

УДК 575.174.015.3:582.931.4

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЕРИФИКАЦИИ КОЛЛЕКЦИЙ *in vitro* СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Syringa vulgaris* L.)

© 2009 г. Н. В. Мельникова<sup>1</sup>, Е. В. Борхерт<sup>1</sup>, С. П. Мартынов<sup>3</sup>, И. Б. Окунева<sup>2</sup>,  
О. И. Молканова<sup>2</sup>, В. П. Упелниек<sup>1</sup>, А. М. Кудрявцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991;  
e-mail: kudryav@vigg.ru

<sup>2</sup>Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва 127276

<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург 190000

Поступила в редакцию 19.02.2008 г.

Для проверки сортового соответствия *in vitro* коллекции сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.) использовали RAPD-анализ. Были исследованы спектры 46 образцов (микрклонов и соответствующих им сортов-стандартов) по 16 десятинуклеотидным праймерам. Показано, что достаточно часто RAPD-спектры микрклона и соответствующего ему сорта-стандарта не идентичны по компонентному составу, и это не позволяет проводить оценку сортового соответствия образцов коллекции прямым сравнением их RAPD-спектров со спектрами стандартов. В связи с чем предложен метод проверки *in vitro* коллекций сирени, основанный на анализе относительных генетических расстояний между проверяемыми образцами (микрклонами) и известными сортами.

В умеренной климатической зоне сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) является одним из наиболее популярных декоративных кустарников [1]. В настоящее время создано более 2000 сортов этой культуры [2]. Однако многие ценные генотипы имеются только в коллекциях ботанических садов (сирингариях) и в связи с трудностью их размножения часто представлены единичными экземплярами [3]. Это обстоятельство существенно повышает риск их утери.

Одним из наиболее эффективных путей сохранения и использования существующего биоразнообразия сирени является создание генетических банков. Согласно классификации Международного центра генетических ресурсов, различают следующие их виды: 1) генетические банки семян; 2) банки растительного материала *in vitro* (культуры меристем, тканей сеянцев в условиях замедленного роста); 3) полевые генные банки (специальные, обычно клоновые посадки корневых, клубневых и плодовых культур и лесных пород [4]. Для трудно размножаемых традиционными способами растений (сирень относится к таковым, в первую очередь) предпочтительнее создание и поддержание коллекции банка культур *in vitro*. В настоящее время актуальность содержания коллекций с использованием культуры изолированных тканей и органов не вызывает сомнений. В основе принципа лежит способность поддержания жизнеспособности растений или их отдельных органов [5]. При размножении большинства таксонов *in vitro* обычно исполь-

зуется метод активации уже существующих в растениях пазушных меристем. Именно этот подход положен в основу промышленного размножения большинства видов растений [4, 6]. Кроме того, использование именно такого подхода считается наиболее надежным с точки зрения генетической стабильности размножаемых форм [4]. Однако необходимо проводить работу по контролю и поддержанию генетической чистоты в создаваемых коллекциях, поскольку вероятность возникновения соматоклональной изменчивости и разного рода механических ошибок при размножении *in vitro* все же не исключена. Выявление таких ошибок на стадии культуры в пробирке невозможно из-за отсутствия выраженных фенотипических проявлений у регенерантов. Именно поэтому особенно привлекательно использование методов идентификации регенерантов, основанных на принципах генетического маркирования. В настоящее время род *Syringa* и его представители, в частности сирень обыкновенная, в генетическом плане изучены недостаточно. Поэтому в качестве первого этапа генетических исследований был выбран RAPD-анализ (Random Amplified Polymorphic DNA) [7], не требующий большой предварительной работы, как в случае сайт-специфичных маркеров. Данный метод широко используется при изучении полиморфизма ДНК у разных растений [8–11] и в том числе рода *Syringa* [12, 13].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы тотальной ДНК 27 интродуцированных сортов сирени обыкновенной из коллекции отдела декоративных растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина (ГБС РАН) (Алексей Маресьев, Заря коммунизма, Индия, Капитан Гастелло, Лебедушка, Мулатка, Огни Донбасса, Полина Осипенко, Тарас Бульба, Maximowicz, Monique Lemoine, Firmament, Gilbert, Primrose, Sweet Heart, Sensation, Mirabo, Hippolyte Maringef, Frank Paterson, Royal Purple, Excellent, M-me Casimir Perier, Lady Lindsay, St. Margaret, Glory, Virginia Becker, Dresden China). Эти образцы являлись стандартами при проверке сортового соответствия 19 микроклонов коллекции *in vitro* сирени обыкновенной Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН (ИОГен РАН) следующих сортов: Sweet Heart, Заря коммунизма, Royal Purple, Hippolyte Maringef, Sensation, Mirabo, Frank Paterson, Primrose, Gilbert, Firmament, Огни Донбасса, Monique Lemoine, Индия, Тарас Бульба, Maximowicz, Мулатка. Для сортов Заря коммунизма и Gilbert использовали по два микроклона. Кроме того, в работе был использован микроклон сорта Jeanne d'Arc.

В качестве материала для выделения тотальной ДНК использовали апикальные части молодых побегов, в фазе активного роста. Выделение ДНК из растительной ткани осуществляли по стандартной методике [14].

Для RAPD-анализа были использованы 16 десятинуклеотидных праймеров фирмы Oregon. Амплификация геномной ДНК проводилась на приборе Eppendorf Master Cycler в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.2 мМ каждого dNTP, 1.9 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ праймер, 1 ед. Taq-полимеразы, 100 нг геномной ДНК. Полимеразная реакция проводилась по следующей программе: 94°C – 4 мин; 40 циклов (94°C – 30 с, 36°C – 45 с, 72°C – 2 мин); 72°C – 4 мин.

Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1.7%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий, и фотодокументировались.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ NTSYS 2.02с [15]. Генетические расстояния между образцами рассчитывали с использованием алгоритма Нея [16] на основании анализа RAPD-профилей. Кластерный анализ матрицы генетических расстояний осуществлялся с использованием метода UPGMA. Наименьшую существенную разность (НСР) рассчитывали для сравнения вариантов с разной повторностью по следующей формуле [17]:

$$НСР_{0.05} = t_{0.05} \sqrt{\frac{ms \text{ ошибки}(n1 + n2)}{n1n2}},$$

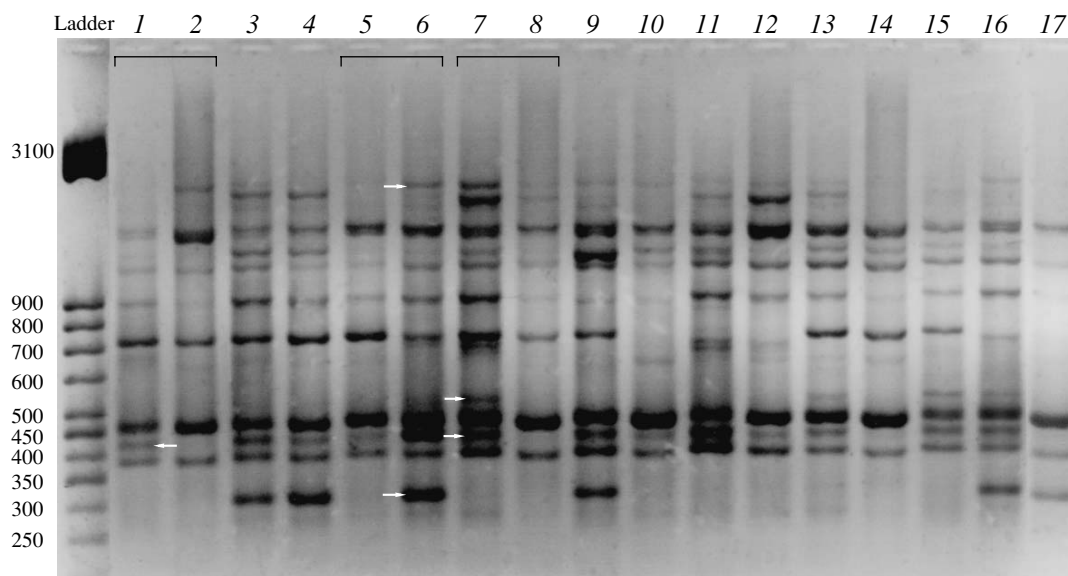
где  $t_{0.05}$  – величина критерия Стьюдента для 5%-ного уровня значимости;  $ms$  ошибки – средний

квадрат ошибки;  $n1$  и  $n2$  – повторности первого и второго вариантов опыта соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наилучший межсортовой полиморфизм по RAPD-ампликонам был выявлен при использовании 16 праймеров (ОРК1, ОРК3, ОРК7, ОРК8, ОПН1, ОПН8, ОПН13, ОПН15, ОПН19, ОПД3, ОПД5, ОПД6, ОПД7, ОПД10, ОПД16, ОРА11). Их применение для анализа 46 образцов позволило идентифицировать 258 полиморфных фрагментов. Для оценки сортового соответствия микроклонов коллекции ИОГен их RAPD-спектры сравнивали со спектрами сортов из сирингария ГБС. Было обнаружено, что не во всех случаях RAPD-спектры сортов-доноров и микроклонов оказывались идентичными. Так, например, на рис. 1 (спектры, полученные с праймером ОПД7) видно, что образцы одного сорта (стандарты и микроклоны), находящиеся на соседних дорожках (1 и 2, 5 и 6, 7 и 8), различаются по двум ампликонам спектра (несовпадающие показаны стрелками). Обнаруженные различия по RAPD-спектрам между сортами-стандартами и микроклонами могут быть обусловлены различными факторами: 1) межкловными различиями между растением, с которого брали эксплант для введения в культуру, и растением, с которого брали ДНК для сравнения; 2) возникновением соматической изменчивости в ходе культивирования *in vitro*; 3) возникновением случайных механических ошибок как в работе с регенерантами, так и при маркировании.

Поскольку идентификация микроклонов прямым сравнением их спектра со спектрами сортов-стандартов была затруднена (не во всех случаях наблюдалось полное совпадение RAPD-спектров стандартов и соответствующих микроклонов), было решено провести сравнение генетических расстояний между ними. Для этого был проведен анализ RAPD-спектров на наличие или отсутствие компонентов. Составлена бинарная матрица исходных данных, в которой присутствие фрагмента обозначали как 1, а отсутствие – как 0. На основании этой матрицы с использованием алгоритма Нея [17] была рассчитана матрица генетических расстояний, а уже по ней методом кластерного анализа UPGMA построена дендрограмма (рис. 2). Кроме того, была проведена заданная кластеризация, при которой в кластер объединялись сорта-стандарты и соответствующие им микроклоны (для сортов Заря коммунизма и Gilbert в кластер входили сорт-стандарт и два микроклона). При этом генетические расстояния, рассчитанные по Нею, определялись как внутри



**Рис. 1.** RAPD-спектры сортов сирени, полученные с использованием праймера OPD7. Сорта-стандарты и соответствующие микроклоны находятся на соседних дорожках геля: 1 и 2 – Maximowicz, 3 и 4 – Индия, 5 и 6 – Тарас Бульба, 7 и 8 – Monique Lemoine, 9 и 10 – Огни Донбасса, 11 и 12 – Firmament, 13, 14 и 15 – Gilber, 16 и 17 – Primrose. Примером различий по некоторым компонентам спектров сорта-стандарта и соответствующего ему микроклона спектра служат дорожки 1 и 2, 5 и 6, 7 и 8 (пары сорт-микроклон объединены скобками, а несовпадающие фрагменты обозначены стрелками). Полное совпадение спектров сорта и микроклона наблюдается на дорожках 3 и 4.

кластеров (числовые значения, расположенные по диагонали таблицы), так и между заданными кластерами – цифровые значения над диагональю (табл. 1). Проведение анализа было возможно для 16 сортов, у которых имелся стандарт и соответствующий ему микроклон (микроклоны).

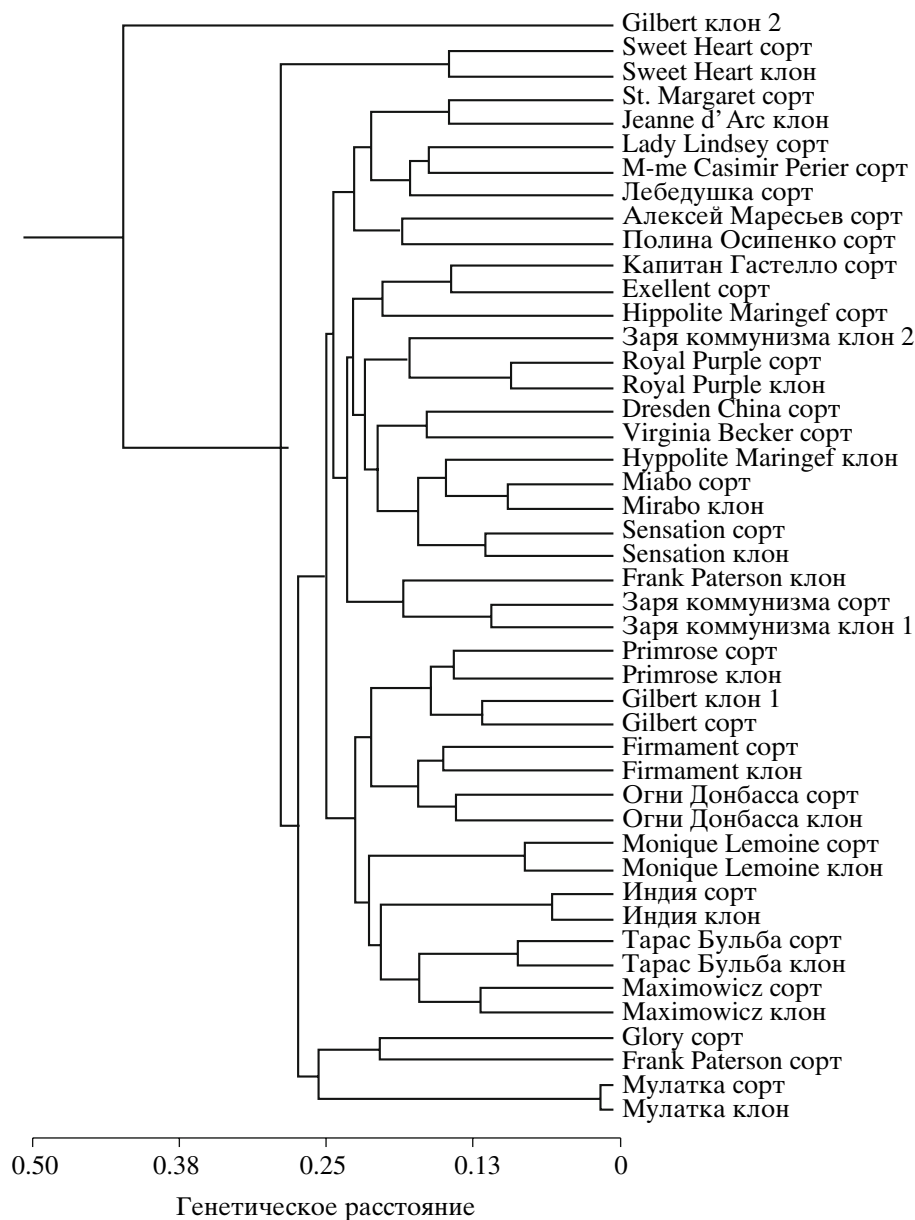
Для оценки достоверности различий меж- и внутрикластерных генетических расстояний был проведен однофакторный дисперсионный анализ. В качестве повторений использовали генетические расстояния, рассчитанные по Нейю, для 14 пар и 2 троек стандарт – клон, относящихся к одному сорту (1-й вариант) и расстояния между различными сортами (2-й вариант). Результаты дисперсионного анализа представлены в табл. 2. Анализ показал, что различия между вариантами достоверны на 95% уровне значимости.

Оценка значимости разности между средними проводилась по НСР. Среднее генетическое расстояние между сортами-стандартами и соответствующими микроклонами (1-й вариант) составило 0.13, а среднее расстояние между образцами разных сортов (2-й вариант) – 0.24. Фактическая разность двух выборочных средних (0.11) оказалась больше НСР (0.022). Таким образом, была установлена значимость различий между внутри-

сортными (в парах сорт-микроклон) и межсортными генетическими расстояниями.

Следует отметить, что генетические расстояния в заданных кластерах для некоторых сортов (Gilbert, Заря коммунизма, Hippolyte Maringef и Frank Paterson) выделялись среди других большей величиной. На дендрограмме (рис. 2) также хорошо видно, что микроклоны данных сортов генетически ближе не к своим сортам-стандартам, а к другим образцам. Было предположено, что такая кластеризация обусловлена значительным генетическим несоответствием между микроклоном и сортом-стандартом, возникшим в результате ошибки отбора образца. Один из данных микроклонов (Hippolyte Maringef), выращенный позже до фазы цветения, не имел полного соответствия с сортом-стандартом и по морфологическим характеристикам.

В настоящее время RAPD-анализ рассматривается некоторыми исследователями как устаревший метод, и это суждение верно в отношении тех видов растений, генетика которых изучена хорошо. Однако в случае видов, генетическое исследование которых только еще начинается, данный подход может быть использован на первом этапе практически как единственный метод маркирова-



**Рис. 2.** UPGMA кластеризация сортов и микроклонов сирени на основании генетических расстояния между ними, вычисленных по результатам RAPD-анализа с использованием алгоритма Нея.

ния, не требующий больших предварительных исследований. Результаты работы позволяют говорить о возможности применения RAPD анализа для определения сортового соответствия в коллекциях сирени *in vitro*. При этом критерием для определения сортовой принадлежности образцов могут служить величины генетических расстоя-

ний между микроклонами и сортами-стандартами, определяемые в коллекции, подвергающейся проверке. Можно предположить, что если генетическое расстояние между проверяемым микроклоном и его сортом-стандартом превышает 0.15 (величина определена опытным путем при сравнении генетических расстояний среди образцов

**Таблица 1.** Генетические расстояния по Нею, вычисленные по результатам RAPD-анализа сортов и микроклонов сирени, при заданной кластеризации (заданный кластер: сорт – соответствующий ему микроклон). Расстояния в заданных кластерах – диагональ таблицы, расстояния между заданными кластерами – значения над диагональю

	Мулатка	Maximowicz	Индия	Тарас Бульба	Monique Lemoine	Огни Донбасса	Firmament	Gilbert	Primrose	Sweet Heart	Заря коммунизма	Sensation	Mirabo	Hippolyte Maringef	Frank Paterson	Royal Purple
Мулатка	<b>0.016</b>	0.266	0.319	0.230	0.258	0.279	0.226	0.320	0.278	0.281	0.261	0.218	0.228	0.286	0.262	0.277
Maximowicz		<b>0.115</b>	0.224	0.169	0.214	0.202	0.235	0.270	0.232	0.262	0.244	0.220	0.216	0.289	0.282	0.290
Индия			<b>0.056</b>	0.178	0.233	0.212	0.263	0.273	0.268	0.305	0.275	0.275	0.208	0.276	0.267	0.296
Тарас Бульба				<b>0.082</b>	0.190	0.174	0.203	0.284	0.236	0.253	0.194	0.170	0.179	0.240	0.250	0.221
Monique Lemoine					<b>0.076</b>	0.207	0.211	0.281	0.275	0.290	0.233	0.186	0.244	0.287	0.262	0.234
Огни Донбасса						<b>0.135</b>	0.168	0.250	0.208	0.260	0.207	0.186	0.197	0.223	0.235	0.215
Firmament							<b>0.148</b>	0.261	0.246	0.263	0.235	0.222	0.203	0.256	0.270	0.218
Gilbert								<b>0.244</b>	0.239	0.296	0.279	0.245	0.229	0.334	0.309	0.322
Primrose									<b>0.136</b>	0.237	0.250	0.202	0.209	0.209	0.265	0.268
Sweet Heart										<b>0.137</b>	0.223	0.260	0.249	0.326	0.297	0.291
Заря коммунизма											<b>0.168</b>	0.219	0.165	0.245	0.206	0.204
Sensation												<b>0.110</b>	0.179	0.180	0.228	0.194
Mirabo													<b>0.090</b>	0.171	0.201	0.209
Hippolyte Maringef														<b>0.194</b>	0.261	0.252
Frank Paterson															<b>0.234</b>	0.260
Royal Purple																<b>0.086</b>

**Таблица 2.** Однофакторный дисперсионный анализ генетических расстояний между стандартами и клонами одного сорта и между различными сортами сирени

Источник	SS	df	ms	F
Общее	0.43	135		
Варианты	0.19	1	0.19	104.3*
Ошибка	0.24	134	0.002	

\* Значимо на уровне  $P = 0.05$ .

одного сорта и между образцами разных сортов), то исследуемый образец с высокой вероятностью не соответствует сорту. Следует учитывать, что такая величина различия является приблизительной и может варьировать в разных коллекциях. Тем не менее метод проверки сортовой принадлежности микроклонов в коллекциях *in vitro*, основанный не на прямом сравнении RAPD-профилей, а на анализе относительных генетических расстояний между проверяемыми образцами (микроклонами) и известными сортами, уже сейчас может быть рекомендован для использования в практических целях.

Результаты проведенной работы также могут быть использованы для создания SCAR-маркеров (Sequence Characterized Amplified Region), более надежных при сортовой идентификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов" (подпрограммы Биоразнообразие).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лунева З.С., Михайлов Е.А., Судакова Е.А. Сирень. М.: Агрпромиздат, 1989. 256 с.
2. Окунева И.Б. Особенности вегетативного размножения сортовой сирени: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, 1998. 21 с.
3. Андреев Л.Н., Горбунов Ю.Н. Сохранение редких и исчезающих растений *ex situ*: достижения и проблемы // Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии: Матер. Междунар. конф. Москва, 21–23 апреля 1999 г. М. 2000. С. 19–23.
4. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного

материала плодово-ягодных культур: Автореф. дис. докт. биол. наук М: Всероссийск. селекционно-технологич. ин-т садоводства и питомниководства, 1998. 44 с.

5. Молканова О.И., Стахеева Т.С., Васильева О.Г. и др. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких и ценных видов растений // Матер. Междунар. науч. конф., посвященной 60-летию Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН "Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов", Москва, 5–7 июля. М., 2005. С. 354–356.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-пресс, 1999. 160 с.
7. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 443–450.
8. Williams J.G.K., Kubelik A.P., Livak K.J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 22. P. 6531–6535.
9. Guerin J.R., Sweeney S.M., Collins G., Sedgley M. The development of a genetic database to identify Olive cultivars // Amer. Soc. Hort. Sci. 2002. V. 127. № 6. P. 977–983.
10. Godwin I.D., Sangduen N., Kunanuvatchaidach R. et al. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies // Plant Cell Reports. 1997. V. 16. № 5. P. 320–324.
11. Кудрявцев А.М., Мартынов С.П., Броджо М., Пухальский В.А. Оценка правомерности использования RAPD-анализа для выявления филогенетических связей между сортами яровой твердой пшеницы (*T. durum* Desf.) // Генетика. 2003. Т. 39. № 9. С. 1237–1246.
12. Chen X., Xiangyun Z., White B.N. Analysis of genetic relationship among Lilacs (*Syringa*) by RAPD // Acta Horticulturae Sinica. 1995. V. 22. № 2. P. 171–175.
13. Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н., Молканова О.И. и др. Род *Syringa*: молекулярное маркирование видов и сортов // Генетика. 2004. Т. 40. № 1. С. 37–40.
14. Edwards S.K., Johonstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyse // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 1349.
15. Rohlf F.J. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02c. Exeter Software. N. Y., 1998.
16. Nei M. Genetic distance between populations // Am. Nat. 1972. V. 106. P. 283–292.
17. Доснехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1979. 416 с.

**Molecular Genetic Marker-Based Approaches to the Verification of Lilac *Syringa vulgaris* L. *In Vitro* Germplasm Collections****N. V. Melnikova<sup>a</sup>, E. V. Borhert<sup>a</sup>, S. P. Martynov<sup>c</sup>, I. B. Okuneva<sup>b</sup>, O. I. Molkanova<sup>b</sup>, V. P. Upelniek<sup>a</sup>, and A. M. Kudryavtsev<sup>a</sup>**<sup>a</sup> *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia;*  
*e-mail: kudryav@vigg.ru*<sup>b</sup> *Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*<sup>c</sup> *Vavilov All-Russia Institute of Plant Industry, St. Petersburg, 190000 Russia*

RAPD analysis was used to verify the varieties in an in vitro germplasm collection of lilac *Syringa vulgaris* L. RAPD patterns were obtained with 16 decanucleotide primers for 46 accessions (microclones and corresponding reference varieties). The RAPD patterns of a microclone and the corresponding reference variety often differed in composition; consequently, it was infeasible to verify the accessions by direct comparison of the RAPD patterns. Hence, evaluation of the relative genetic distances between accessions (microclones) and known varieties was proposed as a method to verify lilac in vitro germplasm collections.