

УДК 633.491:631.527

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕЖСОРТОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК КАРТОФЕЛЯ

А.С. ОГАНЕСЯН, Е.З. КОЧИЕВА

(Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

Хлоропластную ДНК 4 сортов картофеля *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* анализировали с помощью рестрикционных эндонуклеаз. Для каждого сорта составлен спектр рестрикционных паттернов. Показано, что рестриктаза *EcoRV* выявляет межсортовые различия хл ДНК анализируемых сортов и ее можно использовать для маркирования спектров хл ДНК сортов картофеля. При рестрикционном анализе хл ДНК ряда биотипов внутри одного сорта не установлено никаких различий, что говорит об однородности пластома сорта.

Хлоропластная ДНК (хл ДНК) растений представлена 20—200 копиями кольцевых молекул размером 120—180 т.н.п. Известно, что хлоропластный геном содержит последовательности генов хлоропластных РНК, тРНК и генов белков, синтезирующихся в хлоропластах [4]. Строение большинства хл ДНК растений, включая хл ДНК картофеля, состоит из 4 основных блоков: большая (78—100 т.н.п.) и малая (12—30 т.н.п.) уникальные последовательности, которые разделены 2 инвер-

тированными повторами (20—24 т.н.п.). Наличие последних характерно для всех наземных растений, за исключением бобовых, у которых эти повторяющиеся элементы ДНК отсутствуют [5].

В целом хл ДНК растений достаточно консервативна как внутри рода, так и среди видов. При этом дивергенция последовательностей хл ДНК видов очень незначительна. Перестройки хл ДНК редки, но у ряда видов наблюдается либо утеря частей инвертированных повторов,

как у гороха или кормовых бобов, либо значительное увеличение длины инвертированных повторов, как у герани [6].

Чаще всего изменения последовательности хл ДНК связаны с небольшими (1—10 н.п.) инсерциями или делециями. И только в редких случаях были получены данные о мутационных перестройках, захватывающих последовательности ДНК более 1200 н.п. [1].

Изменения в нуклеотидной последовательности хл ДНК можно выявить по спектрам рестрикционных фрагментов, получаемых при обработке хл ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами, и с использованием анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Ранее был проведен рестрикционный анализ диких и культивируемых видов картофеля, и по характеру расщепления хл ДНК различными эндонуклеазами анализируемые виды картофеля были поделены на 5 классов [2]. При этом следует особо подчеркнуть, что за одним исключением подобранные рестриктазы не выявляли сортовую изменчивость хл ДНК.

Целью нашей работы был подбор сайт-специфических эндонуклеаз, позволяющих выявлять не только межвидовые, но и межсортовые различия картофеля, что в дальнейшем сделает возможным построение карт пластома сорта и позволит использовать рестрикционные спектры хл ДНК сортов для маркировки при проведении межвидовых и межсортовых скрещиваний, а также анализа цибридов.

В последнее время интерес к хл ДНК связан еще и с тем фактом, что, как было показано, устойчивость

сорта к различным стрессовым факторам также связывается с изменениями в хл ДНК [4].

Методика

Анализировались хл ДНК следующих сортов картофеля: Янтарь, Гатчинский, Невский (отечественной селекции) и Ранняя роза (европейской селекции). Сорт Невский был представлен 3 биотипами: растениями, полученными из Биотехнологического центра Армении, безвирусным картофелем из Института сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ (анализировались листья растений 2 возрастов: 4—5 нед и после цветения), из ОПО картофельного хозяйства (поселок Коренево Московской обл.).

Хлоропластную ДНК выделяли из листьев по несколько измененной методике Хосака [2] с очисткой фракции хлоропластов в 30—52% сахарозном градиенте и последующим лизированием в буфере 0,1 М Трис (рН 8,0), 50 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 2% SDS. Депротейнизацию проводили путем 3-кратной экстракции смесью фенолхлороформ (1:1).

Полученную хл ДНК растворяли в 20—40 мкл ТЕ и хранили при 4°С.

Хлоропластную ДНК (2—3 мкг) обрабатывали рестрицирующими эндонуклеазами EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI (Boehringer Mannheim) в течение 9—12 ч в соответствующих буферах. Выбор данных рестриктаз объясняется рядом факторов: все они относятся к среднещипящим и узнают АТ-последовательности. При этом известно, что хл ДНК растений характеризуется АТ-богатыми последовательностями [4]. Кроме того,

некоторые из указанных рестриктаз использовались для выявления межвидовой специфичности [2].

Электрофорез рестрицированных фрагментов хл ДНК в 0,8% агарозном геле (SeaKem) проводили при 35 В в течение 24 ч.

Результаты

HindIII-спектр хл ДНК 4 изучаемых сортов картофеля представлен 14 фрагментами различной длины в амплитуде от 1 до 17 т.н.п. Количество полос в спектре вполне достаточно для проведения анализа. Полученный спектр хл ДНК сортов полностью совпал с приведенным в [3], что позволяет отнести все анализируемые нами сорта *S. tuberosum* к имеющим Т-тип хл ДНК.

Спектр рестрикционных фрагментов хл ДНК оказался одинаковым у всех анализируемых сортов, т.е. рестриктаза *HindIII* не может быть использована для выявления межсортового полиморфизма хл ДНК картофеля. Аналогичные результаты получены для *PstI-спектров*, которые также были одинаковы у всех анализируемых хл ДНК.

При обработке хл ДНК 4 сортов картофеля *эндонуклеазой EcoRI* и последующем электрофорезе в агарозном геле полученных рестрицированных фрагментов было выявлено отличие сорта Невский по дополнительному фрагменту длиной 3,7 т.н.п. от сортов Ранняя роза, Гатчинский и Янтарь, которые не различались между собой по рестрикционным *EcoRI-спектрам*.

Наибольший полиморфизм удалось зафиксировать при обработке хл ДНК сортов *рестриктазой EcoRV*. У изучаемых сортов было

выявлено от 18 до 23 фрагментов размером от 2 до 19 т.н.п. Следует особо отметить рестрикционный паттерн сорта Ранняя роза, который отличается от спектра хл ДНК сорта Гатчинский 6 фрагментами длиной 20,6; 18,5; 13,8; 12,4; 8,0 и 4,6 т.н.п. Рестрикционные спектры сортов Невский и Гатчинский различались по 2 фрагментам. При этом у сорта Невский исчезал фрагмент длиной 17,1 т.н.п. и появлялся фрагмент длиной 12,5 т.н.п.

Таким образом, при обработке хл ДНК анализируемых сортов эндонуклеазой *EcoRV* выявляется полиморфизм в рестрикционных спектрах, т.е. данную рестриктазу можно использовать для маркировки хл ДНК сортов картофеля.

Анализ внутрисортной однородности пластома картофеля свидетельствует об отсутствии различий рестрикционных спектров хл ДНК растений, относящихся к разным биотипам сорта Невский и различающихся по возрасту. Это позволяет говорить об однородности хл ДНК у биотипов внутри одного сорта.

Проведенный *рестрикционный анализ последовательностей хл ДНК* доказывает относительное сходство пластома у разных сортов *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*. Выявленные различия в спектрах рестрикционных паттернов у изучаемых сортов можно объяснить, с одной стороны, использованием диких видов картофеля в качестве доноров цитоплазмы при селекции сорта, с другой — собственной неустойчивостью хлоропластного генома у определенных сортов.

Нас интересовала характеристика природы межсортовых изменений, выявляемых при использова-

нии рестриктазы EcoRV. Палмер [6], анализируя вариабельность хл ДНК различных сортов герани, показал, что причиной изменений рестриционного спектра могут быть небольшие инсерции или делеции, возникающие вблизи повторов либо непосредственно фланкирующие прямые повторы, и эти области являются «горячими точками» для изменений нуклеотидной последовательности. Аналогичные данные были получены и при анализе видов и сортов сои. Можно предположить, что и у картофеля межсортовая вариабельность хл ДНК также связана с изменениями в областях, примыкающих к прямым повторам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Day A., Ellis T.H.N. — Cell., 1984, vol. 39, p. 359—368. — 2. Hosaka K. — Theor. Appl. Genet., 1986, vol. 72, p. 606—618. — 3. Hosaka K., Hanneman R.E. — Theor. Appl. Genet., 1988, vol. 76, p. 333—340. — 4. Longdale D.M. — Genetic Engineering., 1987, vol. 6, p. 48—102. — 5. Palmer J.D., Singh G.P., Pillay D.T.N. — Mol. Gen. Genet., 1983, vol. 190, p. 13—19. — 6. Palmer J.D., Osorio B., Aldrich J., Thompson W.F. — Curr. Genet., 1987, vol. 11, p. 275—286.

Статья поступила 5 июня 1994 г.

SUMMARY

Chloroplast DNA from four varieties of *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* was analysed by four restriction enzymes. The individual spectrum of restriction fragment length was obtained for each variety. It was shown that EcoRV enzyme permits to identify the individual differences in the ctDNA of the potato varieties and can be used for ctDNA mapping. The restriction analysis among biotypes of one of the variety showed no differences in their ctDNA.