

УДК: 582.675.1:575.174.015.3

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКИХ ВИДОВ
РАСТЕНИЙ РОДА *ADONIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ISSR- И IRAP-МАРКЕРОВ*

С. В. БОРОННИКОВА

(Кафедра ботаники и генетики растений
Пермского государственного университета)

Молекулярно-генетический анализ популяций *A. sibirica* Patr. ex Ledeb. и *Adonis vernalis* L. выявил общие и специфические для этих видов сочетания длин амплифицированных фрагментов ДНК с использованием ISSR- и IRAP-методов. Предложен принцип генетической паспортизации и штрих-кода популяций редких видов растений, который может найти применение как при разработке мер охраны и восстановления природных популяций, так и при идентификации растительного сырья лекарственных растений.

Биология геномика, идентификация, полиморфизм, редкие виды.

Современные молекулярно-генетические технологии позволяют изучать тонкую структурно-функциональную организацию геномов различных организмов. Анализ генетической изменчивости пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов, идентификация и паспортизация хозяйственно-ценных особей стали возможны благодаря получению специфических геномных маркеров ДНК. С помощью произвольных праймеров идентифицировали генотипы видов рода *Panax* (*Araliaceae*) [5], а впоследствии и эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (*Fabaceae*) [1]. Работы по молекулярно-генетической идентификации сортового материала растений проводятся в основном на важнейших продовольственных [2,4], а также ягодных культурах [10, 12]. Идентификация генотипов растений проведена с помощью ПЦР анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173 [6], разработаны основы паспортизации зерновых [3,15] и ягодных культур [14].

Значительно меньше внимания уделено анализу генетической изменчивости природных популяций, особенно редких и ресурсных видов растений. Весьма актуальной является проблема идентификации растительного сырья у близкородственных лекарственных видов растений, таких как виды рода *Adonis*.

В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает ISSR-метод (Inter-Simple Sequence Repeat) очень эффективным и удобным в генетическом анализе. Основой ISSR-метода или анализа полиморфных участков ДНК между микросателлитами является ПЦР с одним или несколькими праймерами длиной в 15-24 нуклеотида, но праймеры состоят из tandemных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера [19, 7]. ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров и хорошо воспроизводим в строгих условиях

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 07-04-96032.

реакции. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) — это анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между ретротранспозонами [16, 17]. В качестве повторяющихся последовательностей ретротранспозоны рассеяны по всему геному; в связи с этим они удобны для ДНК-генотипирования растений [7, 15]. При идентификации растительного сырья лекарственных растений, при мониторинге состояния природных популяций редких и исчезающих видов растений, для рекомендаций мер их охраны и при их восстановлении после антропогенных воздействий важна обобщенная генетическая характеристика по типичным для данного рода, вида, популяции ДНК-маркерам.

Объекты исследований и методика

В качестве объектов исследований были избраны 6 природных популяций двух редких лекарственных и декоративных видов растений из семейства *Ranunculaceae* Juss.: *Adonis vernalis* L. и *Adonis sibirica* Patr. ex Ledeb. с категорией угрожаемого состояния 3 (R) — редкие виды [4, 9]. Молекулярно-генетический анализ 6 популяций двух видов рода *Adonis* проведен в 2006–2008 гг. Исследованы три популяции *A. vernalis*: первая (Av1) расположена на остепненном лугу около с. Михино Ординского района, вторая (Av2) — в березовом редколесье около д. Мерекай Уинского района, третья (Av3) — на остепненном лугу около с. Ишимово Октябрьского района Пермского края. Для выявления общих для двух близкородственных видов ДНК-маркеров исследованы 3 популяции *A. sibirica* в Добрянском, Кишертском и Ильинском районах Пермского края. Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма ДНК 2 видов рода *Adonis* были собраны листья в каждой популяции с 30 случайно выбранных растений на расстоянии от 30 до 50 м друг от друга. Для выделения ДНК использовали методику, приведенную в [18]

с незначительными модификациями. Выявление генетического полиморфизма ДНК проводили в ПЦР-лаборатории Пермского государственного университета ISSR- [19] и IRAP-методом [16]. Клонирование [11] и секвенирование ДНК, а также дизайн праймеров проведены в лаборатории растительной геномики института Биотехнологии университета Хельсинки (Финляндия) [8]. В ЗАО «Синтол» и «Евроген» (Россия) синтезированы 10 ISSR-праймеров, а 70 IRAP-праймеров — в «MWG» (Германия). Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 25 мкл содержала: 2 единицы Taq-полимеразы («Силекс М»), 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР (Силекс М), 25 пМ праймера, 2,5 mM Mg²⁺, 0,25 mM dNTP, 5 мкл геномной ДНК. На смесь наслаивали 2 капли минерального масла. Амплификацию ДНК двух видов рода *Adonis* проводили в термоциклере «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Москва) с использованием ISSR-праймеров по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 с; t отжига, 10 с; 72°C, 10 с; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 с; t отжига, 5 с; 72°C, 5 с. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72°C. Температура отжига в зависимости от от G/C состава праймеров варьировала от 46 до 56°C. IRAP-амплификацию проводили по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 4 мин; 32 цикла 94°C, 40 с; t отжига, 1 мин; 72°C, 2 мин. Последний цикл элонгации длился 5 мин при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 46 до 60°C. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ульт-

рафиолетовом свете с помощью системы гельдокументации «Gel-Doc» (Внорад, США). Определение длины фрагментов ДНК проводили с помощью программы «Quantity One» с использованием маркера молекулярной массы (100 Ър+1.5+3 Kб DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Москва). ПЦР-анализ геномной ДНК особей изучаемых популяций и суммарной выборки повторяли не менее трех раз. Учитывали только хорошо воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты ДНК, интенсивность фрагментов не брали в расчет. Компьютерный анализ полученных данных проведен с помощью программы PopGen32 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel.

Результаты и их обсуждение

При изучении полиморфизма ДНК б других новых популяций двух видов рода *Adonis* нами были отобраны наиболее информативные 4 ISSR- и 5 IRAP-праймеров, длина амплифицированных фрагментов ДНК при ISSR-анализе варьировала от 210 до 1610 пн, а при ЖАР-анализе — от 215 до 2530 пн (табл. 1). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 14, а при ЖАР-анализе — 26 фрагментов ДНК (рис. 1).

Предлагается отличная от часто встречающейся [10, 13] запись фрагмента ДНК с указанием типа фрагмента (родовой, видовой, полиморфный),

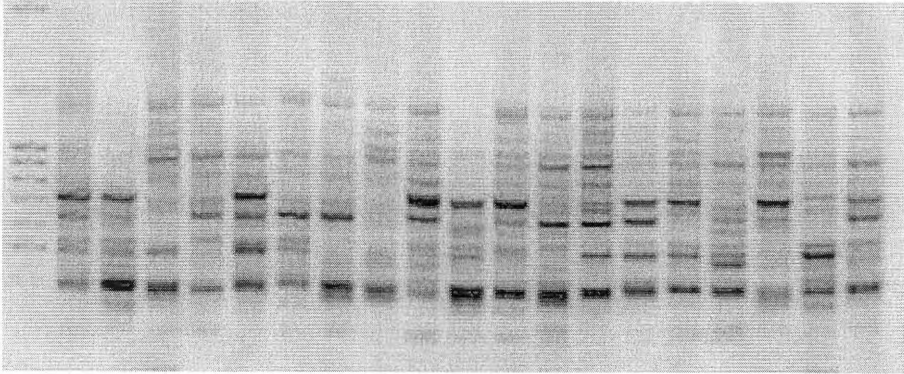
Т а б л и ц а 1

Характеристика фрагментов ДНК, избранных для паспортизации двух видов рода *Adonis*

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Размеры выявленных фрагментов ДНК, пн	ПЦР-фрагменты ДНК, избранные для паспортизации			
			мономорфные		полиморфные	
			длина, пн	обозначение	длина, пн	обозначение
ISSR M1	(AC) ₈ CG	270-1570	630	Av _p 630 _{M1}	470	Av _p 470 _{M1}
			380	AD _r 380 _{M1}	450	As _p 450 _{M1}
ISSR M3	(AC) ₈ CT	240-1390	480	AD _r 480 _{M3}	780	Av _p 780 _{M3}
			340	As _v 340 _{M3}	820	As _p 820 _{M3}
ISSR M12	(CA) ₆ G	210-1610	830	Av _v 830 _{M12}	460	Av _p 460 _{M12}
			550	As _v 550 _{M12}	750	As _p 750 _{M12}
ISSR X11	(AGC) ₆ G	310-1730	490	Av _v 490 _{X11}	950	Av _p 950 _{X11}
			550	AD _r 550 _{X11}	320	As _p 320 _{X11}
IRAP 2175	TTA GAC CCG GAA CCG CCG TG	215-2530	310	Av _v 310 _{IR75}	650	Av _p 650 _{IR75}
			420	Av _v 420 _{IR75}	610	Av _p 610 _{IR75}
			1510	As _v 1510 _{IR75}	350	Av _p 350 _{IR75}
IRAP 2197	GAA GTA CCG ATT TAC TTC CGT GTA	400-2630	1480	Av _v 1480 _{IR97}	1370	Av _p 1370 _{IR97}
			1310	AD _r 1310 _{IR97}	880	Av _p 880 _{IR97}
			480	Av _v 480 _{IR97}	760	Av _p 760 _{IR97}
			930	As _v 930 _{IR97}	440	Av _p 440 _{IR97}
IRAP 2198	ATC CTT CGC GTA GAT CAA GCG CCA	310-2800	850	AD _r 850 _{IR98}	1360	Av _p 1360 _{IR98}
			640	Av _p 640 _{IR98}	1030	Av _p 1030 _{IR98}
			430	As _v 430 _{IR98}	2120	As _p 2120 _{IR98}
IRAP 2202	TGG CGC TTG ATC TAC GCG AAG GA	320-2170	980	As _v 980 _{IR02}	620	Av _p 620 _{IR02}
			530	Av _v 530 _{IR02}	750	As _p 750 _{IR04}
IRAP 2204	AAC TTG ATC CAG ATC ATC TCC	340-2980	510	Av _v 510 _{IR04}	750	Av _p 750 _{IR02}
			710	Av _v 710 _{IR04}	590	Av _p 590 _{IR04}

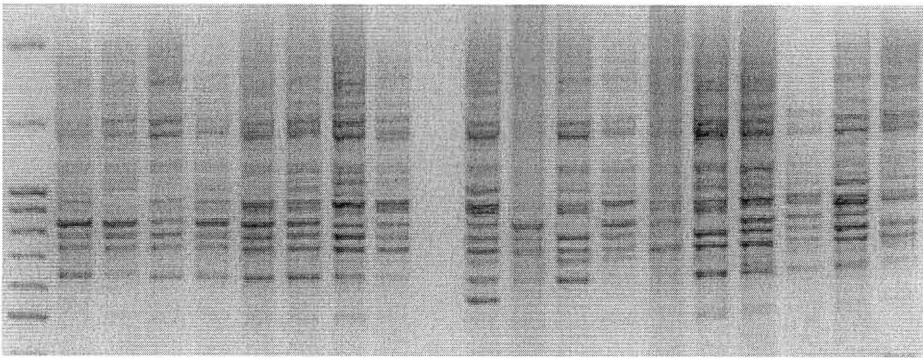
Примечание: AD_r — фрагменты ДНК, общие для двух видов рода *Adonis*; Av_v и As_v — фрагменты ДНК, характерные для каждого вида; Av_p и As_p — полиморфные фрагменты ДНК.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



A

M 1 2 3 4 5 6 7 8 K- 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Б

Рис. 1. ISSR-спектр популяции *A. vernalis* (Av1) около с. Михино с праймером M1 (A) и IRAP-спектр популяции *A. vernalis* (Av3) около с. Ишимово с праймером IR2204 (Б): цифрами обозначены номера проб, M — молекулярный маркер, с фрагментами размером сверху вниз 2000 пн, 1500 пн., 1000 пн, 900 пн, 800 пн и т.д.; K — отрицательный контроль, стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты ДНК

длины фрагмента и указания праймера нижним индексом, например, Avv630M1-. Нами выявлены фрагменты ДНК, общие для особей двух видов рода *Adonis*, которые мы предлагаем назвать «родовыми» и обозначить первыми буквами названия рода AD с указанием «г» от «god» нижним индексом, например, ADr550_{хII}-. Эти фрагменты ДНК являются надвидовыми, среди них могут быть как присущие роду, так и более высоким таксонам, но мы предлагаем оставить название «родовые», имея ввиду, что эти фрагменты

четко воспроизводятся у особей изучаемого рода. Четко воспроизводимые при ПЦР-анализе только у особей одного вида фрагменты ДНК предлагается назвать «видовыми» и обозначить как Av и As с указанием «V» от «vid», например, Av_v830_{M12}-. Полиморфные фрагменты ДНК предлагается обозначить индексом «р» от «polimorph», например, Av_v650_{IR75}-.

Для паспортизации особей рода *Adonis* и двух изученных видов были выделены четко воспроизводимые 17 мономорфных и 20 полиморфных фрагмен-

тов ДНК (см. табл.1). Мономорфные фрагменты ДНК позволили идентифицировать принадлежность особи и к роду, и к виду, а полиморфные фрагменты ДНК при их различных сочетаниях позволили составить уникальный генетический паспорт популяций. Как родовые, так и видовые фрагменты ДНК в основном установлены с использованием ISSR-метода. С помощью этого же метода возможна и идентификация листьев лекарственного вида *A.vernalis*, применяемого в качестве лекарственного сырья для получения сердечных гликозидов, не обладающих кумулятивным эффектом. Для паспортизации видов рода *Adonis* мы отобрали по 4 фрагмента ДНК, общих и специфических для двух изучаемых видов этого рода (табл. 2). Это минимальное число фрагментов ДНК, с помощью которых нам удалось провести паспортизацию. Природные популяции или группы близкорасположенных популяций можно охарактеризовать разными сочетаниями полиморфных фрагментов ДНК, причем главную роль в данном случае играют полиморфные фрагменты ДНК, амплифицированные IRAP-методом. В качестве примера приведены молекулярно-генетические формулы 3 популяций *A. vernalis*, расположенные в островной Кунгурской лесостепи (см. табл.2).

Сочетания полиморфных фрагментов ДНК не совпадают ни у одной из

изученных популяций, что позволяет их рекомендовать для генетической паспортизации популяций редких видов растений. Помимо буквенно-цифровой записи молекулярно-генетического паспорта популяций предлагается графическая запись в виде штрих-кода. Родовые фрагменты предлагается обозначить толстой линией, видовые — линией средней толщины, а полиморфные фрагменты — тонкой линией. Для штрих-кода предлагается использовать 10 штрихов, из которых четыре характерны для рода, четыре — для вида, а два — для популяции. Фрагменты ДНК в штрих-коде располагаются в зависимости от их длины от большего к меньшему (рис. 2). Как молекулярно-генетическая формула, так и штрих-код позволяют идентифицировать принадлежность как растительного сырья, так и отдельных особей не только к роду и виду, но и к определенной группе популяций *A. vernalis* или *A. sibirica*.

Заключение

Молекулярно-генетическая паспортизация ресурсных видов растений включает в себя следующие этапы: выбор эффективных методов анализа полиморфизма ДНК, сбор материала, подбор эффективных праймеров, молекулярно-генетический анализ с использованием ПЦР, выявление идентификационных маркеров ДНК, моно-

Т а б л и ц а 2

Молекулярно-генетическая паспортизация 3 популяций *A.vernalis*

Обозначение популяции	Тип фрагментов ДНК	Молекулярно-генетическая формула
Av1	Rod	AD _r 550 _{X11} ; AD _r 850 _{IR98} ; AD _r 480 _{M3} ; AD _r 380 _{M1}
	Vid	AV _v 830 _{M12} ; AV _v 710 _{IR04} ; AV _v 630 _{M1} ; AV _v 490 _{X11}
	Polimorph	AV _p 900 _{M12} ; AV _p 620 _{IR02} ; AV _p 440 _{IR97} ; AV _p 350 _{IR75}
Av2	Rod	AD _r 550 _{X11} ; AD _r 850 _{IR98} ; AD _r 480 _{M3} ; AD _r 380 _{M1}
	Vid	AV _v 830 _{M12} ; AV _v 710 _{IR04} ; AV _v 630 _{M1} ; AV _v 490 _{X11}
	Polimorph	AV _p 1200 _{IR97} ; AV _p 760 _{IR97} ; AV _p 620 _{IR02} ; AV _p 610 _{IR75}
Av3	Rod	AD _r 550 _{X11} ; AD _r 850 _{IR98} ; AD _r 480 _{M3} ; AD _r 380 _{M1}
	Vid	AV _v 830 _{M12} ; AV _v 710 _{IR04} ; AV _v 630 _{M1} ; AV _v 490 _{X11}
	Polimorph	AV _p 1100 _{IR98} ; AV _p 880 _{IR97} ; AV _p 750 _{IR02} ; AV _p 650 _{IR75}

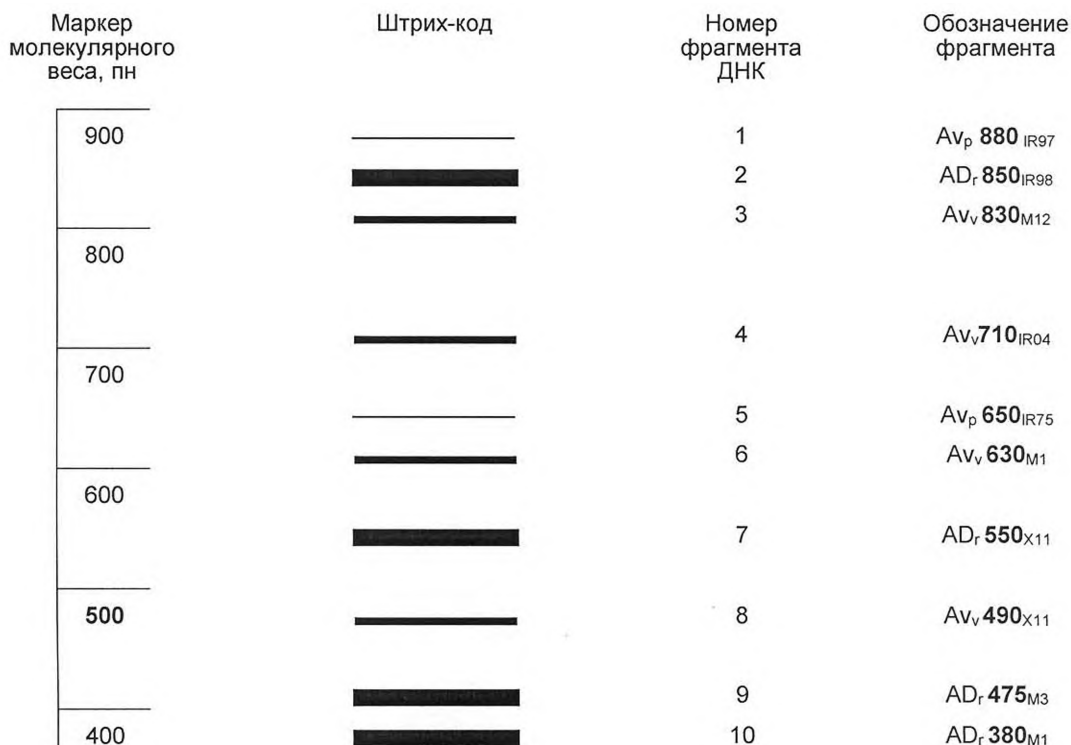


Рис. 2. Генетический штрих-код популяции Av3 *A. vernalis* около д. Ишимово Октябрьского района Пермского края

морфных и полиморфных фрагментов ДНК, составление молекулярно-генетической формулы, штрих-кода и генетического паспорта [2]. Для молекулярно-генетической паспортизации ресурсных растений нами рекомендуются ISSR и IRAP методы, которые в совокупности позволяют выявить полиморфизм большей части генома изучаемых видов растений, являются стабильными, дают четко воспроизводимые результаты. IRAP-метод анализа полиморфных фрагментов ДНК апробован на 5 редких видах Пермского края, имеющих высокий фармацевтический потенциал. Именно данный метод анализа полиморфизма ДНК перспективен для выявления генетических механизмов адаптации популяционных систем в гетерогенной среде. Нами впервые клонированы и секвенирова-

ны последовательности ДНК пяти редких и фармацевтически значимых ресурсных видов растений Пермского края [8]. Секвенированные последовательности ДНК пяти редких лекарственных видов растений размещены в мировой базе генетических данных «GenBank» (USA) (№ FI 910 0 0-EF191012).

Предлагаемая методика молекулярно-генетической паспортизации является относительно недорогой и при наличии эффективных IRAP праймеров пригодна для массового анализа. Разработанный на примере редких лекарственных видов растений принцип паспортизации может являться моделью, которая рекомендуется для паспортизации сортов продовольственных культур и идентификации растительного сырья лекарственных растений.

Библиографический список

Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М., Журавлев Ю.Н. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD маркеров // Генетика. 2004. Т. 40, № 7. С. 877-884.

Боронникова С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. Перм. ун-т. Пермь, 2008.

Глазко Т.Т., Глазко В.И. Молекулярно-генетические подходы в селекции зерновых // Известия ТСХА. 2006. №4. С. 100-107.

Горчаковский П.Л., Шурова Е.А. Редкие и исчезающие растения Урала и Предуралья. М.: Наука, 1982.

Журавлев Ю.Н., Козыренко М.М., Артюкова Е.В. и др. ПЦР—генотипирование женьшеня с использованием произвольных праймеров // Докл. Академии наук. 1996. Т.349, №1. С. 111-114.

Зайцев В.С., Хавкин Э.Е. Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторов последовательностей R173 // Докл. РАСХН. 2001. №2. С. 3-5.

Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т.34. № 4. С.141—156.

Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Материалы Четвертого Московского международного конгресса (Москва, 12-16 марта 2007 г.). М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И.-Менделеева, 2007. 4. 2.

Красная книга Пермского края / науч. ред. А.И. Шепель. Пермь: Книжный мир, 2008.

Мальшиев С.В., Урбанович О.Ю., Картель Н.А. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров: методические рекомендации. Минск, 2006.

Молекулярная генетика: учеб.-метод. пособие / под ред. С.В.Боронниковой. Пермь, 2007.

Оганисян А.С., Кочиева Е.З., Рысков А.П. Маркирование видов и сортов картофеля с помощью метода RAPD-PCR // Генетика. 1996. Т.32, №3. С.448-451.

Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск, 2007.

Соболев В.В., Карлов Г.И., Соболева А.Г., Озеровский А.В., Казаков И.В., Феськов А.А. Использование ISSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и паспортизации сортов малины // Сельскохозяйственная биология. 2006. №5. С.48-52.

Цветков И. А., Иванов А.Н., Глазко В.И. Генетическая дифференциация сортов риса по IRAP маркерам // Известия ТСХА. 2006. №4. С.155-159.

Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi F., Schulman A. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based ДНК fingerprinting techniques // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 704-711.

Kalendar, R., Schulman, A. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nature Protocols. 2006. №.1(5). P. 2478 - 2484.

Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among sozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // Theor. Appl. Genet. 1993. V.5. P. 937-945.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V.20. P. 176-183.

Рецензент — д. с.-х. н. В.И. Глазко

SUMMARY

Molecular-genetic analysis of *Adonis vernalis* L. and *A. sibirica* Patr. ex Ledeb. reveals common and specific for these two species Adonis combinations of amplified DNA fragments length, ISSR and IRAP techniques used. The principle of genetic certification and bar code of rare species populations which may be used both in rare plants renewal and in identification of drug crops raw material has been offered in the article.