

RAPD И ISSR-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФОРМ КУРИЛЬСКОГО ЧАЯ (*POTENTILLA FRUTICOSA* L.) КОЛЛЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

А.Б. ВЛАСОВА, *кандидат биологических наук*; В.С. ПАНКРАТОВ;

Е.В. СПИРИДОВИЧ, *кандидат биологических наук*;

В.Н. РЕШЕТНИКОВ, *доктор биологических наук*

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение

Сохранение биологического и, в частности, генетического разнообразия является одной из важных задач современной биологической науки. Оценка генетических различий между отдельными особями в популяции необходима для выявления наиболее уникальных форм и является актуальной для сохранения и поддержания ботанических коллекций ценных видов и таксонов, а также очень важна при проведении направленной селекции как при выборе исходного материала, так и при оценке результатов селекционного процесса.

Курильский чай (*Potentilla fruticosa* L., Syn: *Dasiphora floribunda* Pursh) относится к семейству Rosaceae Juss. (розоцветные), подсемейству Rosoideae Arnott, является широко распространенным в Европе и Северной Америке декоративным растением [6, 7]. Выбор объекта в первую очередь обусловлен его практической ценностью. Курильский чай широко используется как декоративное растение в ландшафтном дизайне [6]. Этим объясняется масштабная селекционная работа, проводимая с этой культурой, которая привела к существующему разнообразию сортов (более 130) [5]. В свою очередь в ЦБС НАН Беларуси с 1980 г. ведется селекция курильского чая с использованием методов радиационного мутагенеза, результатом которой является коллекция форм, ряд из которых получили статус сортов. Кроме того, курильский чай обладает ценными лекарственными свойствами: гемостатическими, противовоспалительными, бактерицидными [1, 6]. Растения можно использовать на корм скоту и для предотвращения эрозии почв.

За последние 2 десятилетия продемонстрирована успешность применения ДНК-маркеров с целью выявления генетического разнообразия растительных ресурсов, решения таксономических вопросов, сортовой принадлежности и др. В ряде работ экспериментально доказано оптимальное использование RAPD и ISSR-маркеров для генотипирования разных культур [2, 14, 16, 17]. Молекулярно-генетические маркеры существенно облегчают выбор наиболее значимых и специфичных морфологических признаков, которые затем можно будет использовать для решения задач систематики и оценки генетических различий.

Род *Potentilla* L. является довольно сложным в систематическом отношении, что связано с его широким распространением, нередкими случаями апомиксиса, полиплоидизации и отдаленной гибридизации [8, 11, 12]. Род разделен на несколько секций, внутри которых таксономические отношения запутаны. Использование морфологических признаков для систематики этого рода затруднено из-за их большой изменчивости, конвергенции и проблемы выбора морфологических признаков для сравнения [12]. Поэтому вопросу применения молекулярно-генетических маркеров при изучении систематики, филогении и исторической биогеографии рода *Potentilla* посвящен ряд исследований в различных европейских странах [8, 11, 12], которые помогли нам при выборе методов исследования и маркирующих праймеров, т.к. до настоящего времени нет данных по генетической паспортизации культуры *P. fruticosa* (*Dasiphora*).

Таким образом, целью настоящей работы являлось, во-первых, проведение генетической паспортизации коллекции ценных декоративных и лекарственных форм курильского чая ЦБС НАН Б, во-вторых – генетическое сравнение двух форм (Фонарик и Румянец) с рядом признанных сортов данной культуры. В задачи исследования входило: 1)

выбор типа молекулярно-генетических маркеров для паспортизации; 2) оптимизация методик выделения тотальной ДНК, условий ПЦР, и разделения ампликонов; 3) проведение молекулярно-генетической паспортизации коллекционных форм и сортов; 4) обработка полученных результатов и составление в виде генетических паспортов форм курильского чая и выявление степени генетического сходства между данными формами.

Объекты и методы исследования

Коллекция курильского чая ЦБС НАН Беларусь представлена 14 формами местной селекции, две из которых (Фонарик и Румянец) получили в 2007 г. статус сортов, а также рядом коммерческих сортов, полученных из Вильнюсского Ботанического сада. Все 14 местных сортообразцов были получены от сорта Tangerine путем радиационного мутагенеза с последующей селекцией. Для проведения RAPD и ISSR паспортизации были взяты все 16 сортообразцов, сорт Tangerine, являющийся их предком, а также 3 коммерческих сорта (Gold Star, Red Ace и Gold Terpich). Выделение тотальной ДНК проводили СТАВ-методом по Hombergen и Bachmann [13] с модификациями Gabrielsen et al. [10] из молодых листьев. Оценку концентрации и чистоты препарата ДНК (соотношение A_{260/280}) проводили на спектрофотометре Agilent 8453. RAPD-ПЦР (США) проводили по Gabrielsen et al. [10], с модификациями. Информация об использованных праймерах приведена в табл. 1. RAPD-ПЦР-продукты анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле или с использованием прибора Bioanalyzer Agilent 2100 (США). ISSR-ПЦР-продукты разделяли в неденатурирующем 8% полиакриламидном геле с окрашиванием по методу Beidler et al. [3], усовершенствованному Creste et al. [4]. Цифровые изображения гелей обрабатывали в программе Phoretics™ 1D. Данные обрабатывали с помощью пакетов Phylip 3-63 и Treecon.

Таблица 1
RAPD и ISSR праймеры, использованные для генетической паспортизации форм и сортов *P. fruticosa*

Название праймера	Последовательность	Температура отжига
<i>RAPD</i>		
OPA-05	5'AGGGGTCTTG 3'	37°C
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'	36°C
OPA-11	5' CAATCGCCGT 3'	40°C
OPC-02	5' GTGAGGCGTC 3'	40°C
OPC-13	5' AAGCCTCGTC 3'	40°C
OPD-08	5' GTGTGCCCA 3'	42°C
OPG-08	5' TCACGTCCAC 3'	38°C
OPX-08	5'CAGGGGTGGA 3'	42°C
<i>ISSR</i>		
UBC 807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT 3'	48°C
UBC 808	5' AGAGAGAGAGAGAGAGC 3'	48°C
UBC 810	5' GAGAGAGAGAGAGAGAT 3'	48°C
UBC 811	5' GAGAGAGAGAGAGAGAC 3'	48°C
UBC 818	5' CACACACACACACACAG 3'	48°C
UBC 873	5' GACAGACAGACAGACA 3'	48°C

Степень генетического сходства между образцами рассчитывалась по формуле Nei и Li [15]. Дендрограммы, отражающие степень генетического сходства между формами и/или сортами, строили на основе полученных матриц расстояний при помощи метода UPGMA. После этого проводили Bootstrap-анализ, позволяющий оценить, насколько

адекватно дендрограмма отражает исходные данные, представленные в матрице сходства.

Результаты и обсуждение

Изначально для работы было отобрано 8 RAPD и 6 ISSR-праймеров, но после предварительной проверки праймеры OPA-11 и OPX-08 были исключены из дальнейшей работы, так как либо вовсе не давали ПЦР-продуктов, или получаемые маркеры были малочисленными и нечеткими.

Таким образом, для паспортизации коллекции были использованы 6 RAPD и 6 ISSR-праймеров. Полученные результаты были представлены в виде бинарных матриц (RAPD и ISSR-паспортов). Обобщенные сведения по спектрам ампликонов, полученных при использовании RAPD и ISSR-праймеров, представлены в табл. 2.

Далее на основе полученных данных строили таблицы степени генетического сходства и дендрограммы, отражающие результаты кластерного анализа UPGMA. Коэффициент корреляции между RAPD и ISSR-данными, полученными для форм Фонарик и Румянец и трех исследуемых сортов, составил 0,52 при уровне значимости 0,13. RAPD и ISSR-данные по всем формам коллекции имели коэффициент корреляции 0,58 при уровне значимости менее 0,05 и были объединены и представлены в виде единой дендрограммы на рис. 1.

Таблица 2

Характеристика спектров ампликонов, полученных с помощью использованных праймеров для сортов *P. fruticosa* (Gold Star, Red Ace и Gold Terpich, Румянец и Фонарик)

Праймер	Число маркеров	Размеры фрагментов, п.о.	Число фрагментов на образец (min, max, средн.)	Число уникальных маркеров
OPA-05	10	600-3000	3; 6; 4	3
OPA-10	5	260-1200	2; 4; 3	0
OPC-02	8	710-2700	0; 6; 2,6	5
OPC-13	4	1050-1800	2; 4; 2,6	0
OPG-08	10	300-1600	2; 6; 4	3
OPD-08	9	350-1700	1; 5; 3,6	5
UBC 807	24	360-2000	5; 13; 7,83	11
UBC 808	20	370-1600	5; 11; 8	5
UBC 810	20	440-1600	3; 12; 8,4	8
UBC 811	21	300-1700	7; 12; 10	4
UBC 818	19	480-1400	6; 11; 9	2
UBC 873	6	550-1200	3; 5; 4,4	0

Выводы

Совместное использование двух методов маркирования (RAPD и ISSR) позволило провести достаточно тщательное и разностороннее изучение генетического разнообразия коллекции курильского чая ЦБС НАН Б. Данные, полученные при паспортизации форм Фонарик и Румянец, сортов Gold Star, Gold Terpich и Red Ace двумя методами, не имели достоверно высокого коэффициента корреляции, при этом был отмечен одинаковый характер кластеризации всех пяти образцов. Наблюдаемые различия между данными двух методов, полученными при паспортизации всей коллекции, объясняются разным распределением RAPD и ISSR-ампликонов по геному: если RAPD-ампликоны распределены относительно равномерно, то ISSR-ампликоны ассоциированы с участками микросателлитной ДНК, характер изменчивости которой имеет свои особенности. Генотипирование всей коллекции RAPD и ISSR-маркерами привело к схожим данным. Полученные генетические паспорта для форм курильского чая могут использоваться для идентификации и патентования особо

ценных форм (это особенно важно для форм Румянец и Фонарик) и поддержания всей коллекции.

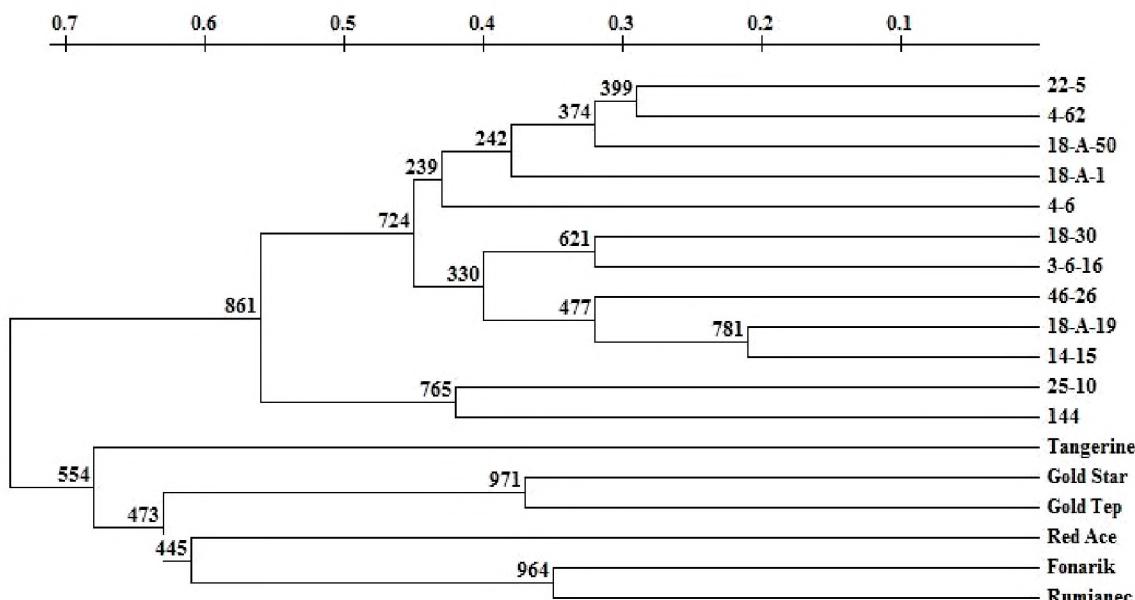


Рис. 1. RAPD+ISSR-дендrogramма на основе UPGMA-анализа, отражающая степень генетического сходства между формами и сортами *P. fruticosa*. Горизонтальная шкала – относительное генетическое расстояние между формами. В точках разветвления указаны результаты Bootstrap анализа

На основании полученных данных сделаны детальные выводы о генетических различиях и дистанциях исследованных форм, которые являются весьма ценными для дальнейшего процесса селекции. Таким образом, проведенные исследования показывают принципиальную возможность совместного применения RAPD и ISSR-маркеров для точного и достоверного генотипирования сортов курильского чая. Проведенное RAPD и ISSR-маркирование предоставило серьезные дополнительные аргументы в пользу выделения форм Фонарик и Румянец в самостоятельные сорта.

Список литературы

1. Минаева В. Г. Лекарственные растения Сибири. – Новосибирск: Наука, 1991. – 428 с.
2. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR-marker assays / Awasthi A.K., Nagaraja G.M., Naik G.V., Kanginakudru S., Thangavelu K., Nagaraju J. // BMC Genetics. – 2004. – V. 5. – P. 1-9.
3. Beidler J.L., Hilliard P.R., Rill R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver // Anal. Biochem. – 1982. – V. 126. – P. 374-380.
4. Creste S., Neto A.T., Figueira A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining // Plant Molecular Biology Reporter. – 2001. – V. 19. – P. 299-306.
5. Davidson C.G., Enns R.J., Gobin S.A. Checklist of *Potentilla fruticosa*: the Shrubby Potentillas. – Morden, Manitoba: Agric & AgriFood Canada Res Centre, 1994. – 80 p.
6. Elkington T. T., Woodell S. R. J. *Potentilla fruticosa* L. // J. of Ecol. – 1963. – V. 51, N 3. – P. 769-781.
7. Elkington T.T. Cytotaxonomic Variation in *Potentilla fruticosa* L. // New Phytologist. – 1969. – V. 68, N 1. – P. 151-160.

8. Eriksen B., Tupel M.H. Molecular phylogeography and hybridization in members of the circumpolar *Potentilla* sect. *Niveae* (Rosaceae) // Amer. J. of Bot. – 2006. – V. 93, N 3. – P. 460-469.
9. Gabrielsen T.M., Brochmann C. Sex after all: high levels of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD-markers // Molecular ecology. – 1998. – V. 7. – P. 1701-1708.
10. Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia* / Gabrielsen T.M., Bachmann K., Jakobsen K.S., Brochmann C. // Mol. ecology. – 1997. – V. 6. – P. 831-842.
11. Gregor V.T., Vechta, J. R., Weising K. RAPD-Untersuchungen und Chromosomenzählungen in der *Potentilla collina*-Gruppe (Rosaceae) // Ber. Bayer. Bot. Ges. Kassel. – 2003. – V. 72. – 159-167.
12. Hansen K. T., Elven R., Brochmann C. Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in arctic *Potentilla* (Rosaceae) // Am. J. Bot. – 2000. – V. 87. – P. 1466-1479.
13. Hombergen E.J., Bachmann K. RAPD mapping of three QTLs determining trichome formation in *Microseris* hybrid H27 (Asteraceae: Lactuceae) // Theor. App. Genet. – 1995. – V. 90, N 6. – P. 853-858.
14. Martins M., Tenreiro R., Oliveira M.M. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR-markers // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 22. – P. 71-78.
15. Nei M., Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // PNAS. – 1979. – V. 76, N 10. – P. 5269-5273.
16. Roy A., Bandyopadhyay A., Mahapatra A.K. Evaluation of genetic diversity in jute (*Cochchorus* species) using STMS, ISSR and RAPD-markers // Plant Breeding. – 2006. – V. 125. – P. 292-297.
17. Zhang J.Y., Yuan Q.H., Meng Y.Q. A genetic diversity analysis of wild *Lespedeza* populations based on morphological characters, allozyme and RAPD-methods // Plant Breeding. – 2007. – V. 126. – P. 89-94.

КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ И СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук;
 И.В. СТАВЦЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук;
 А.Г. ИНЮТКИНА, Л.Н. ЧУБ, А.А. ЛОЛОЙКО

Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН, Симферополь, Украина

Введение

Селекция большинства эфиромасличных растений в основном ведется с использованием традиционных методов гибридизации и отбора, которые не всегда позволяют получать достаточно разнообразный исходный материал, отвечающий современным требованиям производства. Внедрение в селекционный процесс новых биотехнологических подходов позволяет существенно повысить его эффективность и конструировать генотипы на базе клеточной и генной инженерии, что было успешно продемонстрировано для ряда сельскохозяйственных растений [2, 5, 6].

Один из наиболее эффективных и относительно простых методов создания исходного селекционного материала основан на использовании сомаклональной изменчивости культивируемых *in vitro* соматических клеток. Разработка этого направления для эфиромасличных растений весьма перспективна и связана, прежде всего, с оптимизацией условий длительного пассирования каллусных тканей и регенерации из них растений. В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных исследованию процессов каллусо- и морфогенеза у отдельных эфиромасличных растений [8-12]. Однако для