

**БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ,
ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕГО ВИДЫ И ПОПУЛЯЦИИ КАРАНТИННЫХ СОРНЫХ
РАСТЕНИЙ ПОВИЛИК *CUSCUTA CAMPESTRIS* YUNCK. И *CUSCUTA
MONOGYNA* VANL**

**Динасилов А.С.¹, Гриценко Д.А.², Хамдиева О.Х.³, Жунисбай Р.Т.⁴,
Жанарбекова А.Б.⁵**

¹Динасилов Алмат Саламатович - кандидат сельскохозяйственных наук;

²Гриценко Диляра Александровна - PhD-докторант;

³Хамдиева Озада Хакимовна - PhD-докторант;

⁴Жунисбай Рысалды Толендыкызы - старший научный сотрудник;

⁵Жанарбекова Алма Бекболатовна - кандидат сельскохозяйственных наук,

Испытательный центр фитосанитарного лабораторного анализа,

Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений,

г. Алматы, Республика Казахстан

Аннотация: в статье приводится биоинформационный анализ генетического разнообразия повилик *Cuscuta campestris* и *Cuscuta monogyna*, изучалось использование *rbcL*, *ITS*, *RPS2*, *trnL-trnF* маркеров для баркодирования. Результаты филогенетического анализа показали низкую разрешающую способность маркеров *rbcL* и *ITS* для *Cuscuta campestris*. Наибольшей разрешающей способностью обладает маркер *RPS2* для *Cuscuta campestris*. Для *Cuscuta monogyna* наибольшей разрешающей способностью обладает маркер *trnL-trnF*. Кроме того, был выполнен филогенетический анализ при сочетании трех маркеров *rbcL*, *ITS*, *RPS2* для *Cuscuta campestris* и при сочетании двух маркеров *rbcL* и *trnL-trnF* для *Cuscuta monogyna*.

Ключевые слова: биоинформационный анализ, повилики, маркеры *rbcL*, *ITS*, *RPS2*, *trnL-trnF*.

Для изучения генетического разнообразия *Cuscuta campestris*, *Cuscuta monogyna* использовалась базы данных NCBI, BOLD, которые содержат нуклеотидные последовательности разных изолятов данных видов со всего мира и послужили основой для сравнения секвенированных последовательностей из Южно-Казахстанской области (ЮКО) и Алматинской области (АО). Маркерными участками послужили *rbcL*, *ITS*, *RPS2*, *trnL-trnF* последовательности, которые являются универсальными маркерами при идентификации и изучении генетического разнообразия растений. В настоящий момент известно множество работ по изучению генетического разнообразия растений при использовании *rbcL*, *ITS*, *RPS2*, *trnL-trnF* маркеров [1-5]. Изучение генетического разнообразия и гомологии внутри популяции или между различными популяциями, в том числе определение общего предка, опосредуется через филогенетический анализ, который базируется на определении наиболее актуального эволюционного сценария. Филогенетический анализ позволяет определить генетическое расстояние между разными видами с целью определения уровня дивергенции от общего предка. Первым этапом в построении филогенетических древ является выравнивание последовательностей маркеров с целью выявления гомологичных позиций анализируемых последовательностей. После выравнивания *rbcL*, *ITS*, *RPS2* последовательностей для *Cuscuta campestris* были построены филогенетические деревья с помощью метода присоединения соседей (Neighbor-Joining Method). В настоящий момент, данный метод является наиболее достоверным в филогенетическом анализе. При построении древ с помощью данного метода в кластер объединяются последовательности, дающие наименьшую сумму всех ветвей дерева, при этом учитываются длины остальных ветвей дерева [6].

Результаты исследования: При изучении филогенетического анализа образцов ЮКО и АО относительно известных изолятов базы данных NCBI можно отметить, что *rbcL* обладает низкой разрешающей способностью относительно видов повилик. Образцы из Алматинской области по генетическому расстоянию располагаются ближе к *Cuscuta chinensis* виду, нежели к *Cuscuta campestris*. Образцы с 6-15 Алматинской области и с 16-20 ЮКО расположились ближе к виду *Cuscuta werdermannii*, изолят 995.

По результатам филогенетического анализа можно предположить, что дивергенция данных видов произошла «недавно» и маркерные участки обладают низкой вариабельностью. Данный маркер нельзя рассматривать как кандидата для разработки специфичных праймеров с целью идентификации вида с помощью ПЦР – анализа, так как не отмечено закономерных вариабельных положений нуклеотидов в одних и тех же местах для разных видов.

Филогенетический анализ по маркеру *RPS2* для *Cuscuta campestris* является более информативным и обладает большей разрешающей генетической способностью. При поиске вариабельных участков были найдены вариабельные нуклеотиды в одних и тех же положениях для различных видов, что дает возможность разработать специфичные праймера для идентификации вида.

Маркерный регион RPS2 может быть использован в разработке специфических праймеров для идентификации *Cuscuta campestris* классическим ПЦР, ПЦР в режиме реального времени либо методами, основанными на гибридизации со специфическими зондами. Для сравнения ЮКО и АО образцов с базой данных NCBI, были выставлены следующие параметры: покрытие последовательности не менее 90%, идентичность - не менее 90% и коэффициент отклонения (E value)- 0.

Филогенетический анализ по маркеру ITS для *Cuscuta campestris* показал, что образцы ЮКО и АО обладают наименьшим генетическим расстоянием относительно изолятов базы данных NCBI, относящихся к видам *Cuscuta campestris* и *Cuscuta pentagona*.

В виду высокой гомологии с изолятами другого вида, данный маркер нельзя рассматривать как кандидата для разработки специфичных праймеров для идентификации *Cuscuta campestris*. Результаты филогенетического анализа при сочетании трех маркеров rbcL, RPS2 и ITS для образцов ЮКО и АО показали наличие двух кластеров, первый кластер включает образцы с 1-8 АО и с 16-17 ЮКО, второй кластер содержит образцы с 9-15 АО и с 18-20 ЮКО. Анализ не показал генетического разделения между двумя географически отдаленными популяциями. Но генетическая вариабельность наблюдается внутри каждого кластера при сравнении образцов, собранных из разных регионов,

Для идентификации вида *Cuscuta campestris* методом ПЦР были разработаны специфичные праймера для маркера RPS2.

Для изучения генетического разнообразия 10 образцов *Cuscuta monogyna* из АО были использованы rbcL и trnL-trnF маркеры. При построении филогенетического древа для образцов АО и изолятов базы данных NCBI было показано образование кластера с изолятом вида *Cuscuta monogyna* и соответствие наименьшее расстояние относительно этого изолята. Генетическое расстояние относительно других видов было больше и при поиске вариабельных положений были выявлены положения с закономерной вариацией. В виду чего были указаны участки, которые могут служить кандидатами для разработки видоспецифичных праймеров для *Cuscuta monogyna*.

Результаты филогенетического анализа для маркера trnL-trnF для 10 образцов АО относительно изолятов базы данных показали, что наибольшее родство образцов АО с изолятами вида *Cuscuta monogyna*, помимо вида *Cuscuta monogyna*, можно отметить при формировании кластера из изолятов вида *Cuscuta japonica*.

Анализ вариабельности маркеров trnL-trnF и rbcL для вида *Cuscuta monogyna* показал наличие вариабельных положений нуклеотидов, при использовании которых возможно разработать систему идентификации видов, основанную на ПЦР с видоспецифическим праймерами.

Заключение: Филогенетический анализ показал непригодность маркеров ITS и rbcL для вида *Cuscuta campestris* с целью изучения генетического разнообразия, так как обладают низкой разрешающей способностью для межвидового разделения по сравнению с маркерами RPS2. Объединение трех маркеров позволило выявить два кластера при построении древа на основе метода присоединения соседей для образцов из ЮКО и АО, но не было выявлено четкого генетического разделения между образцами из географически далеких популяций. Маркер RPS2 может быть использован с целью разработки видоспецифичных праймеров для идентификации вида *Cuscuta campestris*. При анализе маркеров для вида *Cuscuta monogyna* была выявлена пригодность двух маркеров rbcL и trnL-trnF для межвидового генетического разделения. Кроме того, при объединении двух маркеров было выявлено наличие двух кластеров при анализе образцов из АО. Маркеры rbcL и trnL-trnF могут быть рассмотрены как кандидаты для разработки специфичных праймеров для идентификации вида *Cuscuta monogyna*.

Список литературы

1. Braukmann T., Kuzmina M, Stefanović S. Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss. J Exp Bot., 2013 Feb. 64 (4): 977–989.
2. Garcia M.A, Costea M, Kuzmina M, Stefanović S. Phylogeny, character evolution, and biogeography of *Cuscuta* (dodders; Convolvulaceae) inferred from coding plastid and nuclear sequences. Am J Bot., 2014. Apr. 101 (4):670-90.
3. Dong W., Liu J., Yu J., Wang L., Zhou Sh. Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. PLoS One, 2012. 7 (4): e35071.
4. Hollingsworth P., Graham S, Little D. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. PLoS One, 2011. 6 (5): e19254.
5. Rogalski M., Vieira L., Fraga H., Guerra M. Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology. Front Plant Sci., 2015. 6: 586.
6. Лукашев В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. 256 с.