

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 16**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2013

УДК [577.21 + 575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2013. – Т. 16. – 130 с. – ISSN 1999-9127.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский – главный редактор, Л.В. Хотылева – зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
Н.В. Павлючук, Н.В. Казаровец, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк,
В.А. Лемеш, С.А. Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова,
И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева,
В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич – члены редколлегии;
И.В. Широкая – ответственный секретарь.

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2013

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РАСТЕНИЙ *CALLUNA VULGARIS* И *ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI* (СЕМЕЙСТВА *ERICACEAE*), ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ ПОСАДОК

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

Введение

Зеленые насаждения являются обязательным компонентом архитектуры современных городов. Решая эстетические и экологические проблемы, декоративные растения формируют микроклимат города, создают комфортную и гармоничную среду. Ассортимент растений, применяемых для озеленения населенных мест, должен быть широким и интересным, с учетом возможности использования его для различных целей: создания клумб, рокариев, фигурных насаждений, одиночных или групповых посадок и других объектов. В связи с этим, в сфере зеленого строительства все большую популярность приобретают кустарниковые растения многофункционального назначения, перспективные для озеленения населенных пунктов Беларуси. Представители семейства вересковые (*Ericaceae*) широко используются в ландшафтном дизайне благодаря своей неприхотливости, широкому разнообразию видов, форм, размеров.

Вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* (L) Hull.) – популярное декоративное растение, способное украсить любой архитектурный и ландшафтный объект. Вереск обладает своеобразным, так называемым эрикоидным обликом, который создают деревянистые побеги, покрытые мелкими кожистыми листьями. Толокнянка обыкновенная (*Arctostaphylos uva-ursi* (L) Spreng.), помимо традиционных лекарственных свойств, нашла применение в садовом дизайне как декоративный кустарник. Благодаря стелющимся побегам с вечнозелеными листьями, толокнянка используется как почвопокровное растение для разных типов озеленительных посадок.

Оба вида являются представителями семейства *Ericaceae* и приспособлены к климатическим условиям Беларуси. Расширение

ассортимента декоративных растений за счет генофонда аборигенных видов и полученных на их основе новых форм является в настоящее время актуальной задачей. Использование растений из местной флоры помогает избежать ряд проблем, главные из которых – адаптация к новым условиям среды и разработка специфических технологий выращивания. Получение новых форм методом индивидуального отбора из природных популяций и выращивание их за пределами природных ареалов служит эффективным способом повышения разнообразия генофонда растений и позволяет создавать генотипы с ценными декоративными признаками. Возможность отбора обусловлена полиморфизмом природных популяций, который определяется генетической изменчивостью и носит наследуемый характер [1].

Использование молекулярных маркеров позволяет целенаправленно подобрать генотипы для последующей селекционной работы, а также выявить генетическое различие исходных и новых форм декоративных растений, что значительно сокращает сроки селекции. В настоящее время представлены немногочисленные данные по ДНК-анализу вереска обыкновенного и толокнянки обыкновенной. Молекулярно-генетическое исследование представителей семейства *Ericaceae* направлено главным образом на оценку гетерогенности образцов, а также для уточнения таксономии и филогении видов [2]. Borchert et al. с помощью RAPD- и ISSR-анализа выявили невысокое генетическое разнообразие 74 сортов *C. vulgaris*. По результатам исследования была разработана система идентификации новых сортов, полученных из вереска обыкновенного или других вегетативно размножаемых культур [3]. Для исследова-

ния хозяйственно-ценных признаков вереска используются методы маркер-сопутствующей селекции. Несколько типов молекулярных маркеров были использованы для маркирования т.н. «бутоначатых» цветов вереска, бутоны которых не раскрываются и в течение всего вегетационного сезона имеют свежий и яркий цвет, что значительно повышает экономическую ценность этой формы вереска. [4–5]. Новая классификация семейства *Ericaceae* составлена на основе анализа последовательности ядерной и хлоропластной ДНК, а также морфологии, анатомии и эмбриологии [6–7]. Филогенетические взаимоотношения различных представителей вересковых исследованы при помощи анализа пластидных и митохондриальных генов. При

помощи шести молекулярных маркеров выяснены взаимоотношения 19 родов подсемейства *Ericoideae*. Полученные результаты нашли применение для уточнения филогенетических связей близких таксонов [8–9].

Цель нашего исследования состояла в идентификации новых форм вереска обыкновенного и толокнянки обыкновенной, полученных из природных популяций методом индивидуального отбора по декоративным признакам. Различия на уровне ДНК позволят выяснить, носит ли изменчивость декоративных признаков адаптивный характер при неизменности генотипа или полученные формы генетически отличаются от исходных образцов и могут стать основой новых сортов.

Материалы и методы

Исследованы три формы вереска – исходный аборигенный вид и две новые формы: одна с лилово-розовыми и вторая с белыми цветами, полученные из аборигенного вида. Объектами исследования также являлись новая форма толокнянки, перспективная для использования в озеленении, и исходная дикорастущая форма толокнянки обыкновенной.

Генетическую гетерогенность представителей семейства *Ericaceae* оценивали при помощи ISSR-анализа и RAPD-анализа. Для RAPD-анализа использовали 8 праймеров: ISSR-4, ISSR-8, ISSR-9a, ISSR-10, ISSR-17, ISSR-22, ISSR-23, ISSR-24. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала: 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 пМ праймера, 0,1 ед. Taq-полимеразы в 1х буфере, 25 нг ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Bio-Rad в следующем температурном режиме: первая денатурация – 94 °C 4 мин; 35 циклов – 94 °C 50 с, 49–54 °C 50 с, 72 °C 1 мин 10 с; заключительная элонгация – 72 °C 7 мин. Продукты амплификации разделяли в 1,7%-ном агарозном геле и документировали в системе GelDoc (BioRad). Для каждого праймера поставлена ПЦР в градиенте температур от 47,7 до 55,8 °C и подобрана соответствующая температура элонгации ПЦР-

реакции, позволяющая получать максимально возможное для данного праймера количество полиморфных фракций.

Для RAPD-анализа использовали 10 праймеров: OPW 15, OPW 19, OPA F16, OPA C20, OPA C10, OPA H14, OPA H13, OPC 08, OPC 05, OPD 07. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала: 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 пМ праймера, 0,1 ед. Taq-полимеразы в 1х буфере, 20 нг ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Bio-Rad при следующем температурном режиме: первая денатурация – 94 °C 4 мин; 35 циклов – 94 °C 1 мин, 35 °C 1 мин, 72 °C 2 мин; заключительная элонгация – 72 °C 5 мин. Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном агарозном геле и документировали в системе GelDoc (BioRad).

Полиморфизм оценивали по наличию-отсутствию фрагментов, интенсивность фракций как полиморфный признак не учитывали. Уровень полиморфизма праймера оценивали как отношение числа полиморфных фрагментов к общему числу амплифицированных фрагментов. Генетический полиморфизм генотипа определяли как отношение числа полиморфных локусов к общему числу детектируемых локусов.

Результаты и обсуждение

В результате исследования выявлены генетические различия между исходными и новыми формами вереска и толокнянки.

Количество полиморфных ISSR-фрагментов,

детектированное у видов толокнянки, составило 53. Наибольший уровень полиморфизма зафиксирован у праймеров ISSR-17, ISSR-9, ISSR-4 (табл. 1). Размер продуктов

амплификации варьировал от 240 до 2000 п.н. Праймеры ISSR-17, ISSR-24, ISSR-4 выявили наибольшее количество полиморфных фрагментов (12, 9 и 8 соответственно). Минимальная информативность проявлена праймером ISSR-9а (3 полиморфные полосы).

С помощью RAPD-маркеров у толокнянки детектировано 17 полиморфных фракций. Зона разделения RAPD-ампликонов нахо-

дилась в пределах 400–1400 п.н. Большая часть полиморфных фрагментов находилась в области 500–1000 п.н. при этом количество полиморфных полос в зависимости от праймера варьировало от 1 до 4. Наиболее информативными оказались праймеры OPW 19, OPC 08. Праймер OPA H14 не выявил различий между исследуемыми образцами (рис. 1).

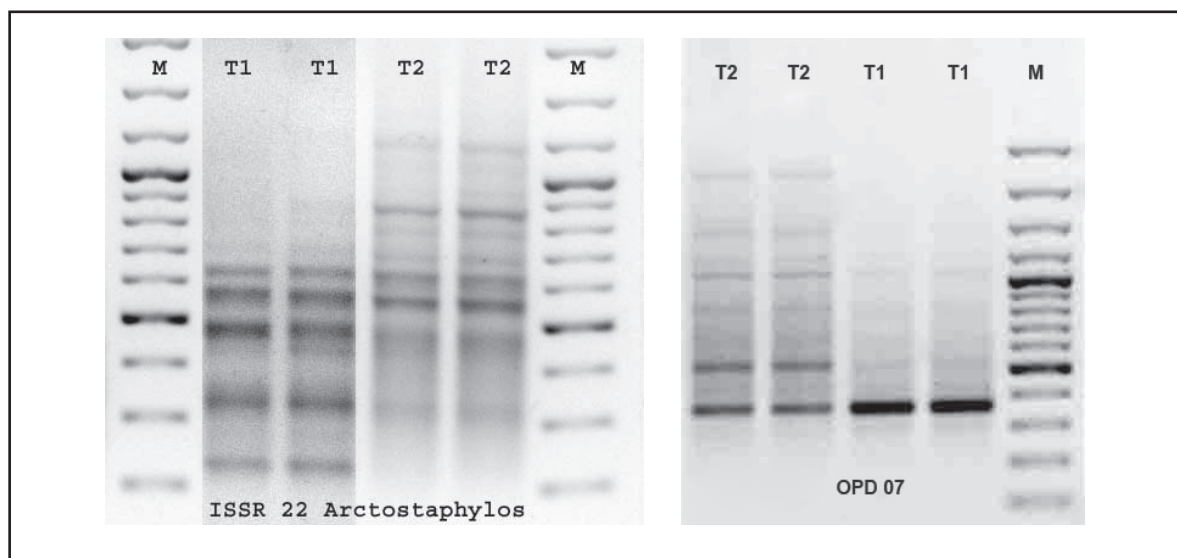


Рис. 1. Результаты амплификации геномной ДНК растений толокнянки обыкновенной с ISSR-22 и OPD 07. T1 – новая форма толокнянки, T2 – аборигенный вид толокнянки

Сравнение результатов амплификации исходной и новой форм толокнянки выявило отличия по вариабельности ДНК-фрагментов. Полиморфизм между исследуемыми образцами проявлялся в присутствии полиморфной полосы у одной формы и, соответственно, ее отсутствия у другой. У дикорастущей формы присутствует 62% полиморфных ISSR-фрагментов и 72% полиморфных RAPD-фрагментов. Если рассматривать отсутствие

фрагмента как рецессивное состояние локуса, то полученные результаты указывают на более низкую генетическую вариабельность новой формы толокнянки по сравнению с исходной формой. В то же время, наличие у исходной формы большого запаса вариабельных локусов свидетельствует о потенциале генетической изменчивости и возможности его использования в дальнейшем для получения новых генотипов.

Таблица 1

Характеристика молекулярных маркеров, использованных для исследования представителей семейства *Ericaceae*

Название праймера	Толокнянка обыкновенная			Вереск обыкновенный		
	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
OPA C10	8	2	25	13	9	69
OPA H14	4	0	0	10	1	70

Продолжение табл. 1

Название праймера	Толокнянка обыкновенная			Вереск обыкновенный		
	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
OPA F16	9	2	22	7	7	100
OPB 08	9	3	33	7	4	57
OPW 19	11	4	36	13	11	85
OPA C20	8	1	12	10	8	80
OPA H13	6	1	17	10	5	50
OPC 05	10	2	20	9	5	56
OPC 07	7	2	29	10	5	50
ISSR-4	14	8	57	26	22	85
ISSR-9	10	6	60	10	7	70
ISSR-9a	11	3	27	10	1	10
ISSR-10	12	5	42	16	16	100
ISSR-17	13	12	92	18	9	50
ISSR-22	11	5	45	17	6	35
ISSR-23	12	5	42	15	7	47
ISSR-24	16	9	56	16	7	44

Исследование трех форм вереска обыкновенного позволило установить различия между генотипами исходной и новых форм, а также между двумя новыми формами (рис. 2). У вереска выявлено 75 переменных ISSR-ампликонов и 61 полиморфный RAPD-фрагмент. Все используемые в исследовании ISSR-праймеры оказались эффективными в поиске полиморфизма между близкородственными образцами. Наибольшую информативность в изучении вереска обыкновенного проявили праймеры ISSR-10 и ISSR-4 (табл. 1). При помощи ISSR-4 и ISSR-10 зафиксировано наибольшее количество переменных полос (22 и 16 соответственно). Наименее информативен праймер ISSR-9a (1 полиморфная фракция), остальные праймеры позволяли получать 6–9 переменных фрагментов. Общее количество полиморфных ISSR-фрагментов – 75. Размер продуктов амплификации ISSR-анализа варьировал от 260 до 1700 п.н.

Несколько ниже, но тоже достаточно информативными оказались используемые в работе RAPD-праймеры, позволившие получить 61 переменный ампликон. Максимальное

количество полиморфных фракций получено при помощи OPA C10 (9 фракций) и OPW 19 (11 фракций). Остальные праймеры позволяли получать по 4–8 переменных ампликонов. Наибольший уровень полиморфизма зафиксирован у праймеров OPA C20, OPW 19, OPA F16. Размер продуктов амплификации варьировал в пределах 300–3000 п.н.

Полиморфизм между исследуемыми образцами проявлялся в виде наличия полиморфной полосы у одной или двух из исследуемых форм. Из 75 детектированных полиморфных ISSR-фрагментов 48 отмечено в спектрах вереска розовоцветкового. Уникальных фрагментов (встречающихся только у одного из исследуемых образцов) также было больше у вереска розовоцветкового. В спектрах вереска белоцветкового чаще присутствовали полиморфные RAPD-фрагменты (35 из 61 детектированной полосы), однако среди них не было уникальных ампликонов, и в целом спектры этого генотипа напоминали спектры исходной аборигенной формы. Присутствие в геномах новых форм вереска более 25% полиморфных локусов свидетельствует об относительно высоком

потенциале генетической изменчивости и предполагает возможность использования их в качестве селекционного материала.

По результатам ISSR-анализа установлено, что формы вереска розовоцветкового и вереска белоцветкового отличаются от дикорастущей формы вереска на 16% и 15%, соответственно. Генетический полиморфизм между двумя новыми формами составляет 28%. Следовательно, ISSR-анализ позволил в равной степени эффективно выявить различия

между всеми исследуемыми образцами. По результатам RAPD-анализа установлены различия между исходной формой вереска и формой вереска розовоцветкового – 45%. В то же время, в изучении исходной формы вереска и вереска белоцветкового используемые RAPD-праймеры оказались неэффективны, выявив только 1% генетического различия. Дивергенция новых форм вереска между собой по RAPD-ампликонам составила 13%.

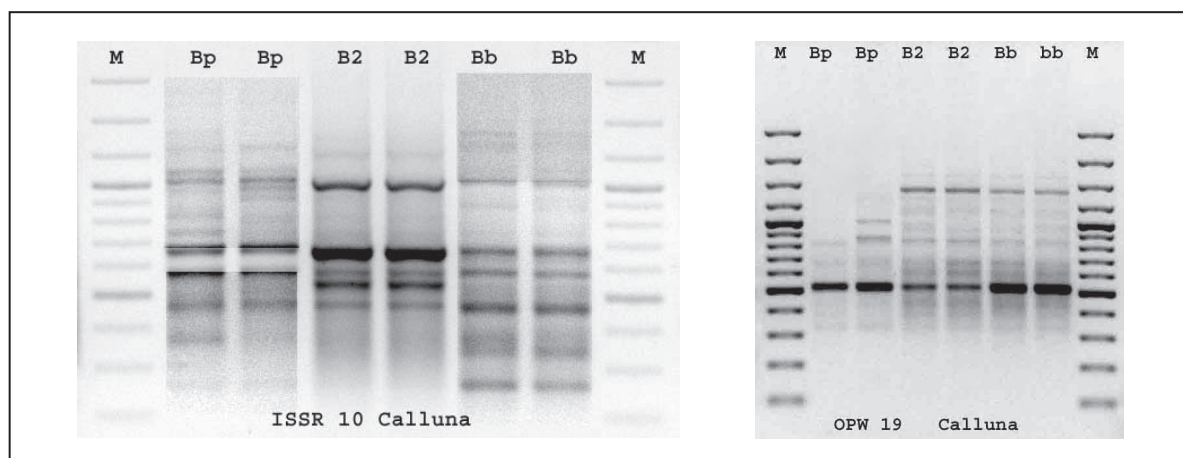


Рис. 2. Результаты амплификации геномной ДНК растений вереска обыкновенного с ISSR-10 и OPW 19. Bp – вереск розовоцветковый, B2 – аборигенный вид вереска, Bb – вереск белоцветковый

Заключение

Таким образом, выявлены генетические отличия новых форм вереска обыкновенного и толокнянки обыкновенной от исходных генотипов. Индивидуальный отбор по декоративным признакам позволил выделить из природных популяций генетически гетерогенные образцы, которые могут стать исходным материалом при создании новых сортов.

Уровень полиморфизма, выявленный по результатам ISSR- и RAPD-анализа, позволил эффективно идентифицировать новые формы. Для исследования молекулярно-генетического разнообразия видов и форм толокнянки

обыкновенной более информативным является ISSR-анализ. Использование набора из трех праймеров (ISSR-4, ISSR-10, ISSR-17) позволяет выявить более 62% полиморфных локусов. Для выявления различий между исходной формой вереска и новой формой вереска розовоцветкового одинаково эффективно использование как ISSR, так и RAPD-анализа. Оба метода оказались информативны и для поиска различий между двумя новыми формами вереска. Для выявления различий между исходной и новой формой вереска белоцветкового предпочтительнее применять ISSR-анализ.

Список использованных источников

1. Баханова, М.В. Интродукция растений: учеб.-метод. пособие / М.В. Баханова, Б.Б. Намзалов. – Улан-Удэ: Изд-во Бурятского государственного университета, 2009. – 207 с.
2. Genetic characterization of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) subject to different management regimes across Great Britain /

A. Meikle [et al.] // *Mol. Ecology*. – 1999. – Vol. 8. – P. 2037–2047.

3. Implementation of a model for identifying Essentially Derived Varieties in vegetatively propagated *Calluna vulgaris* varieties [Электронный ресурс] / T. Borchert [et al.] // *BMC Genetics*. – 2008. – Режим доступа: <http://>

www.biomedcentral.com./content/pdf/1471-2156-9-56.pdf. – Дата доступа: 02.07.2013.

4. Borchert, T., Hohe, A. Molecular markers for the flower phenotype of the ornamental crop *Calluna vulgaris* [Электронный ресурс] / Т. Borchert, А. Hohe // eBioPoster. – 2009. – Режим доступа: http://ebio-poster.com/index.php?option=com_content&view=article&id=249. – Дата доступа: 02.07.2013.
5. Borchert, T. Identification of molecular markers for the flower type in the ornamental crop *Calluna vulgaris* / Т. Borchert, А. Hohe // Euphytica. – 2009. – Vol. 170. – P. 203–213.
6. Phylogenetic Classification of *Ericaceae*: Molecular and Morphological Evidence /

А. Kron [et al.] // Botanical Review. – 2002. – Vol. 68, № 3. – P. 335–423.

7. Phylogenetic Relationships in the Order Ericales: Analyses of Molecular Data from Five Genes from the Plastid and Mitochondrial Genomes / A.A. Anderberg [et al.] // Am. J. of Botany. – 2002. – Vol. 89, № 4. – P. 677–687.

8. Gillespie, E. Molecular phylogenetic relationships and a revised classification of the subfamily *Ericoideae* (*Ericaceae*) / E. Gillespie, K. Kron // Mol. Phylogenetics and Evolution. – 2010. – Vol. 56. – P. 343–354.

9. Rendell, S. Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe / S. Rendell, R.A. Ennos // Mol. Ecology. – 2002. – Vol. 11. – P. 69–78.

Дата поступления статьи 5 августа 2013 г.