

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ РЕСУРСНЫХ И РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ С ЦЕЛЬЮ ОПТИМИЗАЦИИ СОХРАНЕНИЯ ИХ ГЕНОФОНДОВ

С.В. БОРОННИКОВА,

кандидат биологических наук, доцент, Пермский государственный университет, г. Пермь

Ключевые слова: геном, ISSR и IRAP маркеры, полиморфизм, генетическое разнообразие, технология генетической паспортизации.

Цель и методика исследований

Через одно-два десятилетия продовольствие станет важнейшим стратегическим ресурсом. В 2000 году полностью секвенирован геном первого растения – представителя класса двудольных *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. В 2001 году предварительно секвенирован геном представителя класса однодольных *Oryza sativa* L. [1]. После секвенирования генома человека в 2001 году разработаны научно-методические основы идентификации личности человека. С 3 декабря 2008 года в силу вступил Федеральный закон «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» [2].

Геномы растений значительно сложнее, чем геном человека, что связано с рядом причин и, прежде всего, с их огромными размерами, достигающими для отдельных видов растений десятков и даже сотен миллиардов пар нуклеотидов. Однако прямое секвенирование геномов растений требует крупных финансовых вложений и в настоящее время вряд ли возможно [1]. Для генетической паспортизации как основы геномной регистрации ресурсных видов растений необходимо использовать более рациональные подходы, основанные на молекулярном маркировании геномов. Применяемые для геномной регистрации человека SNP маркеры не могут быть использованы для генетической паспортизации растений из-за их дороговизны. В настоящее время для генетического типирования используются различные типы молекулярных маркеров (RELF, RAPD, AFLP, ISSR, микросателлиты и т.п.), каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [3, 4].

Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к этим генам. На этой особенности основан ISSR-метод (Inter-Simple Sequence Repeat), в котором используются один или несколько праймеров длиной в 15-24 нуклеотида. В данном случае праймеры состоят из tandemных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера [5]. ISSR не требует предварительного клонирования

и секвенирования фрагментов для подбора праймеров и хорошо воспроизводим в строгих условиях реакции. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – это анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между ретротранспозонами [6]. В качестве модели разработки научно-методических основ генетической паспортизации ресурсных растений перспективны их редкие декоративные лекарственные виды.

Цель работы – разработка технологии генетической паспортизации гетерогенных и гомогенных популяций растений по результатам молекулярного маркирования как научно-методической основы геномной регистрации ресурсных видов растений с целью использования их потенциала и оптимизации сохранения их генофондов.

Молекулярно-генетические исследования 20 популяций 4 редких видов растений Пермского края, а именно: *Adonis vernalis* L. и *Adonis sibirica* Patr. ex Ledeb., *Digitalis grandiflora* Mill. и *Adenophora lilifolia* (L.) DC. [7, 8], проведены в 2004-2009 годах и предложен общий принцип молекулярно-генетической паспортизации [9]. Апробация технологии молекулярно-генетической паспортизации проведена на популяциях *A. sibirica*, который уступает по фармацевтическому потенциалу *Adonis vernalis* L., но перспективен как лекарственное растение [10]. Исследованы три популяции *A. sibirica*: первая (As1) расположена в травянистом ельнике на Лунежских горах около п. Полазна Добрянского района, вторая (As2) – в травянистом ельнике и мелколиственном лесу на территории УНБ "Предуралье" Кишертского района, третья (As3) – в смешанном лесу около п. Ильинский Ильинского района Пермского края. Для выделения ДНК использовали методику А.М. Тоггес [11] с некоторыми модификациями. Клонирование последовательностей ретротранспозонов осуществляли с помощью нового универсального метода быстрого их выделения [12], основанного на использовании ПЦП с праймерами из участка связывания tRNA (PBS - Primer Binding Site), прилегающего к левому прямому повтору LTR в центральной части ретротранспозона. Сек-



венирование последовательностей ДНК с использованием капиллярного секвенатора ABI3700 (Biosystems, USA) и дизайн праймеров проведены во время кратковременной стажировки в лаборатории растительной геномики Института биотехнологии Университета Хельсинки (Финляндия), руководимой профессором Шульманом А.Х. Для IRAP-анализа пяти редких видов Урала разработаны и синтезированы 70 праймеров в MWG (Германия). Анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК, включая основные его стадии, а именно: подбор молекулярных маркеров и условий проведения ПЦР, апробацию праймеров, ПЦР-анализ, детекцию продуктов амплификации и компьютерный анализ данных, проведен в ПЦР-лаборатории Пермского государственного университета. Амплификация ДНК была выполнена в термоциклере (MJ, Bio-Rad, USA) по следующей программе: предварительная денатурация 95°C, 3 мин.; 30 цикла 95°C, 20 сек.; 60°C отжига, 1 мин.; 68°C, 1 мин. Последний цикл элонгации длился 5 мин. при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировалась от 55 до 68°C. Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров опыт повторяли не менее двух раз. Амплифицированные продукты были подвергнуты электрофорезу на 1,7% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Гели были отсканированы в системе Gel-Doc (Bio-Rad, США). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp+1,5+3 Kb DNA Ladder) (ООО "СибЭнзим-М", Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One в системе геле-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA).

Результаты исследований

На первом этапе разработки технологии молекулярно-генетической паспортизации была решена задача выбора эффективных стабильных молекулярных маркеров, которые позволяют выявить высокий уровень полиморфизма ДНК, анализировать большую часть ге-

Genome, ISSR and IRAP markers, polymorphism, genetic diversity, technology of the genetic certification.

Таблица 1

Характеристика фрагментов ДНК, избранных для паспортизации *A. sibirica*

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размеры фрагментов ДНК, п.н.	ПЦР-фрагменты ДНК, избранные для паспортизации			
			мономорфные		полиморфные	
			длина, п.н.	обозначение	длина, п.н.	обозначение
ISSR M1	(AC) ₈ CG	270-1570	1030 380	As _v 1030 _{M1} AD _r 380 _{M1}	450	As _p 450 _{M1}
ISSR M3	(AC) ₈ CT	270-960	480 340	AD _r 480 _{M3} As _v 340 _{M3}	820	As _p 820 _{M3}
ISSR M12	(CA) ₆ G	280-1620	550	As _v 550 _{M12}	750 320	As _p 750 _{M12} As _p 320 _{M12}
ISSR X11	(AGC) ₆ G	310-1730	610 550	As _v 610 _{X11} AD _r 550 _{X11}	320	As _p 320 _{X11}
IRAP 2175	TTA GAC CCG GAA CCG CCG TG	390-2170	1510 940	As _v 1510 _{IR75} As _v 940 _{IR75}	1370 1020	As _p 1370 _{IR75} As _p 1020 _{IR75}
IRAP 2197	GAA GTA CCG ATT TAC TTC CGT GTA	560-2630	1310 930 620	AD _r 1310 _{IR97} As _v 930 _{IR97} As _v 620 _{IR97}	780 1050	As _p 780 _{IR97} As _v 1050 _{IR97}
IRAP 2198	ATC CTT CGC GTA GAT CAA GCG CCA	390-2800	850 430	AD _r 850 _{IR98} As _v 430 _{IR98}	2120 1520	As _p 2120 _{IR98} As _p 1520 _{IR98}
IRAP 2202	TGG CGC TTG ATC TAC GCG AAG GA	390-2170	980 590	As _v 980 _{IR02} As _v 590 _{IR02}	2170	As _v 2170 _{IR02}
IRAP 2204	AAC TTG ATC CAG ATC ATC TCC	370-2980	1300 370	As _v 1300 _{IR04} As _v 370 _{IR04}	1170 1060	As _p 1170 _{IR04} As _p 1060 _{IR04}

Примечание: AD_r – фрагменты ДНК, общие для видов *A. vernalis* и *A. sibirica*; As_v – фрагменты ДНК, характерные для *A. sibirica*; As_p – полиморфные фрагменты ДНК.

Таблица 2

Молекулярно-генетические формулы трех популяций *A. sibirica*

Обозначение популяции	Тип фрагментов ДНК	Запись формулы
As1	rod	AD _r 850 _{IR98} ; AD _r 550 _{X11} ; AD _r 380 _{M1} ; AD _r 475 _{M3}
	vid	As _v 1510 _{IR75} ; As _v 935 _{IR97} ; As _v 610 _{X11} ; As _v 425 _{IR98}
	polimorph	As _p 1370 _{IR75} ; As _p 745 _{M12}
As2	rod	AD _r 850 _{IR98} ; AD _r 550 _{X11} ; AD _r 380 _{M1} ; AD _r 475 _{M3}
	vid	As _v 1510 _{IR75} ; As _v 935 _{IR97} ; As _v 610 _{X11} ; As _v 425 _{IR98}
	polimorph	As _p 1170 _{IR04} ; As _p 745 _{M12}
As3	rod	AD _r 850 _{IR98} ; AD _r 550 _{X11} ; AD _r 380 _{M1} ; AD _r 475 _{M3}
	vid	As _v 1510 _{IR75} ; As _v 935 _{IR97} ; As _v 610 _{X11} ; As _v 425 _{IR98}
	polimorph	As _p 1025 _{IR75} ; As _p 320 _{M12}

нома растений, получить четко воспроизводимые результаты. Технология должна быть недорогой и доступной для массового анализа. Эффективными для идентификации организмов признаны ISSR маркеры. Возможно, для гомогенных искусственных популяций, каковыми являются сорта растений, достаточно ISSR маркеров для паспортизации сорта. Для гетерогенных природных популяций необходима характеристика полиморфизма ДНК с анализом большей части генома. В связи с этим помимо ISSR маркеров нами рекомендованы для паспортизации IRAP маркеры. В качестве повторяющихся последовательностей ретротранспозоны рассеяны по всему геному [13]. По нашему мнению, хорошая воспроизводимость результатов ISSR и IRAP анализов обусловлена также размерами их праймеров: от 13 до 19 п.н. у ISSR и от 18 до 24 п.н. у IRAP (табл. 1).

На втором этапе паспортизации в трех природных популяциях *A. sibirica* собраны фрагменты листьев и выделена ДНК.

На третьем этапе были отобраны наиболее информативные 4 ISSR- и 5 IRAP-праймеры, с помощью которых выявлены эффективные для *A. sibirica* ISSR и IRAP маркеры (табл. 1). Проведен

ПЦР-анализ выделенных проб ДНК.

На четвертом этапе паспортизации провели анализ выявленных молекулярных маркеров. Для паспортизации популяций *A. sibirica* были выделены четко воспроизводимые 18 мономорфных и 15 полиморфных фрагментов ДНК, длина которых при ISSR-анализе варьировалась от 270 до 1730 п.н., а при IRAP-анализе - от 245 до 2800 п.н. (табл. 1). Проведен ПЦР-анализ проб ДНК двух видов рода *Adonis* с одними и теми же ISSR и IRAP праймерами и выявлены общие для двух видов фрагменты ДНК, которые являются надвидовыми, но для удобства названы нами родовыми. По нашим данным, для выявления идентификационных фрагментов ДНК необходимо проанализировать не менее 50 ISSR маркеров и не менее 90 IRAP маркеров.

На пятом этапе маркеры ДНК, избранные для паспортизации, представили в виде молекулярно-генетической формулы. Необходимость усовершенствования формы записи молекулярно-генетической формулы продиктована тем, что в записи, предлагаемой ранее [14, 15] не указывается вид растений, а длина фрагмента ДНК и праймер, с помощью которого амплифицирован фрагмент, указаны в дополнительной таблице. В связи с этим нами предложена но-

вая запись фрагмента ДНК с указанием типа фрагмента (родовой, видовой, полиморфный), длины фрагмента и указания праймера нижним индексом, например, As_v1510_{IR75}. Нами выявлены фрагменты ДНК, общие для особей двух видов рода *Adonis*, которые мы назвали родовыми и обозначили первыми буквами названия рода AD с указателем "r" от "rod" нижним индексом, например, AD_r550_{X11}. Четко воспроизводимые при ПЦР-анализе только у особей одного вида фрагменты ДНК предлагается называть видовыми и обозначить как As с указанием "v" от "vid", например, As_v550_{M12}. Полиморфные фрагменты ДНК предлагается обозначить индексом "p" от "polimorph", например, As_p780_{IR97}. Мономорфные фрагменты ДНК позволили нам идентифицировать принадлежность особи и к роду, и к виду, а полиморфные фрагменты ДНК при их различных сочетаниях позволили составить уникальную генетическую формулу популяции. Для паспортизации популяций *A. sibirica* мы отобрали четыре фрагмента ДНК, общих для двух видов рода *Adonis*, четыре видовых фрагмента ДНК, а также по два специфических фрагмента для каждой из трех изученных популяций *A. sibirica* (табл. 2). Это минимальное число фрагментов ДНК, с помощью которых нам удалось провести паспортизацию. Сочетания полиморфных фрагментов ДНК не совпадают ни у одной из изученных популяций, что позволяет рекомендовать их для генетической паспортизации.

На шестом этапе паспортизации помимо буквенно-цифровой записи молекулярно-генетической формулы впервые в мире предложена запись в виде штрих-кода [9]. Как молекулярно-генетическая формула, так и штрих-код (рис. 1, табл. 2) позволят идентифицировать принадлежность как растительного сырья, так и отдельных особей *A. sibirica* не

Маркер молекулярного веса, п.н.	Штрих-код	Номер фрагмента ДНК	Обозначение фрагмента
1600	██████████	1	As _v 1510 _{IR75}
1500	██████████		
1400	██████████		
1300	██████████		
1200	██████████	2	As _p 1170 _{IR04}
1100	██████████		
1000	██████████	3	As _v 930 _{IR97}
900	██████████	4	AD _r 850 _{IR98}
800	██████████	5	As _p 750 _{M12}
700	██████████	6	As _v 610 _{IR75}
600	██████████	7	AD _r 550 _{X11}
500	██████████	8	AD _r 480 _{M3}
	██████████	9	As _v 430 _{IR98}
400	██████████	10	AD _r 380 _{M1}

Рисунок 1. Молекулярно-генетический штрих-код популяции *A. sibirica* (As2) в УНБ «Предуралье»

Примечание: AD_r – фрагменты ДНК, общие для видов *A. vernalis* и *A. sibirica*; As_v – фрагменты ДНК, характерные для *A. sibirica*; As_p – полиморфные фрагменты ДНК

только к роду и виду, но и к определенной популяции.

В завершении технологии паспортизации сортов и популяций на ее седьмом этапе рекомендуется составление генетического паспорта единожды для генетически гомогенной популяции, и периодически через три-пять лет - для гетерогенной популяции. Нами разработана форма генетического паспорта на примере 10 популяций редкого вида ра-

стений *A. vernalis*, выбраны общепринятые показатели состояния популяций и генетического разнообразия [9].

Выводы. Рекомендации

Технология молекулярно-генетической паспортизации ресурсных видов растений включает в себя 7 этапов: выбор эффективных методов анализа полиморфизма ДНК, сбор материала, подбор эффективных праймеров, молекулярно-генетический анализ с исполь-

зованием ПЦР, выявление идентификационных маркеров ДНК, редких и уникальных фрагментов ДНК, составление молекулярно-генетической формулы, штрих-кода и генетического паспорта.

Для молекулярно-генетической паспортизации ресурсных растений нами рекомендуются ISSR и IRAP методы, которые в совокупности позволяют выявить полиморфизм большей части геномов изучаемых видов, являются стабильными, дают четко воспроизводимые результаты. Предлагаемая технология паспортизации является относительно недорогой и при наличии выявленных эффективных IRAP праймеров пригодна для массового анализа. Разработанная на примере редких лекарственных видов растений технология паспортизации может являться моделью, которая рекомендуется для паспортизации сортов продовольственных культур и идентификации растительного сырья лекарственных растений.

Технология молекулярно-генетической паспортизации позволяет выявить, записать и наглядно представить в обобщенной форме характеристику геномов изучаемых видов растений, позволив конкретизировать показатели их генетического разнообразия на популяционном уровне. Данная технология, на наш взгляд, оптимизирует стратегию сохранения генофондов изучаемых видов растений и может быть в будущем основой геномной регистрации как природных популяций ресурсных, включая редкие, видов растений, так и сортов продовольственных культур.

Литература

1. Зеленин А. В. Геном растений // Вестник Российской академии наук. 2003. Т. 73. № 9. С. 797-806.
2. О государственной геномной регистрации в Российской Федерации : Федер. закон Рос. Федерации от 3 дек. 2008 г. № 242-ФЗ // Рос. газ. 2008. 09 дек.
3. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика. 2005. Т. 41. № 4. С. 480-490.
4. Чесноков Ю. В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений // Сельскохозяйственная биология. 2005. № 1. С. 20-40.
5. 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.
6. Kalendar R., Grob T., Regina M. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // Theor. and Applied Genetics. 1999. V. 98. P. 704-711.
7. Горчаковский П. Л., Шурова Е. А. Редкие и исчезающие растения Урала и Предуралья. М. : Наука, 1982. 283 с.
8. Красная книга Пермского края / науч. ред. А.И. Шепель. Пермь : Книжный мир, 2008. 256 с.
9. Боронникова С. В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. Пермь : Изд-во Пермского ун-та, 2008. 120 с.
10. Дикорастущие полезные растения России / отв. ред. А. Л. Буданцев, Е. Е. Лесяковская. СПб. : Изд-во СПбХФА, 2001. 663 с.
11. Torres A. M., Weeden N. F., Martin A. Linkage among sozume, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // Theor Appl. Genet. 1993. V. 5. P. 937-945.
12. Kalendar R., Tanskanen J., Chang W., Antonius K. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // PNAS. 2008. V. 105. № 15. P. 5833-5838.
13. Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 479-532.
14. 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.
15. Малышев 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 рекомбинации. Минск, 2006. 28 с.