

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ПАСПОРТИЗАЦИИ КОЛЛЕКЦИИ РОДА *RHODODENDRON* L.

Л.В. ГОНЧАРОВА, кандидат биологических наук

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

О.Ю. БАРАНОВ, кандидат биологических наук

ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», Гомель, Республика Беларусь

А.Н. ЮХИМУК; Е.В. СПИРИДОВИЧ, кандидат биологических наук;

И.К. ВОЛОДЬКО, кандидат биологических наук

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Введение

Несмотря на то, что представители рода *Rhododendron* L. как декоративные растения известны в Европе с середины XVII века, целенаправленная интродукция рододендронов в Беларуси началась лишь в середине 60-х годов прошлого века с создания коллекции этого рода в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси. За прошедший период интродукционные испытания в условиях Беларуси прошли более 90 видов и 20 сортов вечнозеленых, полувечнозеленых и листопадных рододендронов, полученных в виде семян или саженцев из различных ботанических учреждений и, в первую очередь, Германии, Чехословакии, Прибалтики, Украины. На сегодняшний день коллекция рододендронов состоит из 43 видов и 18 сортов зарубежной селекции, в том числе 10 форм находятся в коллекции *in vitro*, для 7 сортов разработана технология клонального микроразмножения.

Систематика рода *Rhododendron* сложна и до сих пор окончательно не разработана. В природе среди чистых видов встречается большое количество естественных гибридов, селекционерами создаются гибриды и сорта, несущие признаки, характерные для различных видов [1, 7].

В настоящее время систематики для определения видов используют не только морфологические и анатомические признаки, но и данные биохимических и генетических исследований, хотя доля последних все еще несоизмерима мала [7]. Такой подход дает возможность систематизировать виды рода *Rhododendron* и разработать естественную классификацию, отражающую не только формовое разнообразие, но и эволюционно-таксономические взаимоотношения видов внутри рода.

Техники маркирования геномов, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), такие как RAPD, AFLP, SSRs, ISSR [2-5, 7, 8, 12] и др. позволяют разрабатывать ДНК-маркеры растительных геномов, которые легко воспроизводить и анализировать. RAPD-метод давно завоевал ведущее место для выявления генетического разнообразия растительного материала. На сегодняшний день RAPD-ПЦР применен для идентификации генетического полиморфизма огромного числа видов растений с различными целями (классификация, идентификация, паспортизация и т.д.) [5]. В связи с тем, что часть коллекции рододендронов Центрального ботанического сада НАН Беларуси формировалась стихийно, и некоторые данные о происхождении тех или иных форм растений утрачены, весьма актуальной является работа по идентификации, паспортизации и систематизации данной коллекции с целью сохранения, дальнейшей селекции и обмена генетическим материалом с другими ботаническими садами и держателями коллекций.

В рамках комплексного подхода к решению этой проблемы начата работа, целью которой стало молекулярно-генетическое маркирование коллекции рододендронов ЦБС НАН Беларуси с использованием RAPD-метода.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования были молодые листья 17 видов рододендронов из коллекции ЦБС НАН Беларуси, список и систематическое положение которых согласно классификации American Rhododendron Society (ARS) представлены в табл. 1. Листья фиксировали в насыщенном растворе NaCl/СТАВ по методике [9] с модификациями [11], что позволяет очистить поверхность листьев от вторичных метаболитов и предотвратить последующее бактериальное загрязнение препаратов ДНК и контаминацию при постановке ПЦР.

Таблица 1

Систематическое положение исследуемых видов рода *Rhododendron*

№	Подрод	Секция	Вид
1.	<i>Hymenantes</i>	<i>Ponticum</i>	<i>Rhododendron fortunei</i> Lindl.
2.			<i>Rhododendron maximum</i> L.
3.			<i>Rhododendron ponticum</i> L.
4.			<i>Rhododendron catawbiense</i> Michx.
5.			<i>Rhododendron smirnovii</i> Trautv.
6.			<i>Rhododendron williamsianum</i> Rehd. et Wils.
7.	<i>Pentanthera</i>	<i>Pentanthera</i>	<i>Rhododendron luteum</i> Sweet.
8.			<i>Rhododendron roseum</i> (Loisel) Rehd.
9.		<i>Rhodora</i>	<i>Rhododendron vaseyi</i> A. Gray
10.			<i>Rhododendron canadense</i> (L.) Torr. var. <i>albiflorum</i>
11.		<i>Sciadorhodion</i>	<i>Rhododendron albrechtii</i> Maxim.
12.			<i>Rhododendron schlippenbaehii</i> Maxim.
13.	<i>Rhododendron</i>	<i>Rhododendron</i>	<i>Rhododendron ambiguum</i> Hemsl.
14.			<i>Rhododendron micranthum</i> Turcz.
15.			<i>Rhododendron mucronulatum</i> Turcz.
16.			<i>Rhododendron sichotense</i> Pojark.
17.	<i>Tsutsusi</i>	<i>Tsutsusi</i>	<i>Rhododendron kaempferi</i> Planch.

ДНК из листьев рододендронов выделяли с использованием СТАВ-метода [6] с модификациями [10] для растений, характеризующихся повышенным содержанием вторичных метаболитов. Чистоту и концентрацию препаратов ДНК определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре марки Agilent 8453 (США), в кварцевых кюветах объемом 1 мл. ДНК растворяли в ТЕ-буфере. Этот буфер использовали в качестве раствора, поглощение которого принимается за ноль. Расчет концентрации проводили на основании закона Бугера-Ламберта-Бера, исходя из того, что одна единица оптического поглощения соответствует концентрации ДНК 50 мкг/мл при длине оптического пути 1 см и использовании ТЕ-буфера как растворителя.

ПЦР проводили в амплификаторе Eppendorf Mastercycler personal (Германия). Для постановки ПЦР были использованы следующие праймеры (в скобках приведены температуры отжига): Oligo 1 – CGTCTGCCCG (43,0), Oligo 2 – GGTCTCTCCC (26,7), Oligo 3 – TCCATGCCGT (37,5), Oligo 8 – CGCCCCATT (44,9), Oligo 11 – TCCCGAACCG (42,0), Oligo 18 – CAATCGCCGT (37,8), Oligo 91 – CCGAACGGGT (41,4), Oligo 94 – GGACGGGTGC (41,5) [3, 12].

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле, окрашивали раствором бромистого этидия. Размеры выявляемых RAPD-зон определяли с помощью программного обеспечения Quantity One (фирма «Biorad», США).

Результаты и обсуждение

Для проведения RAPD-анализа испытано 8 произвольных десятичных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и проценту G-C-пар нуклеотидов, 5 из них характеризовались четкими и воспроизводимыми ПЦР-спектрами и были использованы для дальнейшей работы.

Размер фрагментов амплификации находился в пределах 200-1450 пар нуклеотидов (п.н.). Количество амплифицированных фрагментов варьировало от 10 до 18 в зависимости от праймера. Некоторые праймеры выявили уникальные, присущие только одному конкретному виду ампликоны: у вида *Rh. ambiguum* — Oligo 1 (1200 п.н.); *Rh. canadense* — Oligo 2 (330 п.н.); *Rh. kaempferi* — Oligo 3 (1280 п.н.); *Rh. luteum* — Oligo 11 (1125 п.н.); *Rh. roseum* — Oligo 3 (220 п.н.). Эти уникальные ампликоны могут быть использованы как ДНК-маркеры для идентификации вышеперечисленных видов.

Таким образом, для каждого из 17 исследуемых видов рододендронов получены индивидуальные RAPD-спектры по 5 праймерам. На основании анализа полученных RAPD-спектров были составлены многолокусные генетические паспорта для каждого вида, представляющие собой матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие

в RAPD-спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Многолокусный генетический паспорт исследуемых видов рода *Rhododendron* на основе анализа RAPD-спектров

Праймер	Вид																
	<i>Rh. albrechtii</i>	<i>Rh. ambiguum</i>	<i>Rh. canadense</i>	<i>Rh. catawbiense</i>	<i>Rh. fortunei</i>	<i>Rh. kaempferi</i>	<i>Rh. luteum</i>	<i>Rh. maximum</i>	<i>Rh. micranthum</i>	<i>Rh. mucronulatum</i>	<i>Rh. ponticum</i>	<i>Rh. roseum</i>	<i>Rh. schlippenbaehii</i>	<i>Rh. sichotense</i>	<i>Rh. smirnovii</i>	<i>Rh. vaseyi</i>	<i>Rh. williamsianum</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Oligo 1																	
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
290	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
345	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
400	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
450	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
510	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
615	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
670	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
780	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
840	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
905	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
960	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
1060	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1120	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1310	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1385	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1450	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Oligo 2																	
330	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
455	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
505	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
570	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
645	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
745	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
815	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
865	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
905	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
1050	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
1180	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
1325	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1445	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
Oligo 3																	
220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
300	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
370	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
455	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
530	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
590	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
650	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
700	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
770	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
850	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1070	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
1195	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1280	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1355	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oligo 11																	
405	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
480	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
565	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
625	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
665	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
740	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
875	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
1125	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oligo 94																	
425	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
475	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
510	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
670	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
720	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
790	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
855	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
910	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
980	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
1040	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1090	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1180	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1265	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1
1325	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1450	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Примечание: 1 – присутствие и 0 – отсутствие амплифицированного фрагмента указанной длины (п.н.)

Для более полной молекулярно-генетической характеристики видов рода *Rhododendron* коллекции ЦБС НАН Беларуси и в дальнейшем — для сортов целесообразно будет применение не только RAPD-диагностики, но и других методов ПЦР, что позволит подобрать наиболее рациональные с точки зрения объективности и достоверности получаемых результатов, материальных и временных затрат способы проведения идентификации и систематизации коллекции рододендронов с целью сохранения, селекции и обмена генетическим материалом.

Выводы

Для каждого из 17 исследуемых видов рододендронов получены индивидуальные RAPD-спектры по 5 праймерам, на основании которых были составлены многолокусные генетические паспорта каждого вида. Найлены видоспецифичные уникальные фрагменты, которые могут быть использованы как маркеры для видовой идентификации: *Rh. Ambiguum* – 1200 п.н. (Oligo 1); *Rh. canadense* – 330 п.н. (Oligo 2); *Rh. kaempferi* – 1280 п.н. (Oligo 3); *Rh. luteum* – 1125 п.н. (Oligo 11); *Rh. roseum* – 220 п.н. (Oligo 3).

Список литературы

1. Кондратович Р.Я. Рододендроны. – Рига: Авотс, 1981. – 231 с.
2. Выявление специфических RAPD- и ISSR-фрагментов у соматклонов кукурузы (*Zea mays* L.) и создание на их основе SCAR-маркеров / Осипова Е.С., Ковеза О.В., Троицкий А.В., Долгих Ю.И., Шамина З.Б., Гостимский С.А. // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 12. – С. 1664-1672.
3. Стегний В.Н., Чудинова Ю.В., Салина Е.А. RAPD-анализ разнородных сортов и гибридов льна культурного // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 10. – С. 1370-1373.
4. Awasthi A.K., Nagaraja G.M., Naik G.V., Kanginakudru S., Thangavelu K., Nagaraju J. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays / [BMC Genetics]. – 2004. – режим доступа – <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/5/1>.
5. Christian Schlötterer. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? // Nature reviews. Genetics. – 2004. – Vol. 5. – P. 63-69.
6. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue // Focus. – 1990. – N 12. – P. 13-15.
7. Lanying Zh., Yongqing W., Li Zh. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. – 2008. – V. 3 (4). – P. 626-631.

8. Novy R.G., Kobak C., Goffreda J., Vorsa N. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry *Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh. // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – V. 88, N 8. – P. 1004-1010.
9. Storchova H., Hadlickova R., Chrték J., Tetera M., Fitze D., J. Fehrer. An improved method of DNA isolation from plants collected conserved in saturated NaCl/CTAB solution // *Taxon.* – 2000. – V. 49, N 1. – P. 79-84.
10. Tel-Zur N., Abbo S., Myslabodski D., Mizrahi Y. Modified CTAB Procedure for DNA Isolation from Epiphytic Cacti of the Genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae) // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1999. – V. 17, N 3. – P. 249-254.
11. Thomson J.A. An improved non-cryogenic transport and storage preservative facilitating DNA extraction from «difficult» plants collected at remote sites // *Telopea.* – 2002. – V. 9, N 4. – P. 755-760.
12. Wu J., Krutovski K.V., Strauss N.A. Nuclear DNA diversity, population differentiation and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers // *Genome.* – 1999. – V. 42. – P. 893-908.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.