

УДК 635.051; 575.22

UDC 635.051; 575.22

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ СИСТЕМАТИЗАЦИИ
И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ
РАСТЕНИЙ РОДА RHODODENDRON**

**ESTIMATION OF THE ISSR-MARKERS
APPLICATION FOR SYSTEMATIZATION AND
GENETIC CERTIFICATION OF GENUS
RHODODENDRON**

Новикова Анна Александровна
магистр

Novikova Anna Aleksandrovna
master

Шейкина Ольга Викторовна
к.с.-х.н., доцент

Sheikina Olga Viktorovna
Cand.Agr.Sci., associate professor

Новиков Петр Сергеевич
аспирант

Novikov Petr Sergeyevitch
postgraduate student

Доронина Галия Ульфатовна
к.б.н., доцент
*Поволжский государственный технологический
университет, Йошкар-Ола, Россия*

Doronina Galiya Ulfatovna
Cand.Biol.Sci., associate professor
*Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola,
Russia*

На основе анализа генетической близости 25 различных видов и внутривидовых таксонов показана возможность использования ISSR маркеров для систематики и генетической паспортизации растений рода *Rhododendron*. Предложен способ записи генетического паспорта растения на основе размеров ампликонов

The possibility of the ISSR-markers application for systematization and genetic certification of the genus *Rhododendron* is showed on the basis the research of 25 species and intraspecific taxons. The way of recording of genetic passport on the basis of amplicons size is suggested

Ключевые слова: РОДОДЕНДРОН, ISSR-МАРКЕРЫ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ, СИСТЕМАТИКА

Keywords: RHODODENDRONS, ISSR-MARKERS, GENETIC CERTIFICATION, TAXONOMY

Введение. Рододендрон (*Rhododendron*) – обширный род семейства вересковые, с более чем 1000 видов вечнозелёных, полувечнозеленых и листопадных кустарников и деревьев, представляющий из себя группу растений, для которых не существует простого или универсального способа различать разные виды и внутривидовые таксоны.

Систематика рода *Rhododendron* сложна и до сих пор окончательно не разработана. Определенного числа видов рода Рододендрон в литературе не указывается, так как в настоящий момент отсутствует единая общепринятая классификационная схема таксона, что объясняется объемом рода и наличием у его представителей большого количества

конвергентных морфологических признаков, осложняющих построение естественных систем.

Систематика осложняется тем, что в природе среди чистых видов встречается большое количество естественных гибридов, селекционерами создаются гибриды и сорта, несущие признаки, характерные для различных видов [1, 2]. Мнения исследователей о количестве видов существенно различаются, и разные авторы выделяют от 200 до 1300 видов [3].

В настоящее время систематики для определения видов используют не только морфологические и анатомические признаки, но и данные биохимических и генетических исследований. В последнее десятилетие, наряду с традиционными приемами исследований, все более широкое использование получают молекулярно-генетические методы, с применением которых созданы ДНК-банки ценных, редких и исчезающих видов растений, проводятся исследования по изучению внутривидовой изменчивости сохраняемых объектов, уточнению спорных вопросов их систематики и классификации, разработке методик генетической паспортизации популяций и исследованию генетической стабильности хранящихся таксонов [4, 5].

В то же время существует проблема паспортизации сортов культурных растений на уровне генов, которая является весьма актуальной в связи с усиливающимся вниманием к правовой охране селекционных достижений. Если до принятия Закона РФ «О селекционных достижениях» правовая охрана селекционных достижений осуществлялась аналогично правовой охране изобретений, то принятие указанного закона выделило селекционные достижения в качестве самостоятельного объекта

интеллектуальной собственности с закреплением специфического режима правовой охраны [6].

Современные аналитические способы исследования специфичности биологических макромолекул позволяют на новой основе решить проблему идентификации растений и их генотипов, а также ряд вопросов, касающихся охраны прав собственности на селекционные достижения, сохранения и реализации сортов, контроля безопасности материала (наличие вирусов) и т.п. [7].

ISSR-метод используется для выявления генетического разнообразия растительного материала, для идентификации генетического полиморфизма видов растений с различными целями (классификация, идентификация, паспортизация и т.д.) [2]. Он был успешно использован для оценки степени генетического разнообразия, идентификации и паспортизации на меж- и внутривидовом уровне в широком диапазоне видов сельскохозяйственных культур, которые включают рис [8], пшеницу [9], просо [10], виноград [11], картофель [12] и подорожник [13]. Также он применялся при оценке генетического разнообразия какао [14], ели Дугласа и Суджи [15] грибов [16], растений семейства норичниковые [17], сосны обыкновенной [18, 19, 20] и рододендрона канадского [21, 22]. Такое широкое использование данного вида маркеров обусловлено рядом преимуществ перед другими маркерными системами [23, 24, 25, 26], что несомненно делает его весьма перспективным для научной практики.

Цель работы – оценить возможность применения ISSR-маркеров для систематизации и паспортизации видов и внутривидовых таксонов растений рода *Rhododendron*.

Материалы, методы и объекты исследований. Объектом для исследований являлись 25 видов и внутривидовых таксонов растений рода *Rhododendron*, представленные в коллекции Ботанического сада ПГТУ (табл.1).

Таблица 1. – Список исследованных образцов растений рода *Rhododendron*

Виды	
Rh. canadense - Р. канадский	Rh. viscosum - Р. клейкий
Rh. canadense var. album - Р. канадский разн. белопетковая	Rh. sclippenbachii - Р. шлиппенбаха
Rh. japonicum - Р. японский	Rh. albrechtii - Р. альбрехта
Rh. japonicum var aureum - Р. японский разн. золотистая	Rh. molle - Р. мягкий
Rh. calendulaceum - Р. ноготковидный - типичный	Rh. Ledebourii - Р. Ледебур (из природы)
Rh. calendulaceum - Р. ноготковидный - определен по морфологическим признакам в ботаническом саду	Rh. catawbiense - Р. катевбинского
	Rh. aureum georgi - Р. золотистый
Rh. arborescens - Р. древовидный	Rh. vaseyi - Р. вазея
Rh. luteum - Р. желтый	Rh. Ledebourii - Р. Ледебур (культурно-семенной репродукции)
Rh. luteum * - Р. желтый сизолиственный	Гибрид Р. кавказского (Rh. caucasicum)
Сорта	
Rh. 'Roseum Elegans'	Rh. 'Silver Queen'
Rh. 'Impeditum Ramapo'	Rh. 'Geisha Purple'
Rh. 'Toreador'	Rh. 'Helsinki University'

Выделение суммарной ДНК производилось по протоколу Doyle J.J. and Doyle J.L. [21]. В качестве исходного материала для выделения ДНК были взяты молодые листья и почки. Для анализа были взяты 7 полиморфных ISSR праймеров (табл. 2).

Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мкл ПЦР-буфера; 0,2 мкл 10Мм dNTPs; 0,1 мкл 100 мкМ праймера; 1 мкл образца ДНК; 0,1 мкл Taq-полимеразы (2 ед/мкл); 7,6 мкл воды. Для проведения реакции использовали набор реактивов «Encyclo PCR kit» (Evrogen).

Таблица 2.– Характеристика использованных ISSR праймеров

№	Праймер	Секвиенс	Температура отжига (T _m), °C
1.	(CA) ₆ RY	CACACACACACAATGC	60
2.	(CA) ₆ AG	CACACACACACAAGG	60
3.	(CA) ₆ GT	CAC ACA CAC ACA GT	60
4.	(CA) ₆ AC	CAC ACA CAC ACA AC	60
5.	(AG) ₈ T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	60
6.	(GA) ₈ T	GAG AGA GAG AGA GAG AT	60
7.	(AG) ₈ YT	AGA GAG AGA GAG AGA GGC T	60

Примечание: R обозначает A и T, Y обозначает G и C, соответственно.

Режим амплификации: 5 мин денатурация при 94°C (горячий старт), 0,5 мин денатурация при 94°C, 45 сек отжиг при 60°C, элонгация 45 сек при 72°C, 7 мин достройка при 72°C, 45 циклов амплификации. Реакции проводили в тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл (QSP) на амплификаторе MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler – BIO-RAD, США.

Электрофорез проводили в агарозных гелях с концентрацией агарозы 1,5%. Разделение проводили в электрофорезной камере PowerPacTM Universal (BIO-RAD) в TBE буфере (0,89 М Трис-ОН, 0,89 М борная кислота, 50 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия в течение 3-3,5 часов при напряженности электрического поля 70 V.

Визуализацию ДНК, обработку и анализ полученных изображений проводили с помощью системы гель-документации GelDoc 2000 (BIO-RAD) с использованием программного пакета Quantity One® Version 4.6.3.

Наличие амплифицированных фрагментов ДНК в гелях устанавливали по интенсивности окраски. Для дальнейшего определения длины амплифицированных фрагментов ДНК в крайние дорожки геля вносили стандарт, в качестве которого служит ДНК-маркер с фрагментами известной длины. В исследованиях в качестве стандарта использовался ДНК – маркер 100bp+1,5kb+3,0к производство СибЭнзим (Россия).

ISSR профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Для создания матрицы характеризующей генетические

профили исследуемых образцов использовали программу BioImage Geles. Впоследствии эту матрицу анализировали в среде STATISTICA 8.0 методом кластерного анализа с целью определения генетического взаимоотношения изученных видов и внутривидовых таксонов.

Результаты и обсуждение. Анализ полученных электрофореграмм показал. Что изученные образцы имеют различия по ISSR фрагментам ДНК (рис. 1).

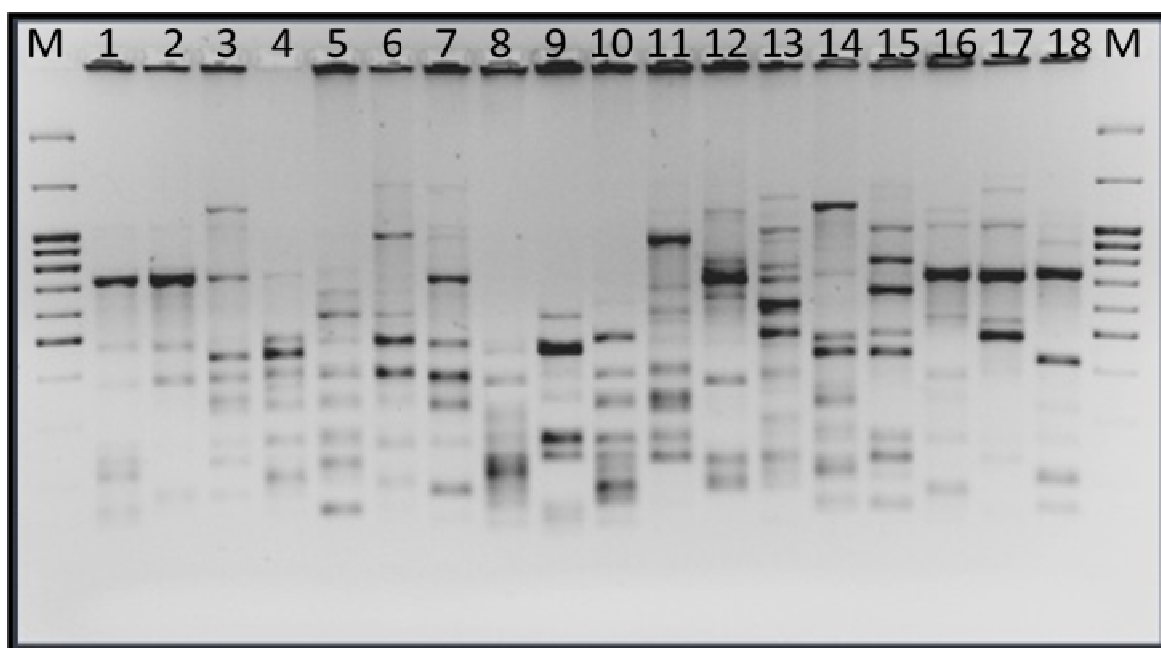


Рисунок 1 – Результат ПЦР-детекции ДНК растений с праймером - (СА)₆АС
1-18 – номера анализируемых образцов, М – маркер молекулярного размера 100bp+3,0к
(СибЭнзим).

Используемые праймеры дали широкий диапазон вариаций количества и длин амплифицируемых фрагментов ДНК (табл. 3). Отдельные праймеры у разных образцов позволили идентифицировать от 1 до 16 фрагментов, а их длина варьировала от 130 до 2170 пар нуклеотидов.

Анализ генетического взаимоотношения включенных в анализ представителей рода *Rhododendron* был выполнен путем построения дендрограммы сходства генотипов в среде STATISTICA 8.0 методом кластерного анализа (рис.2).

Таблица 3. – Результаты ISSR анализа

Праймеры	Диапазон вариаций у проанализированных образцов	
	количества фрагментов ДНК	длины амплифицируемых фрагментов, п.н.
(CA)6RY	2-12	130-1460
(CA)6AG	1-13	130-1820
(CA)6GT	1-15	130-2170
(CA)6AC	1-14	160-1280
(AG)8T	1-14	170-910
(GA)8T	1-12	200-1310
(AG)8YT	1-16	150-1500

Все изученные представители рода *Rhododendron* разделились на 2 крупных кластера (рис.2). При этом по результатам анализа была подтверждена генетическая близость некоторых видов и их разновидностей, предварительно определенная по морфологическим признакам:

- *P.* канадский (*Rh. canadense*) - и *P.* канадский разн. белоцветковая (*Rh. canadense var. album*);
- *P.* японский (*Rh. japonicum*) - и *P.* японский разн. золотистая (*Rh. japonicum var. aureum*);
- *P.* желтый (*Rh. luteum*) - и *P.* желтый сизолистный (*Rh. luteum**).

В то же время было установлено, что два представителя *P.* ноготковидного (*Rh. calendulaceum*) – типичный и отнесенный в ботаническом саду к данному виду по морфологическим признакам – оказались в разных группах, так как имеют различия по ISSR участкам ДНК. Это может быть объяснено тем, что между разными видами рододендронам достаточно часто возникают естественные гибриды и, вероятно, *P.* ноготковидных отнесенный к данному виду по морфологическим признакам является одним из таких спонтанных гибридов.

Так же было установлено, что дикий из природы Р. Ледебура (*Rh. Ledebourii*) и растение этого вида культурно-семенной репродукции имеют существенные различия в геноме по ISSR участкам ДНК. Это может свидетельствовать о том, что селекционная деятельность приводит к значительным изменениям генома растения и все полученные сорта будут иметь свой уникальный генетический паспорт.

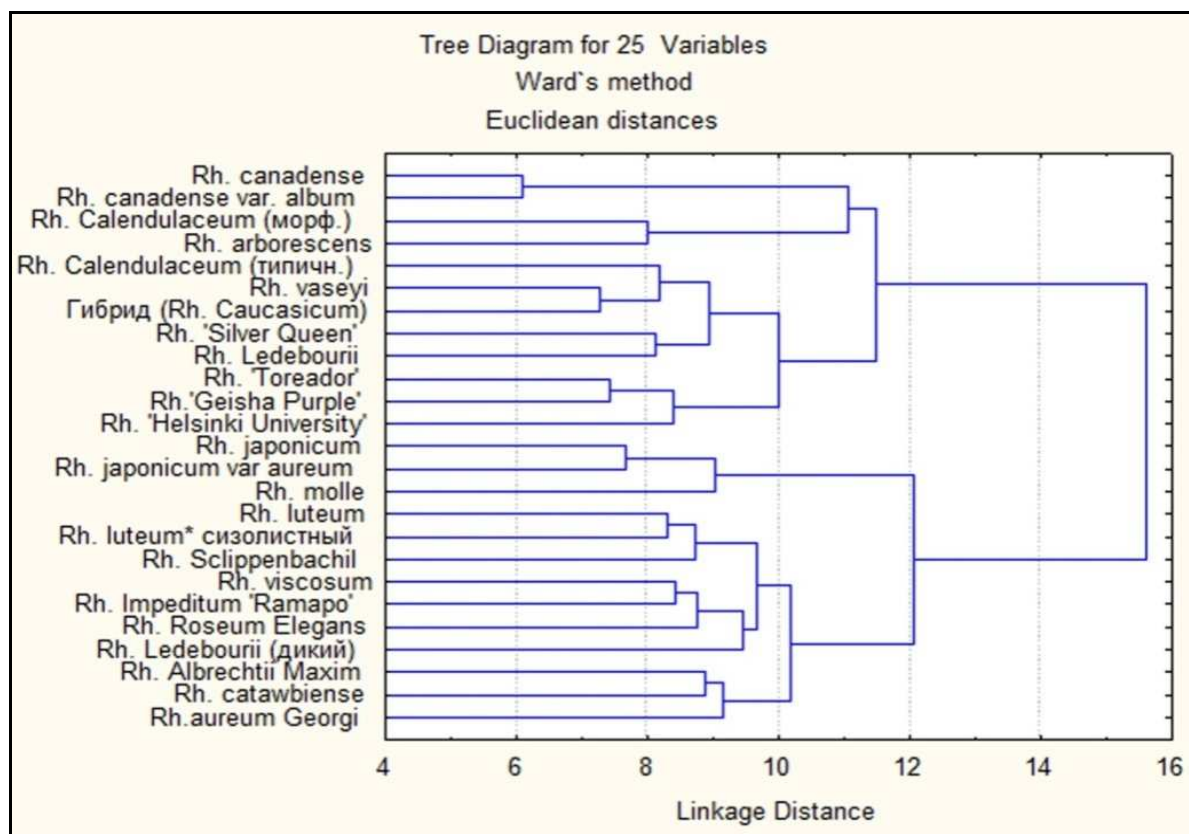


Рисунок 2. – Дендрограмма сходства генотипов видов и внутривидовых таксонов растений *Rhododendron* по ISSR фрагментам ДНК

На основе размеров амплифицированных ISSR-фрагментов ДНК были составлены генетические паспорта изученных растений, которые представлены в виде генетических формул. Генетическая формула содержит сведения об использованном методе, праймерах и обнаруженных у изучаемого образца амплифицированных фрагментах ДНК.

Так, например, для *Rh. canadense* генетическая формула выглядит

следующим образом:

ISSR / (CA)6RY – 152, 164, 214, 238, 376, 488, 739, 1067 / **(CA)6AG** – 151, 195, 320, 379, 559, 616 / **(CA)6GT** -133, 148, 188, 253, 300, 336, 349, 414, 577, 1074 / **(CA)6AC** – 165, 357, 394, 432, 533, 679, 804, 864, 932, 1109, 1189 / **(AG)8T** – 299 / **(GA)8T** - 255, 268, 327, 343, 414, 457, 516, 554, 621, 663, 723 / **(AG)8YT** – 194, 229, 289, 315, 375, 380, 487, 622, 684, 784, 1104

Подобный паспорт можно составить не только для одного генотипа, но и для их совокупности (формы, сорта, популяции). Однако для этого следует проанализировать значительное количество растений и выявить ампликоны, соответствующие всей совокупности. Такие паспорта могут стать основой в деле правовой охраны селекционных достижений.

Выводы.

Экспериментальные исследования показали, что предложенные для изучения систематики и генетической паспортизации ISSR-праймеры достаточно полиморфны и могут быть использованы в качестве инструмента для идентификации видов и внутривидовых таксонов растений рода *Rhododendron*, а так же в селекционном процессе при подборе пар для скрещивания на основе генетической близости. ISSR анализ так же является надежным инструментарием для составления генетических паспортов растений, что может быть использовано в области правовой охраны селекционных достижений.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.132.21.1767) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».

Список литературы:

1. Кондратович Р.Я. Рододендроны. – Рига: Авотс, 1981. – 231 с.
2. Lanying, Zh. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis / Lanying Zh., Yongqing W., Li Zh. // *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* – 2008. – V. 3 (4). – P. 626-631.
3. Yang, H.B. *Flora of China* / Yang, H.B., R.Z. Fang and C.L. Jin // Beijing: Science Press. – 1999. – V. 57.
4. Журавлев, Ю.Н. Молекулярные маркеры для сохранения редких видов растений Дальнего Востока / Журавлев, Ю.Н., Корень О.Г., Музарок Т.И. и др. // *Физиология растений.* – 1999. – Т. 46. – № 6. – С.953-964.
5. Артюкова, Е.В. Исследование генетической изменчивости *Iris setosa* / Артюкова Е.В., Козыренко М.М., Илюшко М.В. и др. // *Молекулярная биология.* – 2001. – Т. 35. – № 1. – С. 152-156.
6. Мерзликина. Р. А. Проблемы определения правового статуса авторов селекционных достижений / Р.А. Мерзликина, В.А. Савченко // *Труды юридического факультета СевКавГТУ: Сборник научных трудов. Выпуск 2.* – Ставрополь: СевКавГТУ, 2004. – 216 с.
7. Awasthi, A.K. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays / Awasthi, A.K., Nagaraja G.M., Naik G.V. et al. // *[BMC Genetics].* – 2004
8. Joshi, S.P. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* / Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar & D.S. Brar // *Theor Appl Genet.* – 2000. – 100: 1311–1320.
9. Nagaoka, T. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers / Nagaoka, T. & Y. Ogihara // *Theor Appl Genet.* – 1997. – 94: 597–602.
10. Salimath, S.S. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers / Salimath, S.S., A.C. de Oliveira, I.D. Godwin & J.L. Bennetzen // *Genome.* – 1995. – 38: 757–763.
11. Ajibade, S.R. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna* / Ajibade, S.R., N.F. Weeden & S.M. Chite // *Euphytica.* – 2000. – 111: 47–55.
12. Huang, J. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA / Huang, J. & S.M. Sun // *Theor Appl Genet.* – 2000. – 100: 1050–1060.
13. Wolff, K. PCR markers distinguish *Plantago* major subspecies / Wolff, K. & M. Morgan-Richards // *Theor Appl Genet.* – 1998. – 96: 282–286.
14. Charters, Y.M. The use of self-pollinated progenies as ‘in-groups’ for the genetic characterization of cocoa germplasm / Charters, Y.M. & M.J. Wilkinson // *Theor Appl Genet.* – 2000. – 100: 160–166.
15. Tsumura, Y. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) / Tsumura, Y., K. Ohba & S.H. Strauss // *Theor Appl Genet.* – 1996. – 92: 40–45.
16. Hantula, J. Random amplified microsatellites (RAMS)- a novel method for characterizing genetic variation within fungi / Hantula, J., M. Dusabenyagasani & R.C. Hamelin // *Eur J for Path.* – 1996. – 26: 159–166.

17. Wolfe, A.D. Assessing hybridization (in natural population of *Pestemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers / A.D.Wolfe, Q.Y. Xiang, S.R. Kephart // *Mol Ecol.* – 1998. - №7. – P. 1107-1125.
18. Hui-yu, L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers / L. Hui-yu, J. Jing, L. Gui-feng at al. // *Journal of Forest Reseach.* – 2005. – V. 16. - № 3. – P. 216-218.
19. Новиков, П.С. Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной на архиве клонов по ISSR-маркерам / П.С. Новиков, О.В. Шейкина, Т.Н. Милютина // *Вестник МарГТУ. Серия «Лес. Экология. Природопользование»*, 2011, №3 (13), С. 82-87.
20. Новиков, П.С. Подбор ISSR-праймеров для фрагментного анализа ДНК сосны обыкновенной / П.С. Новиков, Т.Н. Милютина, О.В. Шейкина // *Сборник материалов международной молодежной научной конференции по естественнонаучным и техническим дисциплинам «Научному прогрессу - творчество молодых»*, 15-16 апр. 2011: в 3 ч. - Йошкар-Ола: Марийский государственный технический университет, 2011. - Ч. 3. -С. 35-36.
21. Яковлева. А. А. Характеристика Рододендрона канадского (*Рододендрон l.- r.canadense var. album*) по ISSR фрагментам ДНК / А. А. Яковлева, П. С. Новиков, О. В. Шейкина // *Научному прогрессу – творчество молодых: сборник материалов Международной молодежной научной конференции по естественнонаучным и техническим дисциплинам.- Йошкар-Ола: Марийский государственный технический университет, 2011.-Ч.3.-с.61-63.*
22. Яковлева. А. А. Методика генетической паспортизации сортов растений на примере рода *Phododendron* / А. А. Яковлева. П. С. Новиков, О. В. Шейкина [и др.] // *Россия в глобальном мире: вызовы и перспективы развития. Четырнадцатые Вавиловские чтения: материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции с международным участие.* - Йошкар-Ола: Марийский государственный технический университет, 2011.-Ч.2.-с.369-370.
23. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification / Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda // *Genomics.* – 1994. – 20: 176–183.
24. Gupta, M. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats / Gupta, M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson & J.L. Owen // *Theor Appl Genet.* – 1994. – 89: 998–1006.
25. Wu, K. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning / Wu, K., R. Jones, L. Dannaeburger & P.A. Scolnik // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – 22: 3257–3258.
26. Meyer, W. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans* / Meyer, W., T.G. Mitchell, E.Z. Freedman & R. Vilgays // *J Clin Microbiol.* – 1993. – 31: 2274–2280.
27. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / Doyle J.J. and Doyle J.L. // *Phytochem. Bull.* – 1987. – 19: 11-15.