

Молекулярно-генетические методы в сохранении и изучении генофонда ботанических коллекций

Спиридович Е.В.¹, Молканова О.И.², Коротков О.И.³, Власова А.Б.¹, Юхимук А.Н.¹, Решетников В.Н.¹

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, e-mail: E.Spiridovich@cbg.org.by

²Главный ботанический сад имени Цицина Н.В. РАН, г. Москва, Россия

³Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия

Резюме. Разработан и применен комплексный RAPD+ISSR-подход молекулярной сертификации 16 генотипов (сортов) сирени белорусской селекции (ЦБС НАН Беларуси) для целей поддержания коллекции и сохранения ценных генотипов. Разработанные 51 RAPD и 42 ISSR-маркеры (в т.ч. сорт-уникальных) позволили дифференцировать все исследованные генотипы, составить генетические сертификаты для каждого из них, рассчитать степень генетического родства. RAPD+ISSR-генотипирование генотипов сирени коллекции ЦБС НАН Беларуси является эффективным способом молекулярной сертификации культурных форм сирени. Примененный анализ позволил сертифицировать все исследованные генотипы сирени белорусской селекции, подтвердить данные о родословной сортов, уточнить филогенетические связи между ними..

Summary. An integrated approach of RAPD+ISSR-molecular certification of the 16 genotypes (cultivars) of lilacs of Belarusian breeding (CBG NASB) was developed and applied aimed at collection maintenance and unique genotypes conservation. Generated in total 51 RAPD and 42 ISSR-markers (including cultivar-specific) allowed differentiation of all studied genotypes, creation of genetic certificates for each of them, calculation the degree of genetic similarity or distance. RAPD+ISSR-genotyping of lilac collection of CBG NASB assessed as an effective method of molecular certification of cultural forms of lilac. Applied analysis allowed certifying all studied Syringa genotypes of Belarusian breeding, to confirm the data on the varieties' pedigree, to clarify phylogenetic relationships between them.

Создание коллекций растений является наиболее эффективным путем сохранения, обогащения и рационального использования генетического разнообразия. На современном этапе прослеживается тенденция усиления научной составляющей создания ботанических коллекций в деятельности ботанических садов. Центральный ботанический сад Беларуси один из крупных научных центров, где решаются важные проблемы изучения, сохранения, обогащения и использования растительного богатства на протяжении 80 лет.

В создание национального генофонда декоративных растений, в т.ч. коллекции сирени, вложен труд нескольких поколений ботаников-интродукторов: Н.В. Смольского, В.Ф. Бибиковой, Э.А. Бурой, Г.И. Матусевича, Н.В. Македонской [1, 2].

Первый сирингарий на территории ЦБС был заложен в 1932–1933 гг. на площади 0,4 га из 80 сортов, завезенных с Украины. С 1956 г. под руководством академика Н.В. Смольского заметно активизировалась работа по интродукции сирени и уже тесно увязывалась с задачами максимального внедрения научных достижений в зеленое строительство республики.

Сотрудники Центрального ботанического сада в 70–80-х годах начали широко использовать разнообразные селекционно-генетические методы, такие как отбор сеянцев, полученных от свободного опыления, и гибридизация. Новые образцы сирени получали межсортной и межвидовой гибридизацией. Путем межсортных скрещиваний были улучшены декоративные и хозяйственные признаки интродуцированных видов сирени. На основе экспериментальных исследований Вероникой Федоровной Бибиковой были получены сорта сирени с простыми крупными и махровыми цветками чистых колеров, обильно и продолжительно цветущих: «Лебедушка», «Нестерка», «Павлинка», «Жемчужина», «Минчанка», «Защитникам Бреста», «Вера Хоружая», «Памяти А.Т. Смольской», «Успех», «Константин Заслонов», «Лунный свет», «Зорька Венера», «Партизанка», «Хорошее настроение», «Марат Казей», «Святая-зянка», «Белорусские зори», «Полесская легенда». На основе огромной экспериментальной работы с исходными сортами французской селекции, в условиях ограниченных контактов с селекционерами сирени других стран, минимального доступа к основным источникам информации о сирени, была создана коллекция белорусских сортов, которая, как и коллекция сортов Леонида Колесникова, – является уникальной линией эволюции сирени.

Наряду с традиционными методами сохранения генетического разнообразия растений *ex situ* все большее значение приобретает применение клеточных биотехнологий, которые обеспечивают аккуратное сохранение селекционных образцов прошлых лет, ускоренное получение и размножение новых ценных форм и линий декоративных культур с улучшенными признаками устойчивости к неблагоприятным факторам, повышенной продуктивностью. При микроклонировании наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения генотипов и декоративных форм растений,

ценные характеристики которых сложно сохранить при семенном воспроизведении. Растения-регенеранты белорусской селекции получены с помощью биотехнологических методов в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси Попович Е.А. и в Главном ботаническом саду имени Цицина – Молкановой О.И. [3]. В настоящее время в *in vitro* коллекции рода *Syringa* ЦБС НАН Беларуси представлены 67 сортами *S. vulgaris* L. На стадии получения стерильной культуры находится еще два вида, сорта селекции Л.А. Колесникова и новинки американской селекции. Сегодня все сорта собственной селекции ЦБС введены в культуру *in vitro* как ценнейший материал генетического разнообразия и национального наследия.

В данном исследовании представлены результаты молекулярного генотипирования коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси с целью точной идентификации и сертификации ценных генотипов культуры. Подобные работы были уже проведены с этой культурой [4, 5].

Использованный RAPD+ISSR-подход, широко используемый для различных целей, в т.ч. генотипирования генетических ресурсов, позволяет с наименьшими временными и финансовыми затратами и высокой разрешающей способностью дифференцировать генотипы как на межвидовом, так и внутривидовом уровнях, разрешить спорные таксономические вопросы. В результате разработки алгоритма сертификации генотипов сирени на основе мультилокусного RAPD- и ISSR-маркирования были созданы наборы уникальных для каждого исследованного образца генетических маркеров – генетические паспорта.

Материалы и методы. Для проведения мультилокусного ДНК-маркирования с целью генетической сертификации сортов сирени из коллекции ЦБС НАН Беларуси (табл. 1) были использованы RAPD-ПЦР и ISSR-ПЦР техники.

Образцы тотальной ДНК 21 сорта сирени, полученные нами по модифицированной СТАВ-методике [6] из молодых листьев коллекции *in vivo* и микрорастений коллекции *in vitro*, были использованы для проведения ПЦР с RAPD- и ISSR-праймерами. Продукты ПЦР разделяли методом микрокапиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer (Agilent), фрагментный анализ проводился с использованием программного обеспечения Expert 2100 (Agilent).

Результаты и обсуждение. Необходимым этапом при создании, сохранении и поддержании коллекций *ex situ* и *in vitro*, а также при обмене коллекционными образцами между учреждениями является гармонизация правил содержания коллекций: проведение скрининга коллекционных фондов, выявление и отбор особо ценных таксонов, оценка степени генетического разнообразия таксонов, формирование стержневых коллекций (коллекций, сохраняющих максимальное генетическое разнообразие), паспортизация коллекций, создание базы данных, включающей наряду с морфологическим описанием молекулярно-генетические и биохимические данные по каждому конкретному образцу. Систематизация и документирование коллекции культуры сирени ЦБС НАН Беларуси начато в 2003 г., когда была создана комплексная база

Таблица 1. Сорта белорусской селекции сирени ГНУ ЦБС НАН Беларуси

№	Сорт	х	№	Сорт	х
1.	«Лебедушка»	Абель Шатане	9.	«Полесская легенда»	Людвиг Шпет
		Реомюр			Гиацинтовая
2.	«Павлинка»	Абель Шатане	10.	«Памяти Смольской»	Людвиг Шпет
		Реомюр			Гиацинтовая
3.	«Защитникам Бреста»	Абель Шатане	11.	«Партизанка»	Людвиг Шпет
		Реомюр			Гиацинтовая
4.	«Минчанка»	Абель Шатане	12.	«Танечка»	Гиацинтовая
		Реомюр			Реомюр
5.	«Вера Хоружая»	Абель Шатане	13.	«Константин Заслонов»	Гиацинтовая
		Реомюр			Реомюр
6.	«Хорошее настроение»	Абель Шатане	14.	«Зорка Венера»	Гиацинтовая
		Реомюр			Реомюр
7.	«Лунный свет»	Абель Шатане	15.	«Марат Казей»	Гиацинтовая
		Реомюр			Реомюр
8.	«Белорусские зори»	Людвиг Шпет	16.	«Святязянка»	Гиацинтовая
		Гиацинтовая			Реомюр

Таблица 2. Информативные показатели ДНК-маркеров сортов сирени (*Syringa ssp.*)

Праймер	Длина фрагментов	Число фрагментов	Кол-во полиморфных фрагментов	% полиморфизма
OPA-18	255–1355	17	14	82.35
OPE-02	260–1380	19	12	63.16
OPP-09	260–1485	15	12	80.00
UBC-808	210–950	25	18	72.00
UBC-862	185–960	17	11	64.71
Всего		93 (51 RAPD/42 ISSR)	67	72.04

данных коллекции сирени. В настоящее время ведется создание информационно-поисковой базы данных белорусских *in vitro* коллекций, обеспечивающей эффективное хранение и обработку информации о паспортизированных образцах, что даст основу для расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия.

При проведении молекулярно-генетических работ, начатых с 2005 г., был найден быстрый и простой метод выделения ДНК из листовой ткани сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения полимеразной цепной реакции. Разработанная методическая основа молекулярно-генетического и биохимического документирования коллекционного материала сирени будет продолжена как основа единых требований к держателям коллекций разных ботанических садов, особенно для коллекций *in vitro*. Известно, что изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой, поэтому немаловажным условием стабильного поддержания полученных микрополюгов является контроль и сохранение стабильности генотипа. Такая работа уже начата при сравнении микрклонов, поддерживаемых в коллекциях разных ботанических садов, в частности, сортов «Партизанка» и «Святаянка» из коллекций *in vitro* ЦБС НАН Беларуси и ГБС РАН.

Для исследований внутривидового полиморфизма, с целью генетической сертификации, был применен комплексный подход, основанный на использовании двух методов мультилокусного ДНК-маркирования: RAPD- и ISSR-ПЦР. В ходе предварительного анализа было протестировано 30 RAPD и 20 ISSR праймеров, из которых для дальнейшего исследования были отобраны 3 RAPD (OPA-18, OPE-02, OPP-09) и 2 ISSR праймера (UBC-808, UBC-862). Проведенный анализ позволил выявить 93 ДНК-маркера (51 RAPD и 42 ISSR), из которых 67 были полиморфными; средний уровень полиморфизма составлял 72%. Более подробные характеристики ДНК-маркеров, выявленных у 21 сорта сирени с использованием вышеперечисленных праймеров, представлены в табл. 2.

Использованные праймеры позволили получить четкие воспроизводимые ампликоны, совокупный пул которых для каждого исследуемого сорта характеризовался уникальностью, т.е. обнаруженный полиморфизм между сортами позволял дифференцировать все генотипы. На основании исходных данных мультилокусного ДНК-маркирования по всем пяти праймерам, используя UPGMA кластерный анализ, была построена дендрограмма, отражающая степень генетического сходства использованных в исследовании сортов *Syringa ssp.* (рис. 1). Как видно из дендрограммы, использованные праймеры дают возможность выявить необходимое количество ДНК-маркеров не только для успешной дифференциации вовлеченных в исследование сортов сирени, но и позволяют контролировать сохранение стабильности генотипа растений, полученных при клональном микроразмножении. Так, генетические дистанции между *in vivo* (*vv*) и *in vitro* (*vt*) образцами в парах сортов сирени «Лунный свет», «Павлинка», «Лебедушка», «Защитникам Бреста» и «Жемчужина» минимальные по сравнению с остальными сортами, и на дендрограмме эти пары образцов расположены с наименьшим расстоянием друг от друга (рис. 1).

Проведенный генетический анализ 21 сорта *Syringa ssp.* на основе 3 RAPD и 2 ISSR-праймеров позволил дифференцировать все исследованные генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из сортов (табл. 3 – генетический паспорт сирени сорта «Лунный свет»), рассчитать генетические дистанции сходства, обнаружить уникальные для ряда сортов маркеры. Такие паспорта позволяют не только отличать образцы друг от друга, но и определять степень генетического сходства между ними, выявлять наиболее уникальные генотипы [7], выяснять пути эволюции и распространения диких видов [8, 9], выбирать исходный материал для селекции, следить за генетической чистотой и однородностью сортов, патентовать сорта и защищать авторские права селекционеров [10].

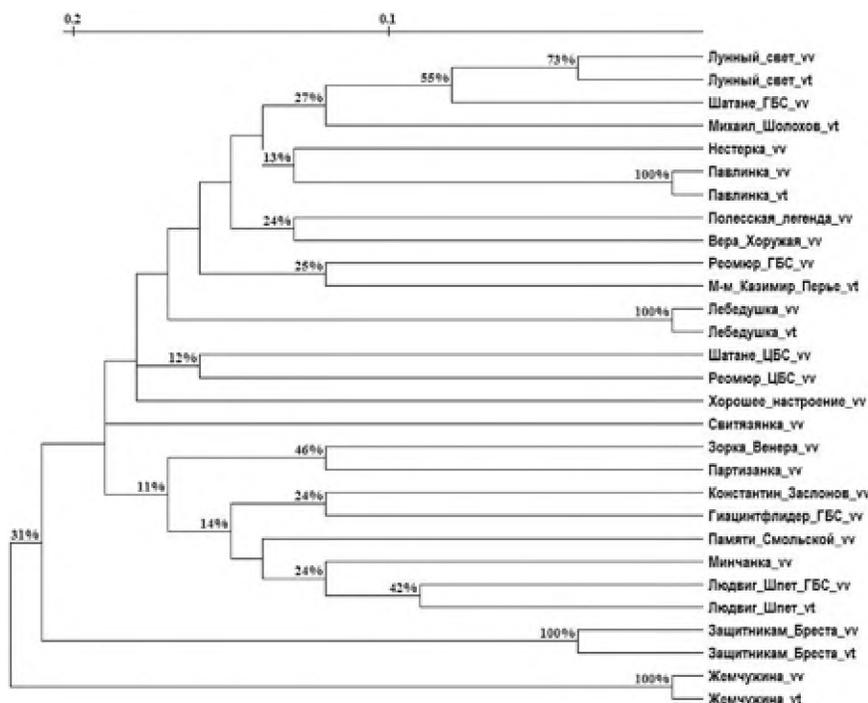


Рисунок 1. Консенсусная RAPD+ISSR дендрограмма, отражающая степень генетического сходства между сортами Syringa spp, полученная на основании 93 маркеров, сгенерированных праймерами OPA-18, OPE-02, OPP-09, UBC-808, UBC-862. Значения Bootstrap указаны над соответствующей ветвью (%)

Таблица 3. Мультилокусный генетический паспорт сорта «Лунный свет» из in vivo коллекции ЦБС НАН Беларуси

«Лунный свет» (in vivo коллекция ЦБС НАН Беларуси)	
Праймеры	Маркеры
	OPA-18 OPA18 _{255'} OPA18 _{355'} OPA18 _{370'} OPA18 _{395'} OPA18 _{590'} OPA18 _{930'} OPA18 _{960'} OPA18 _{1030'} OPA18 _{1225'} OPA18 _{1355'}
	OPE-02 OPE02 _{260'} OPE02 _{270'} OPE02 _{315'} OPE02 _{355'} OPE02 _{415'} OPE02 _{440'} OPE02 _{480'} OPE02 _{495'} OPE02 _{530'} OPE02 _{570'} OPE02 _{650'} OPE02 _{775'} OPE02 _{890'} OPE02 _{945'} OPE02 _{1380'}
	OPP-09 OPP09 _{260'} OPP09 _{365'} OPP09 _{485'} OPP09 _{535'} OPP09 _{610'} OPP09 _{665'} OPP09 _{780'} OPP09 _{875'} OPP09 _{980'} OPP09 _{1350'}
	UBC-808 UBC808 _{210'} UBC808 _{250'} UBC808 _{265'} UBC808 _{330'} UBC808 _{355'} UBC808 _{420'} UBC808 _{440'} UBC808 _{455'} UBC808 _{480'} UBC808 _{525'} UBC808 _{550'} UBC808 _{575'} UBC808 _{585'} UBC808 _{700'} UBC808 _{885'} UBC808 _{950'}
	UBC-862 UBC862 _{185'} UBC862 _{270'} UBC862 _{305'} UBC862 _{335'} UBC862 _{375'} UBC862 _{415'} UBC862 _{450'} UBC862 _{580'} UBC862 _{725'} UBC862 _{925'} UBC862 _{960'}

Выводы

1. Комплексное исследование ботанической коллекции сирени с использованием традиционных и биотехнологических подходов позволяет сохранить и увеличить видовое и сортовое разнообразие коллекции в ботанических садах.
2. Отбор образцов для формирования *in vitro* культуральной коллекции клеток и тканей сирени и поддержание генетической чистоты таксонов проводятся на основе современных молекулярно-генетических методов изучения биоразнообразия растений.
3. Комплексное RAPD+ISSR-генотипирование генотипов сирени коллекции ЦБС НАН Беларуси является эффективным способом молекулярной сертификации культурных форм сирени. Примененный анализ позволил дифференцировать и сертифицировать все исследованные генотипы сирени белорусской селекции, подтвердить данные о родословной сортов, уточнить филогенетические связи между ними.

Список литературы:

1. Деревья и кустарники, розы и сирень. Краткие итоги интродукции. Отв. ред. Н.В. Смольский. – Мн.: Наука и техника, 1986, с. 384.
2. Lilacs: a gardener's encyclopedia. By John L. Fiala, Freek Vrugtman// Timber Press, Jul 18, 2008. – Gardening, p. 416.
3. Молканова О.И. Комплексное изучение видов и сортов рода *Syringa* L. в ГБС РАН и ЦБС НАН Беларуси. // О.И. Молканова, Е.В. Спиридович, Л.Н. Коновалова, Н.Г. Брель, Ю.М. Зинина, В.Н. Решетников// Вестник Удмуртского университета, выпуск 2, с. 66–75.
4. Kochieva E.Z., Ryzhova N.N., Molkanova O.I., Kudryavtsev A.M., Upelniek V.P., Okuneva I.B. The Genus *Syringa*: Molecular Markers of Species and Cultivars// Russian Journal of Genetics. – 2004, V. 40, № 1, p. 30–32.
5. Мельникова Н.В., Борхерт Е.В., Мартынов С.П., Окунева И.Б., Молканова О.И., Упелниек В.П., Кудрявцев А.М. Использование молекулярно-генетических маркеров для верификации коллекций *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.). // Генетика. – Т.45, № 1. – 2009, с. 97–103.
6. Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D., Young J.E., Rogers H.J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses// Biotechniques. – 1999. – V. 27(1), p. 66–68.
7. Глазко В.И., Дубинин А.В., Календарь Р.Н., Глазко Г.В., Шерепитко В.И., Созинов А.А. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров. // Цитология и генетика. – Т. 33. – № 5. – 1999.
8. Gabrielsen T.M., and Brochmann C. Sex after all: high levels of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD markers. // Molecular ecology. – 7, 1998, p. 1701–1708.
9. Eriksen B. and Töpel M.H. Molecular phylogeography and hybridization in members of the circumpolar *Potentilla* sect. *Niveae* (Rosaceae). // American J. of Botany; 93(3). – 2006, p. 460–469.
10. 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 рекомендации. // Минск, 2006.