDB (Canadian Centre for DNA Barcoding)* [7]. Результаты амплификации проверяли в 2%-ном агарозном геле.

После амплификации проводили ферментативную очистку полученных маркерных после-

Таблица 1

Праймеры для амплификации маркерных последовательностей (ДНК-штрихкодов)

ДНК-штрихкод	Последовательность праймеров	Размер ПЦР продукта, п. н.
<i>psbA-trnH</i>	5' - GTTATGCATGAACGTAATGCTC -3' 5' - CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC -3'	~509 (226–934) [8]
<i>rbcL</i>	5' - ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC -3' 5' - GTAAAATCAAGTCCACCGCG -3'	~654 [8]
<i>ITS2</i>	5' - ATGCGATACTTGGTGTGAAT -3' 5' - GACGCTTCTCCAGACTACAAT -3'	~494 (157–670) [9]

довательностей *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*. Терминирующая реакция выполнена с использованием коммерческого набора *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*, США) согласно рекомендации производителя с последующей очисткой проб этанолом. Секвенирующую реакцию проводили в прямом (при необходимости и в обратном) направлении на генетическом анализаторе *ABI 3500 Applied Biosystems*. Хроматограммы сиквенсов просмотрены в *ChromasPro 13.3* и сохранены в формате *FASTA*. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями ДНК, хранящимися в международных базах данных при помощи программы *NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* для *ITS2* и *psbA-trnH* [10]; для анализа *rbcL* дополнительно использовали программу *BOLD Systems v.4* [11]. Обнаружение в *NCBI* нуклеотидной последовательности известного биологического вида, полностью совпадающей с анализируемой нами, являлось подтверждением видовой принадлежности изучаемого растения.

Результаты и обсуждение

Для идентификации растений ятрышника были использованы три маркера, рекомендуемые для анализа растений семейства *Orchidaceae*. 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 CO₂ в темновой фазе фотосинтеза [12]. Некодирующий участок пластидной ДНК *psbA-trnH* представляет собой межгенный спейсер (*psbA-trnH* от англ. *Intergenic spacer (IGS) regions of psbA-trnH*) и расположен между геном, контролирующим синтез белка *D1* фотосистемы II, и геном гистидиновой тРНК [13]. На рис. 1 представлены электрофореграммы результатов амплификации маркерных последовательностей с ДНК растений ятрышника (3 растения).

При амплификации ДНК растений ятрышника с маркером *ITS2* был получен фрагмент размером ~500 п. н., с *rbcL* ~600 п. н., с *psbA-trnH* получен продукт ~900 п. н.

Продукты амплификации, представляющие собой маркерные последовательности *ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*, были секвенированы в прямом направлении, помимо этого для *ITS2* выполнено секвенирование в обратном направлении. Для трех растений ятрышника получено 4 качественных сиквенса участка *ITS2* (2 прямых/2 обратных), 3 качественных сиквенса (прямых) участка *rbcL* и 2 качественных сиквенса (прямых) участка *psbA-trnH*. В табл. 2 представлены результаты секвенирования ампликонов по одной последовательности для

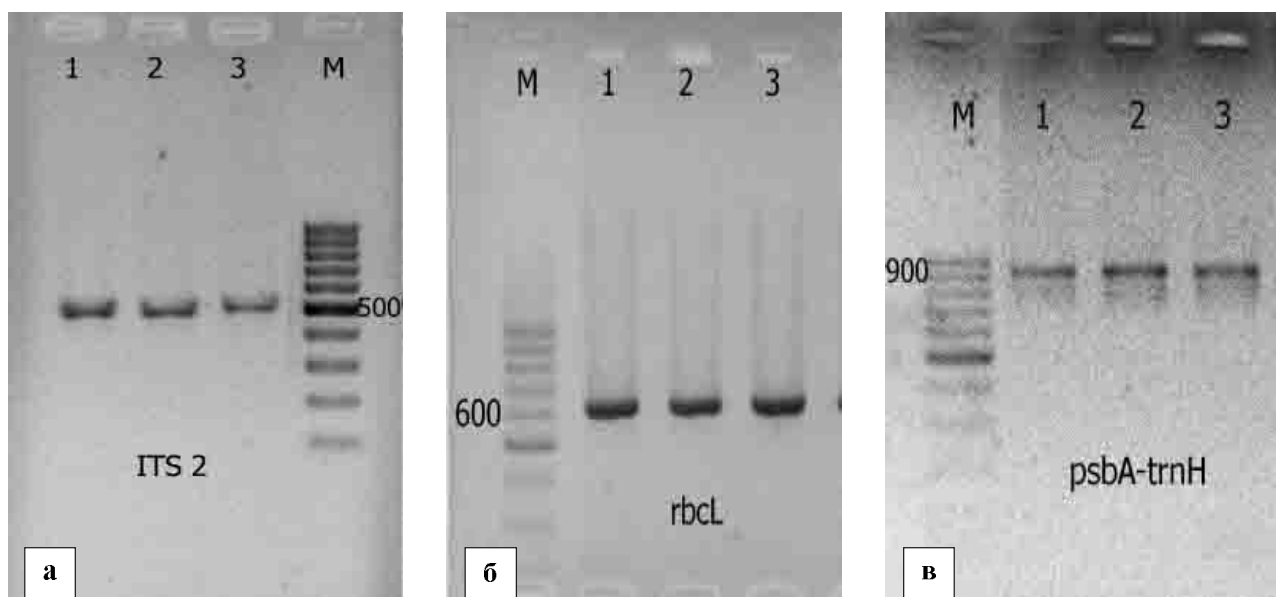


Рис. 1. Результаты амплификации ДНК растений ятрышника с маркерами *ITS2* (а), *rbcL* (б), *psbA-trnH* (в)

каждого ДНК-штрихкода, так как буквенные сиквенсы разных растений ятрышника по одному и тому же маркеру были идентичны.

Маркерная последовательность *rbcL* для ятрышника из Национального парка «Беловежская пуца» практически полностью (сходство 99%) совпала с представленной в *NCBI* последовательностью KF997322.1 для вида *Anacamptis morio* (ятрышник-дремлик) — из проанализированных 553 п. н. только 4 п. н. (выделены в табл. 2 серым) не совпадают с оригинальным сиквенсом из базы данных *BLAST*. Дополнительно мы сравнили полученную последовательность *rbcL* изучаемых растений ятрышника с данными информационной платформы *BOLD Systems v.4 (The Barcode of Life Data System)*, которая позволяет вести поиск маркерных последовательностей *rbcL* и *matK* по секвенированным участкам не менее 500 п. н. [11, 14]. Результаты сравнения

доказывают, что с вероятностью 99,82% изучаемые растения относятся к семейству Орхидные (*Orchidaceae*), род Анакампис (*Anacamptis*), вид *Anacamptis morio* L. (ятрышник-дремлик) (рис. 2).

Маркерная последовательность *ITS2* на 100% совпала с представленной в *NCBI* последовательностью Z940992.1 для вида *Anacamptis morio* (ятрышник-дремлик). Последовательность, представленная в *NCBI*, содержит 240 п. н., тогда как в нашем исследовании получен качественный сиквенс размером 424 п. н. В дальнейшем планируется зарегистрировать эту последовательность в базе *BLAST*.

Использование маркера *psbA-trnH* для идентификации растений ятрышника-дремлика из Национального парка «Беловежская пуца» было для нас недостаточно информативным — а 126 представителей семейства Орхидные

Таблица 2

Результаты секвенирования маркерных последовательностей ДНК (*rbcL*, *ITS2* и *trnH-psbA*) у ятрышника-дремлика из Национального парка «Беловежская пуца»

ДНК-штрихкод	Последовательность
<i>rbcL</i>	CTGGGGTGTTTAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATA CTGATATCTTGGCAGCATTCGAGTAACCTCCTCAACCGGGAGTTCCGCCTGAAGAAGC AGGCGCTGCGGTAGCAGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGAT GGACTTACCAGTCTCGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGCCGTTGTTG GGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACSTTTTTGAAGAAGGTT CTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTTTTGGTTTTCAAAGCTCTGCGAG CTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATCCCCCTGCTTATTCCAAAACSTTTCCAAGGTCCG CCTCATGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTTCGCCCTATTGG GATGTAATTAACCAAATTTGGGATTATCCGCAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTAT GAATGTCTACCGGGTGGACTTGATK (553 п. н.)
<i>ITS2</i>	TGCACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCA AGCATTGTGTCGCTCCATAGGACCTTCGCGGCCACGCGGCTGTCTCATCATGGATGCG GAGAATGGCCTGTCTATGCGCTTATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCT TGGCAATGGCCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCGTTGATTTCATCGTCCGGTTGCT CTGAGAAATTATTGGATATTCCAGCTAACCCAATACAGTTGTCATCGCAAGACAATTG ACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCG GAGGAGAAGAACTTACGAGGATCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGC CCAGCTTGGGAATCGGGCTGCTT (424 п. н.)
<i>psbA-trnH</i>	GAAGATATAAATCCCCAATATCTTGTCTAAGAACAAGATATTGGGGGATTGTTGAGC TACCSTTTTGCTTCTTTATCCGAATCCGAATTTTCGTTTTTTATCATAAAAGAAAGTTC TCCCCTGCCAATGAATGATAAGTGTCTAGGTGAAGTATAGTATAAGATAAGTAAAGAAA GTCTAAGTCTTAGTATACTAGAAAAAGAAAAGAAAATACTATACTACTCTTACTCT AAGATAAAGACTCTTAAGTCTAATAAGATAAGACTTTTTCACATGAATACTTAGCAGAA CGACTAACGACGAGATTTATTATCGTTTCTCGCATGTCTCACGAAAGTGAGAGTAGGT GCGAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTTTTATATAAATAGGTAATGTT CSTTTCCATATGAATAGCGATTGTATGGGCAATCMTTGTGGGTATAATGGTAGATGCC CGARACCCAASTMCCTATTATTTCCYTTCCCTCCTCCCTCCTGGTTGAGTTTTTTCATT TTTTCCCGGATAAAATGATTA (690 п. н.)

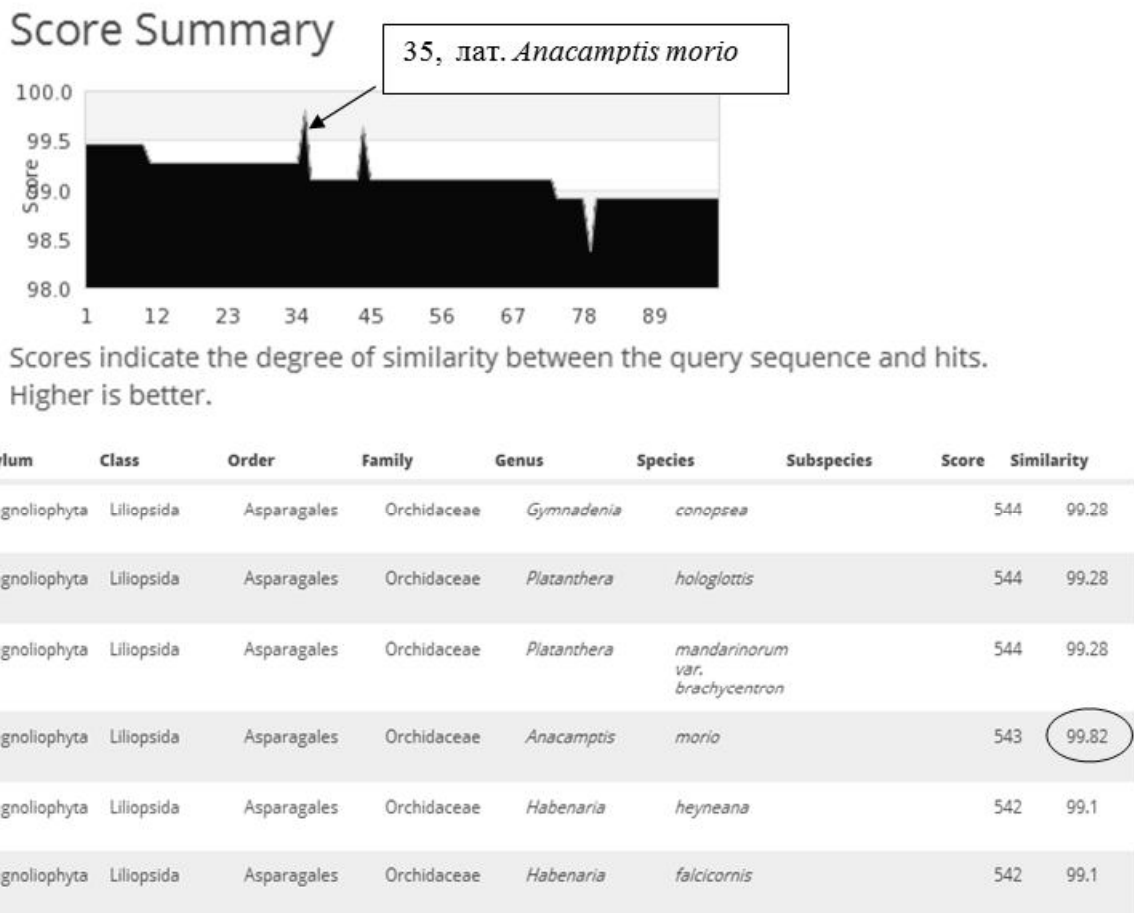


Рис. 2. Результат поиска в *BOLD Systems v.4* по маркерной последовательности *rbcL* для ДНК растений ятрышника из Национального парка «Беловежская пушча»

(*Orchidaceae*) из базы данных *NCBI* буквенный сиквенс исследуемого участка на 95–97% был идентичен полученному нами, что сузило идентификацию до определения семейства. Этот факт не противоречит исследованиям других авторов, которыми отмечена недостаточная вариабельность маркерной последовательности *psbA-trnH* для этого таксона [3–5, 12].

Заключение

Таким образом, на примере образцов ДНК ятрышника-дремлика (*Anacamptis morio* L.) нами продемонстрирована возможность успешного использования комбинации трех маркеров (*ITS2*, *rbcL* и *psbA-trnH*) для идентификации растений семейства *Orchidaceae*. Наиболее информативными в качестве ДНК-штрихкода оказались фрагмент ядер ДНК *ITS2* и фрагмент хплДНК *rbcL*. Использование *rbcL* в качестве самостоятельного маркера позволило достоверно определить вид изучаемого расте-

ния — сходство с существующими базами данных составило 99,82%, а в случае самостоятельного применения маркера *ITS2* — 100%. В то же время, участок хплДНК *psbA-trnH* показал недостаточную разрешающую способность для самостоятельного использования, однако для него в процессе работы показана высокая воспроизводимость результатов амплификации. Это сокращает время на обработку условий для получения целевых последовательностей, и, при совместном применении с другими маркерами, *psbA-trnH* будет полезен для проведения первичного скрининга растений.

Список использованных источников

1. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / редкол.: И.М. Качановский [и др.]. — 4-е изд. — Минск: Беларус. энцыкл. ім. П. Броўкі, 2015. — 448 с.

2. Электронная версия Красной книги Республики Беларусь [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://redbook.minpriroda.gov.by>. — Дата доступа: 17.05.2017.
3. DNA barcoding identification of endangered medicinal plants of *Orchidaceae* / Tang H. [et al.] // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. — 2017. — Vol. 42, № 11. — P. 2058–2067. — doi:10.19540/j.cnki.cjcmm.2017.0090.
4. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium (Orchidaceae)* from Mainland Asia / S. Xu [et al.] // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10, № 1: e0115168. — doi:10.1371/journal.pone.0115168.
5. DNA barcoding of *Orchidaceae* in Korea / Kim H.M. [et al.] // *Mol. Ecol. Resour.* — 2014. — Vol. 14 № 3. — P. 499–507. — doi:10.1111/1755-0998.12207.
6. ОДО «Праймтех» — реагенты и материалы для молекулярной биологии [Интернет-сайт компании Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.primetech.by>. — Дата доступа: 07.06.2017.
7. CCDB [Electronic resource] / Canadian Centre for DNA Barcoding. — Mode of access: http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_PrimerSets-Plants.pdf. — Date of access: 12.04.2017.
8. Hollingsworth, P.M. Choosing and using a plant DNA barcode / P.M. Hollingsworth, S.W. Graham, D.P. Little // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, № 5: e19254. — doi: 10.1371/journal.pone.0019254
9. Use of *ITS2* Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals / H. Yao [et al.] // *PLoS One*. — 2010. — Vol. 5, № 10: e13102. — doi: 10.1371/journal.pone.0013102
10. NCBI BLAST [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool. — Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. — Date of access: 24.06.2017.
11. BOLD Systems [Electronic resource] / The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). — Mode of access: http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch. — Date of access: 24.06.2017.
12. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т. В. Матвеева [и др.] // *Экологическая генетика*. — 2011. — Т. IX, № 1. — С. 32–43.
13. Дегтярева, Г. В. Анализ соответствия молекулярных и морфологических данных при анализе филогении на примере семейств бобовые (*Leguminosae*) и зонтичные (*Umbelliferae*): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03 / Г. В. Дегтярева. — 2007. — 212 с.
14. Ratnasingham, S. Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>) / S. Ratnasingham, P.D.N. Hebert // *Mol. Ecol. Notes*. — 2007. — Vol. 7. — P. 355–364. — doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

N.V. Savina¹, S.V. Kubrak¹, E.I. Kuzminova¹, L.V. Milko¹, A.P. Kolbas², N.M. Matusevich²,
E.P. Mikhalenko¹, E.N. Makeyeva¹, A.V. Kilchevsky¹

CHOOSING DNA-BARCODING MARKERS FOR WILD SPECIES OF THE *ORCHIDACEAE* FAMILY BY THE EXAMPLE OF *ANACAMPTIS MORIO* L.

¹Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

²Brest State University named after A.S. Pushkin
Brest BY-224016, the Republic of Belarus

Representatives of Belarus flora belonging to the *Orchidaceae* family are known for their ornamental and pharmacological properties. DNA-identification is the method to monitor the state of their natural populations. By the *Anacamptis morio* L. example, we demonstrated that there is the possibility of effective use of three markers' (*ITS2*, *rbcL* and *psbA-trnH*) combination for DNA-barcoding of *Orchidaceae*. The most effective were *ITS2* and *rbcL*, allowing to determine the plant species under study with an accuracy of 99.82–100%. Use of *ITS2*, *rbcL* and *psbA-trnH* marker sequences will enable to perform mass screening of plants growing in protected areas.

Key words: DNA-barcoding, DNA-barcode, Orchids, Green-winged orchid.

Дата поступления статьи: 26 декабря 2017 г.