

УДК:58(476):577.1:577.2

ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ БОТАНИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Решетников В.Н., Спиридович Е.В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Республика Беларусь, г.Минск, ул.
Сурганова 2В, biolog@it.org.by

Documentation of botanic collections with molecular and biochemical markers

Reshetnikov V., Spiridovich H.

Central botanical Gardens of the NAS of Belrus, Minsk, Republic of Belarus, Surganova 2B,
biolog@it.org.by

The integrated approach for the documentation of the unique collections of the Central botanical gardens of NAS of Belarus, based on purposeful biochemical passportisation using molecular and chemo- markers is proposed. Easy and quick methods of DNA isolation from leaf tissue of *Vaccinium corymbosum* L., *Hippophae rhamnoides* L., *Dasiphora fruticosa* and *Syringa vulgaris* L. are developed and optimised. By the example of *Vaccinium corymbosum* L. two methods of PCR-based molecular fingerprinting (RAPD and ISSR) were applied. It was designed the effective primers and optimised the conditions of PCR. The advantages and disadvantages of the applied methods are discussed. The special approach for the collection passportisation on the basis of the spectra of storage proteins and fatty acids composition of the seeds of *Hippophae rhamnoides* L. is suggested for the cultivar passportisation.

Сегодня коллекции живых растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси являются одними из крупнейших не только в нашей Республике, но и за рубежом. Они насчитывают около 9,5 тысяч видов, подвидов, форм и сортов лесообразующих, декоративных, лекарственных, пряно-ароматических, кормовых, оранжерейных и других растений мировой флоры.

Одной из научных задач учреждения является тщательное и всестороннее изучение этого огромного генетического разнообразия. В ЦБС НАН Беларуси процессы, связанные с тестированием генетического разнообразия растений осуществляются с использованием комплекса методических подходов на базе тесного взаимодействия ботаников-кураторов коллекций и специалистов в области биохимии и биотехнологии. Это дает возможность глубоко и всесторонне изучить разнообразие культуры при правильном подборе методов исследования. В основе всех методических подходов лежит принцип максимального охвата всего генетического разнообразия коллекций, включая дикорастущих сородичей, вариантов в культуре *in vitro*, а также генетически модифицированного материала.

Различие по морфологическим признакам до настоящего времени остается главным критерием в систематике растений, при изучении мутационного процесса, в исследованиях филогенетических связей, в селекции. Однако морфологические признаки не всегда обладают полной информативностью, так как на них оказывают сильное влияние условия окружающей среды, и, кроме того, они проявляются чаще всего на определенных стадиях онтогенеза. Поэтому, наряду с морфологическими признаками, широко используется молекулярное маркирование, основанное на полиморфизме белков и нуклеиновых кислот, а также хемосистематика, основанная на анализе вторичных метаболитов [1, 2].

Как показывает мировая практика, значение ДНК-маркеров в настоящее время быстро возрастает, что проявляется в увеличении числа методов анализа ДНК – RFLP, DNA fingerprinting, RAPD, AFLP, STS, DALP, RT-PCR, PCR-ELISA и др. Во Франции, США, Швеции, Италии, Германии, Японии и других странах эти методы широко используются в генетических и селекционных исследованиях древесных, кустарниковых и травянистых растений. Область применения ДНК-маркеров велика и постоянно расширяется для выявления генетического разнообразия; анализа генетического родства отдельных генотипов, сортов, популяций; паспортизации ценных генотипов; идентификации клонов и сортов; построения генетических карт; решения спорных вопросов таксономии; коммерческой сертификации и т.д. [3] Однако, несмотря на все разнообразие методов анализа ДНК, они еще не нашли широкого применения и только последние несколько лет начали широко применяться для паспортизации и оценки генетического разнообразия интродуцированных растений, содержащихся в коллекций ЦБС НАН Беларуси.

Молекулярное маркирование, основанное на определении последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК или аминокислот в белковой молекуле представляют собой мощный и потенциально быстрый метод для изучения и характеристики биологических ресурсов. [4]. Отдел биохимии и биотехнологии растений ЦБС проводит исследовательскую работу по биохимической паспортизации коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси, прежде всего на хозяйственно ценных и высоко-декоративных культурах, таких как, голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) [Ericaceae, Vacciniaceae], облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) [Elaeagnaceae], курильский чай кустарниковый (*Dasiphora fruticosa*) [Rosaceae], сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) [Oleaceae].

В ходе работы с перечисленными культурами применялся комплекс молекулярно биологических и биохимических методов. Для решения поставленных целей в работе ставилась задача сравнить несколько методов молекулярного анализа с использованием ДНК маркеров, RAPD и ISSR, белкового состава и хемомаркеров для целей паспортизации и идентификации растительного материала.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис.1-RAPD-спектры в агарозном геле разных сортов голубики высокой по праймеру Oligo 10

(1 ? Bleutta; 2? Bluecrop, 3? Dixi, 4? Woodart, 5? Croatan, 6? Weymouth, 7? Jersey, 8? Bleuray, 9? Duke, 10? Patriot, 11- Caroline blue; 12- Herbert; 13- Delite; 14- Rancocas;

15- Bluerose; 16- Hardyblue; 17- Stanley; 18 – Earliblue; 19- Coville; 20- Nelson)

При анализе коллекционных сортов и климатипов облепихи и сортов голубики высокой, а также линий и сортообразцов курильского чая кустарникового, было показано, что оба метода, основанные на ПЦР, позволяют различать исследуемые образцы внутри каждого из видов, однако эффективность методов оказалась различной. Так, информативность, т. е. количество информативно значимых, полиморфных, маркеров в пересчете на праймер или на одну ПЦР, ISSR-анализа оказалась более чем в 4 раза выше, чем RAPD-диагностика связи с большей разрешающей способностью, что иллюстрирует (рис. 1 и 2). Эти преимущества ISSR, компенсируют техническую сложность электрофореза в длинных полиакриламидных гелях (ПААГ) и окрашивания их серебром (для RAPD, в большинстве случаев уместно использовать агарозные гели и этидиум бромид в качестве красителя).

Определенную трудность в обоих случаях представляет стандартизованное документирование результатов, т.е. составление молекулярных паспортов растительных образцов, что связано со сложностью точного определения размеров ДНК-ампликонов и учета наличия/отсутствия маркера. Поэтому в молекулярных паспортах важно не только

приводить характеристики самих ДНК-маркеров, но и указывать точные условия ПЦР и электрофореза (которые следует строго воспроизводить в каждом эксперименте), а также депонировать в базе данных по паспортизации цифровые имиджи электрофорезов с каждым из праймеров. При идентификации неизвестных образцов визуальный сравнительный анализ имиджей гелей имеет, на наш взгляд, первостепенное значение.

Рис. 2. – ISSR– спектры в ПААГ продуктов амплификации ДНК 9 сортов голубики высокой с праймером UBC-818. Размеры ДНК стандартов указаны слева в парах нуклеотидов (п. н.). Контроль - ПЦР-смесь без добавления ДНК матрицы.

Выяснение филогенетических отношений между популяциями, например, редких и охраняемых растений, представляет собой важную задачу для фундаментальных исследований, и может эффективно решаться сочетанием двух методов ДНК-амплификации, использованных в данной работе. Однако, себестоимость такого анализа высока, что сужает сферу его применения для решения самых острых проблем систематики и охраны биологических видов.

Особый подход в паспортизации на основе состава запасных белков и жирных кислот был применен для видов и разновидностей облепихи. На основе коллекционных сортов облепихи крушиновидной был проведен сравнительный анализ по компонентному составу и молекулярной массе (М.м.) запасных белков семян. На полученных электрофоретических спектрах белков семян исследуемых сортов облепихи (рис. 3), в том числе и по данным денситометрического анализа насчитывается около 70 зон полипептидов с молекулярной массой от 19 до 130 кДа. При сравнительном анализе отдельных сортов облепихи между собой показано, что в целом белковые спектры характеризуются идентичным компонентным составом. Отличия отмечены только по некоторым белковым зонам и по группе компонентов с М.м. от 60 до 80 кДа. Так, для сорта Ботанический характерна экспрессия минорного компонента с М.м. 72 кДа, который отсутствует в спектрах других сортов. В то время как для всех образцов характерно присутствие полипептида с М.м. 84 кДа, то в семенах облепихи сорта Памяти Индиры Ганди этот компонент двойной – с М.м. 84 и 85 кДа. А для полипептида с М.м. 53,5 кДа в этом же сорте характерно то, что он одинарный, в отличие от образцов всех остальных сортов, где данный компонент двойной – 53 и 53,5 кДа. Как уже было сказано выше, наибольшим полиморфизмом как в количественном, так и в качественном составе характеризуется полипептидные зоны с М.м. от 60 до 80 кДа. При детальном сравнительном анализе показано, что эта группа компонентов является индивидуальной для каждого из исследованных на полиморфизм по М.м. образца белков семян различных сортов облепихи.

Рис. 3. – ДСН гель–электрофорез (16%) запасных белков семян сортов облепихи (молекулярные массы стандартов указаны в кДа). 1 – Ароматная; 2 – Ботаническая; 3 – Трофимовская; 4 – Памяти Индиры Ганди; 5 – северо-кавказский климатип; 6 – Витаминная; М – маркерные белки

Как показали в наши исследования, гетерогенность солерастворимых белков семян облепихи позволяет успешно различать сорта этой культуры, и может быть использован как экспресс-тест для сортовой идентификации. Однако предварительно необходимо создать базы данных по белковым профилям семян уже известных сортов.

При сравнении разнообразия в накоплении жирных кислот между отдельными сортами и климатипами облепихи отмечено, что наиболее значимые отличия наблюдались в жирнокислотном составе кожицы облепихи (рис. 4). Так, образцы северо-кавказского и сибирского климатипов отличались пониженным содержанием пальмитолеиновой кислоты (10,93 и 14,99% соответственно), а сорта св. Ароматная и св. Отрадная - ее наибольшим содержанием (36,68 и 37,57% соответственно). Сорта св. Трофимовская, св. Любительская и св. Ароматная характеризовались низким содержанием олеиновой кислоты (18:1). В кожице

плодов сорта *св. Безколючковая*, а также сибирского, прибалтийского и северо–кавказского климатипов обнаружено лишь небольшое количество линолевой кислоты (4,9–7,3%) .

На наш взгляд, сведения по белковым и хемо-маркерам дополняют информацию, полученную с использованием методов ДНК-амплификации, однако являются достаточно сложными по воспроизведению. Не всегда возможно полностью воспроизвести условия выращивания, сроки сбора семян, условия и продолжительность хранения, повторить в точности экстракцию анализируемых компонентов, что негативно сказывается на качестве анализа. Напротив, очищенная ДНК высоко стабильна и может храниться продолжительное время без изменения качественного состава. Кроме того, образцы для ее выделения доступны круглогодично и могут быть получены из растительных объектов, не достигших стадии плодоношения или видов, вообще не образующих семян. Последнее преимущество имеет первостепенное значение при анализе вегетирующих тканей и органов растений. Тем не менее, данные полученные с использованием любых маркеров (включая белковые и хемомаркеры), полезны и должны обязательно присутствовать в паспорте сорта.

Рис. 4. – Жирнокислотный состав кожицы облепихи крушиновидной (22,39%). 1– северо–кавказский климатип, 2– *св. Трофимовская*, 3– сибирский климатип, 4– *св. Безколючковая*, 5– *св. Любительская*, 6–*св. Ароматная*, 7 – *св. Обильная*, 8 – *св. Самородок*, 9–*св. Улыбка*, 10– *св. Отрадная*, 11–прибалтийский климатип

Выводы: Предлагается комплексный подход документирования уникальных коллекций ЦБС НАН Беларуси, основанный на направленной целевой биохимической паспортизации с помощью молекулярных и хемомаркеров. Разработаны быстрые и простые методы выделения ДНК из листовой ткани голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), облепиха крушиновидная (*Hipporhae rhamnoides* L.), курильский чай кустарниковый (*Dasiphora fruticosa*), сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.). На примере голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) применено два метода молекулярного маркирования, основанных на полимеразной цепной реакции (RAPD и ISSR). Для этой культуры подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения полимеразной цепной реакции, показаны преимущества и недостатки примененных методов. Обсуждается особый подход в паспортизации на основе состава запасных белков и жирных кислот в семенах облепихи и их использования для решения задач паспортизации.

Литература

1. Spooner D. Molecular markers for genebank management /D. Spooner, R. van Treuren and M. C. de Vicente. Rome: IPGRI Technical Bulletin. N 10, 2006. 128 p. I200
2. Гааль Э., Медьши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.
3. Which DNA Marker for Which Purpose?: Final Compendia of the Research Project /Institut fur Forstgenetik und Forstpflanzenzuchtung, Universitat Gottingen; E.M.Gillet (ed.).– Gottingen, 1999. 253 p.
4. Ford-Lloyd, B. Measuring genetic variation using molecular markers. Ford-Lloyd B., Painting K. Rome: IPGRI, 1996. 72 p.