УДК 613.26:575.111

Л.С. Дышлюк, Ю.В. Голубцова, К.А. Шевякова, Л.А. Остроумов

АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ФРАГМЕТОНТОВ ГЕНОМА ЯГОД С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА

Представлен анализ имеющихся в электронных базах данных нуклеотидных последовательностей генома ягод. По результатам выбраны небольшие последовательности, присутствующие во всех геномах ягодного сырья. Установлено филогенетическое родство исследуемых объектов.

Малина, крыжовник, шиповник, нуклеотидная последовательность, геном, филогенетический анализ.

Введение

В последнее время как в нашей стране, так и за рубежом расширяются работы по использованию природных ягодных растений, имеющих пищевое значение [4]. Известно, что мякоть ягод содержит многочисленные биологические активные соединения, оказывающие благоприятное действие на организм человека. В этой связи особое внимание уделяется всестороннему изучению и последующему применению их в качестве ингредиентов при производстве продуктов питания [5].

С увеличением объема частного производства и свободной торговли продовольственными товарами, в том числе ягодным сырьем, готовых продуктов и полуфабрикатов на его основе, возрастает возможность расширения их фальсификации по структуре и видовой принадлежности. На сегодняшний день фальсификация продукции существует в любой отрасли промышленности, прежде всего среди компаний с широкой сетью филиалов [10]. Зачастую пищевые предприятия могут фальсифицировать содержание ягодной продукции различными красителями и ароматизаторами. Наиболее сложным в экспертизе является определение фальсификации переработанных ягод. По экономическим соображениям чаще всего фальсифицируют малоценное ягодное сырье, реализуя его как продукцию высокого качества [9]. Особую актуальность в настоящее время приобретает разработка современных высокоэффективных методов выявления фальсификаций продукции.

На сегодняшний день с увеличением темпов роста научно-технического прогресса в современном обществе постоянное совершенствование методов молекулярной биологии и накоплением данных по составу генома ягодных растений привели к появлению новых экспресс-методов идентификации продовольственного сырья растительного происхождения [2, 7]. Поиск и разработка методов идентификации активизировались с появлением в продаже новых товаров, а также в связи с ростом выпуска и реализации фальсифицированной, в том числе контрафактной, продукции.

Для проведения идентификации и обнаружения фальсификации продовольственных товаров используют комплекс методов, применение которых в конечном итоге должно обеспечивать надежность и достоверность результатов идентификации. Наиболее эффективные способы исследования происхождения и выявления видового сродства основаны на молекулярно-биологических методах, позволяющих проводить сравнительные анализ нуклеотидных последовательностей генов. Молекулярно-генетический анализ стал сегодня почти необходимой частью любого филогенетического исследования [6, 8]. Основным инструментом филогенетического исследования является сравнение первичных нуклеотидных или последовательностей и последующая визуализация результатов сравнения [1]. По сравнению с традиционными способами родовой и видовой детекции (физико-химическими), данный вид анализа отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации и высокой воспроизводимостью.

Таким образом, все изложенное свидетельствует о необходимости и возможности решения проблемы фальсификации и идентификации продукции на растительной основе.

Целью настоящего исследования являлось изучение филогенетики различных ягод путем анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генома ягод.

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследования были выбраны нуклеотидные последовательности малины, крыжовника, шиповника. Первичный сравнительный анализ геномов исследуемых объектов проводили по базам данных национального центра биотехнологической информации NCBI США, имеющего мощные системы обработки и представления данных.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генома ягод.

Таблица 1

Анализ нуклеотидных последовательностей генома ягод

Сырье	Количество выбранных нуклеотидных последовательностей, присутствующих во всех геномах	Степень сродства по скору, (%)
Малина *(Rubus idaeus)*	14	98
Крыжовник *(Ribes)*	19	95
Шиповник *Rosa majalis*	45	95

При анализе геномов *Rubus idaeus* выбраны небольшие последовательности, присутствующие во всех геномах. В ходе анализа было выявлено, что общее количество нуклеотидных последовательностей в системе GeneBank составило для малины – 768 последовательностей, из них наиболее гомологичных 14 последовательностей. В результате анализа установлено, что нуклеотидные последовательности всех изучаемых объектов обладают высоким сродством и степенью гомологии не менее 98 %.

Крыжовник обыкновенный является одним из основных ягодных кустарников, благодаря тому, что его ягоды содержат много сахаров, кислот и различных витаминов. Ранние классификации различали два рода *Ribes* и *Grossularia* (Крыжовник). В более широко распространённых монографиях признаётся только один род Ribes. Для проверки и анализа были выбраны следующие сорта крыжовника, нуклеотидные последовательности которых есть в базе данных NCBI: *Ribes grossularioides*; *Ribes uva-crispa*; *Ribes burejense*; *Ribes aciculare*; *Ribes oxyacanthoides subsp. Oxycanthoides*; *Ribes cynosbati*; *Ribes missouriense*; *Ribes hirtellum*; *Ribes lobbii*; *Ribes velutinum*; *Ribes thacherianu*; *Ribes inerme*; *Ribes rotundifolium*; *Ribes echinellum*; *Ribes lacustre*. Таким образом, для крыжовника представлено всего 19 последовательностей, которые имеют наибольшее сродство (95 %) по скору.

В связи с широко распространённой природной гибридизацией, видовой изменчивостью и наличием множества культурных форм систематика рода Шиповник очень сложна. Проведен анализ геномов Rosa majalis, выбраны небольшие последовательности, присутствующие во всех геномах. Анализируя данные, выявлено 45 последовательностей для шиповника, которые имеют наибольшее сродство (95 %) по скору.

Для выяснения филогенетических взаимоотношений между различными видами организмов и уточнения времени их дивергенции использовали методы определения эволюционных дистанций, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей гомологичных генов или аминокислотных последовательностей соответствующих белков. В определенной мере по степени сходства нуклеотидных последовательностей гомологичных генов организмов различных видов можно судить о степени филогенетического родства представителей этих видов. Визуализацию филогенетических отношений осуществляли с помощью дендрограммы – чертежа, отражающего родственные связи между генетическими макромолекулами. По структуре дендрограмма напоминает разветвленное дерево, включающее следующие составляющие:

– ветвь (определяет взаимоотношение между таксонами);

– длину ветви (представляет число изменений, которые произошли между таксонами);

– корень (общий предок всех рассматриваемых организмов);

– масштаб расстояния (масштаб, который отражает число различий между организмами или последовательностями генома);

– кластер (группа двух или больше таксонов или последовательностей ДНК, которая включает как своего общего предка, так и всех его потомков [3]).

Выбранные нами нуклеотидные последовательности генома малины использованы для сравнительного филогенетического анализа, результаты которого представлены на рис. 1. Равнения нуклеотидных последовательностей провели в программе MS Word (www.phylogeny.fr).

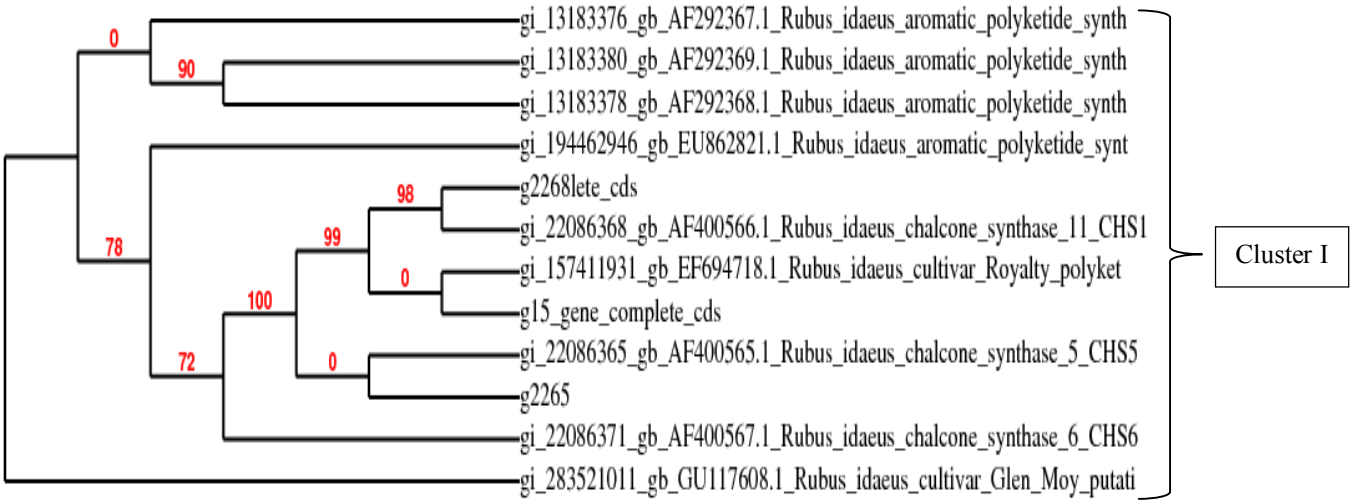

Рис. 1. *Начало*. Филогенетическая дендограмма генов малины

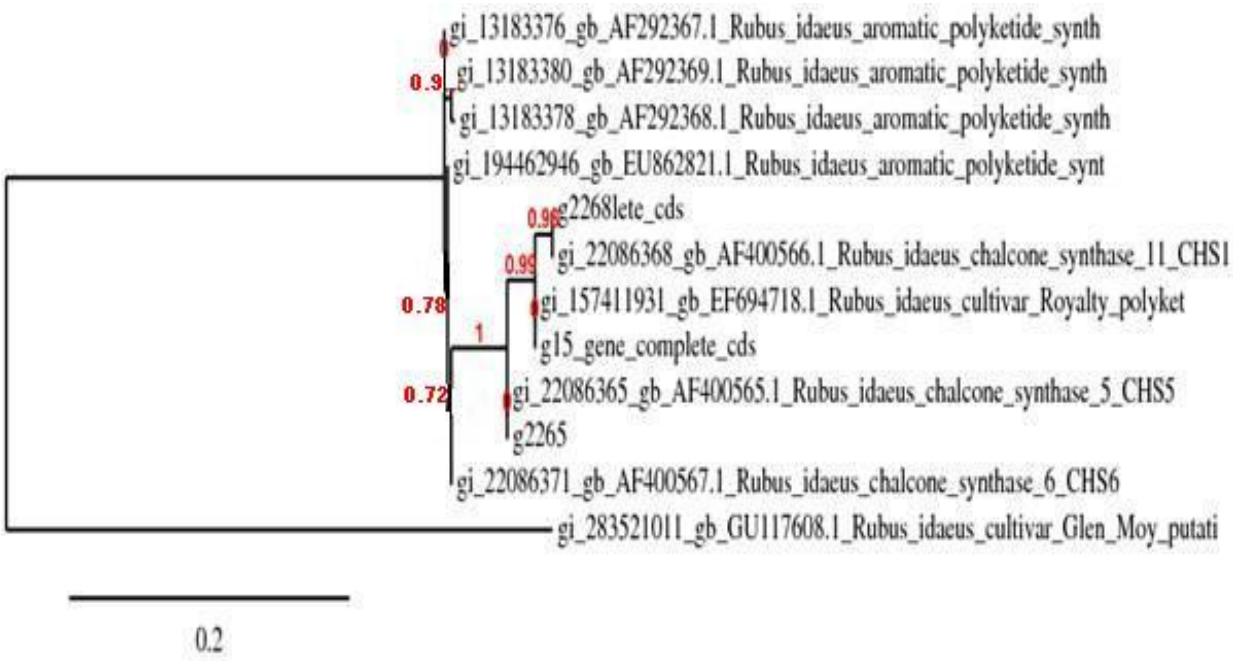

Рис. 1. *Окончание*. Филогенетическая дендограмма генов малины

Как видно из рис. 1, существует один основной кластер, который обозначим Cluster I, и отдельна нуклеотидная последовательность, которая является первоначальной. Каждый кластер делиться, в свою очередь, на меньшие кластеры. Всего Cluster I делится на 18 кластеров. Помимо этого филогенетическое дерево имеет 10 узлов. Представленный анализ отражает родственные связи родов малины.

Для построения филогенетической дендрограммы генов крыжовника провели равнение нуклеотидных последовательностей в программе MS Word. Результаты филогенетического анализа отражены на рис 2.

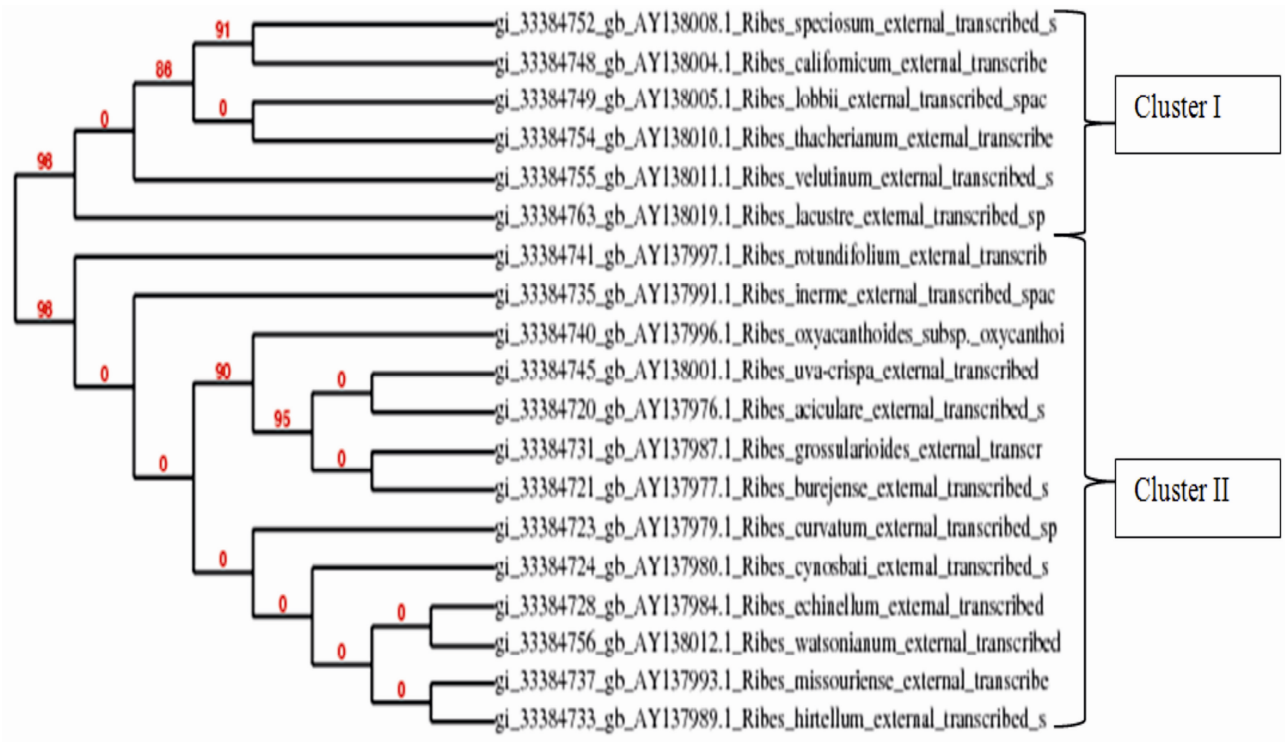

Рис. 2. *Начало*. Филогенетическая дендограмма генов крыжовника

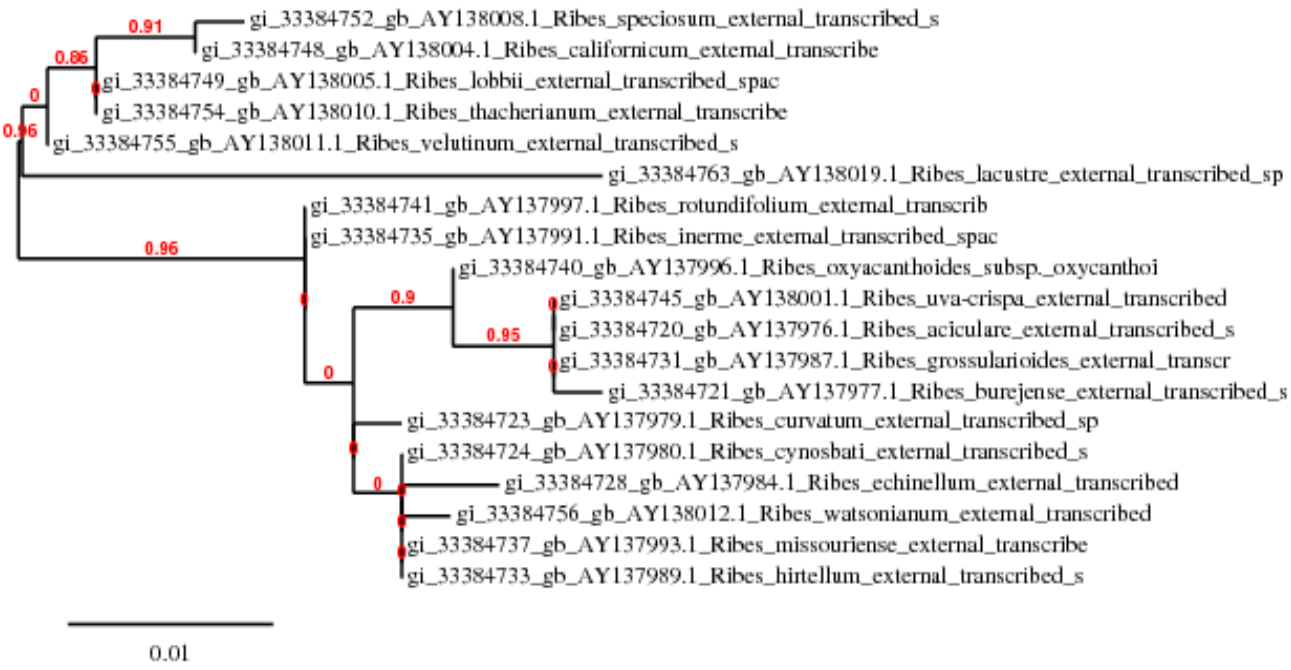

Рис. 2. *Окончание*. Филогенетическая дендограмма генов крыжовника

Анализ полученных результатов показал, что существуют два основных кластера, которые обозначим Cluster I и Cluster II. Каждый кластер делится, в свою очередь, на меньшие кластеры. Всего Cluster I делится на 10 кластеров, тогда как Cluster II делится на 24 кластера меньших размеров. Помимо этого филогенетическое дерево имеет 17 узлов. Представленный анализ отражает родственные связи выше приведенных родов крыжовника.

Дендрограммы филогенетических взаимоотношений родов шиповника построены на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей их генов. Предварительно провели равнение нуклеотидных последовательностей в программе MS Word, филогенетический анализ (www.phylogeny.fr), результаты которого отражены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, существует один основной кластер, который обозначим Cluster I, и отдельна нуклеотидная последовательность, которая является первоначальной, каждый кластер делится, в свою очередь, на меньшие кластеры. Всего Cluster I делится на 81 кластер. Помимо этого филогенетическое дерево имеет 42 узла. Представленная дендограмма генов шиповника является свидетельством их генетического родства.

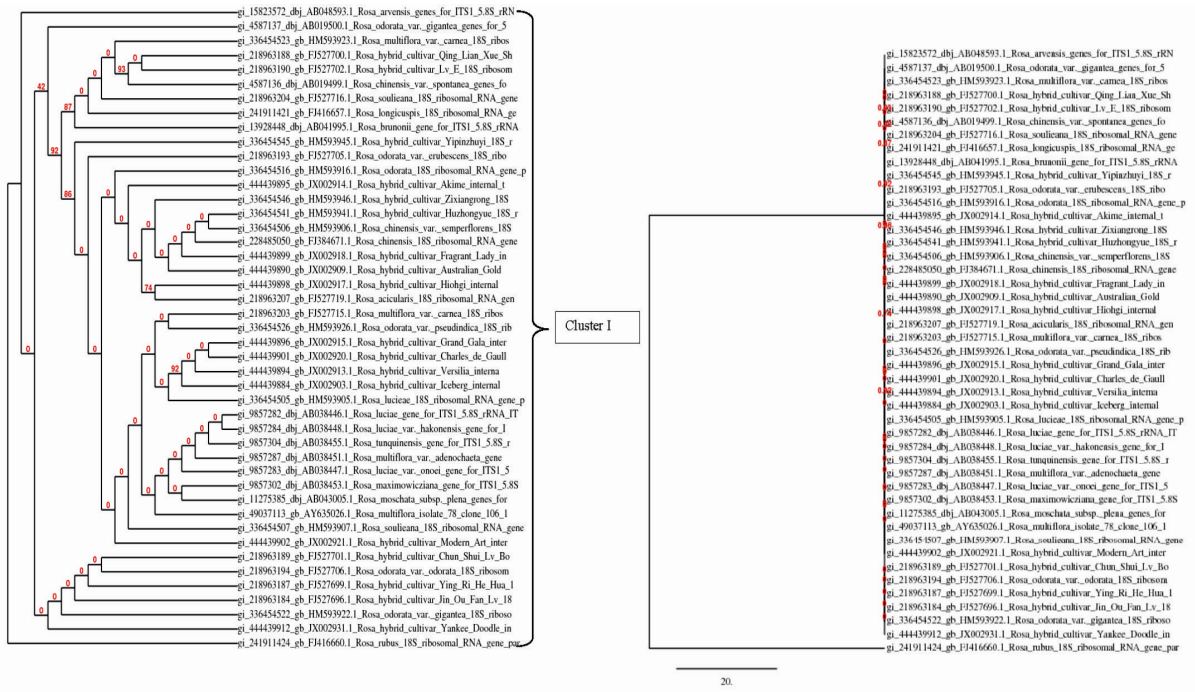

Рис. 3. Филогенетическая дендограмма генов шиповника

Выводы

Для установления филогенетических взаимоотношений видов произвели сравнение последовательностей генов растительного сырья, пищевого назначения: малины, крыжовника, шиповника. В результате компьютерного анализа нуклеотидного состава исследуемых генов выявили сходство нуклеотидных последовательностей областей геномов исследуемых объектов. Полученные данные имеют огромное значение в процессе разработки новой методики идентификации и количественной оценки ягодного сырья и готовых продуктов на его основе.

Список литературы

1. Батинг, Г. Анализ генома. Методы / Г. Батинг, Ч. Контор, Ф. Коллинз. – М.: Мир, 1990. – С. 176–190.

2. Бутвиловский, А.В. Выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский // Медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 45–54.

3. Дубанов, А.В. Компьютерный поиск новых мишеней для действия противомикробных средств на основе сравнительного анализа геномов / А.В. Дубанов, А.С. Иванов, А.И. Арчаков // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 3. – С. 54–60.

4. Евтухова, О.М. Индивидуальная изменчивость морфологических и химических признаков плодов калины обыкновенной в южной части средней Сибири / О.М. Евтухова, Н.Ю. Теплюк, М.А. Шемберг// Химия растительного сырья. – 2002. – № 2. – С. 139–142.

5. Левкис, З. Инновационные подходы в переработке плодов и ягод / З. Левкис, Л. Павловская // Наука и инновации. – 2012. – № 6. – С. 20–21.

6. Лукашов, В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В.В. Лукашов. – М.: Бином, 2009. – 256 с.

7. Методы ДНК-технологии для идентификации растительного сырья в молочных продуктах / А.Ю. Просеков, О.В. Мудрикова, А.В. Булавина, А.Н. Архипов // Молочная промышленность. – 2011. – № 12. – С. 62–63.

8. Просеков, А.Ю. Использование тест-систем в молочной промышленности / А.Ю. Просеков, Е.В. Короткая, К.В. Беспоместных // Молочная промышленность. – 2009. – № 11. – С. 70–72.

9. Тимофеева, В.А. Товароведение продовольственных товаров: учебник / В.А. Тимофеева. – Изд. 6-е, перераб. и доп.– Изд-во: Феникс, 2006.– 363 с.

10. Чепурна, И.П. Идентификация и фальсификация продовольственных товаров: учебник / И.П. Чепурна. – М.: Дашков и К^0, 2007. – 448 с.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел/факс: (3842) 73-40-40,
e-mail: office@kemtipp.ru

L.S. Dyshlyuk, Yu.V. Golubtsova, K.A. Shevyakova, L.A. Ostroumov

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF BERRIES GENOME FRAGMENTS AIMED TO IDENTIFY PHYLOGENETIC AFFINITY

The analysis of the available electronic databases of the nucleotide sequences of the berries genome are presented. Small sequences appearing in all the berry genomes are selected according to the analysis results. Phylogenetic affinity of the tested specimens is determined.

Raspberry, gooseberry, dogrose, nucleotide sequences, genome, phylogenetic analysis.

FSBEI HVE «Kemerovo Institute of Food Science and Technology»,
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056 Russia.
Phone/fax: +7(3842) 73-40-40,
e-mail: office@kemtipp.ru

Дата поступления: 12.02.2014