

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ РЕДКИХ И НУЖДАЮЩИХСЯ В ОХРАНЕ ВИДОВ РАСТЕНИЙ КАК ОСНОВА ОПТИМИЗАЦИИ СОХРАНЕНИЯ ИХ ГЕНОФОНДОВ

С.В. Боронникова

ГОУ ВПО «Пермский государственный университет»,
г. Пермь

Рецензент Н.С. Попов

Ключевые слова и фразы: паспорттизация; генетическое разнообразие; генофонд; идентификация; полиморфизм; ISSR- и IRAP-маркеры.

Аннотация: На основании результатов молекулярного маркирования геномов 4 редких видов растений предложена методика генетической паспорттизации и штрих-кодирования популяций. Молекулярно-генетический анализ позволил выявить общие и специфические сочетания длин амплифицированных фрагментов ДНК 4 редких видов растений с использованием ISSR- и IRAP-маркеров. Разработанная методика генетической паспорттизации рекомендована в качестве модели для генетической паспорттизации ресурсных, включая продовольственные культуры, видов растений и в качестве подхода оценки состояния популяционных генофондов.

Введение

Проблема сохранения биологического разнообразия на уровне генов, видов, сообществ и экосистем является весьма актуальной в связи с усиливающимся антропогенным воздействием на биосферу, особенно в промышленно развитых районах, таких как Пермский край. Одной из первоочередных задач является выбор подходов, технологий и критериев оценки генетического разнообразия на разных уровнях организации биологических систем. К приоритетным направлениям науки в России и за рубежом относятся развитие технологий анализа геномов лекарственных видов растений, которые часто являются редкими и находящимися под угрозой исчезновения видами.

Для генетической паспорттизации больших по размеру и сложных по структуре геномов растений необходимо использовать подходы, основанные на их молекулярном маркировании, так как прямое секвенирование геномов невозможно из-за дороговизны [4].

Общий принцип молекулярно-генетической паспорттизации был предложен на примере двух видов рода *Adonis* [1].

Разработка методики паспорттизации редких видов растений является следующим необходимым шагом для оптимизации сохранения генофондов этих видов на популяционном уровне.

Целью данной работы является создание методики генетической паспорттизации редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений на популяционном уровне на основании молекулярного маркирования их геномов.

Материал и методы исследований

Молекулярно-генетические исследования проведены в 2004-2009 годах у 20 популяций 4 редких видов растений Пермского края [3;6]: *Adonis vernalis* L., *Adonis sibirica* Patrin ex Ledeb., *Digitalis grandiflora* Mill., *Adenophora lilifolia* (L.) DC. Для выделения ДНК использовали методику А.М. Торрес (1993) с некоторыми модификациями. Секвенирование последовательностей ДНК с использованием капиллярного секвенатора ABI3700 (Biosystems, USA) и дизайн праймеров проведены в лаборатории растительной геномики института биотехнологии университета Хельсинки в Финляндии [5]. Для IRAP-анализа 5 редких видов Урала разработаны и синтезированы 70 праймеров в «MWG» (Германия). Анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК, включая основные его стадии, а именно подбор молекулярных маркеров и условий проведения ПЦР, апробацию праймеров, ПЦР анализ, детекцию продуктов амплификации и компьютерный анализ данных проведен в ПЦР лаборатории Пермского государственного университета. Амплификация ДНК IRAP методом была выполнена в

термоциклере (MJ, Bio-Rad, USA) по следующей программе: предварительная денатурация 95 °С, 3 мин; 30 цикла 95 °С, 20сек; 60 °С отжига, 1 мин; 68 °С, 1 мин. Последний цикл элонгации длился 5 минут при 72 °С. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 55 ° до 68 °С. Для проверки достоверности полученных спектров ДНК опыт повторяли не менее двух раз. Амплифицированные продукты были подвергнуты электрофорезу на 1,7 % агороном геле в присутствии бромистого этидия. Гели были отсканированы в системе Gel-Doc (Bio-Rad, США). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp +1,5 + 3 Kb DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы «Quantity One» в системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA).

Результаты и их обсуждение

Разработаны научно-методические основы генетической паспортизации редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. На первом этапе нами был проведен анализ разных типов молекулярных маркеров. Для идентификации и паспортизации растений в рамках вида маркеры должны соответствовать ряду требований, сформулированных С.В. Малышевым и др. (2006) для идентификации сортов культурных растений. В первую очередь они должны быть полиморфны, что позволяет отличить один образец от другого. Они должны стабильно наследоваться в поколениях, охватывать разные области генома, быть представлены в количестве, достаточном для идентификации как уже имеющихся, так и вновь создаваемых сортов или иных совокупностей.

Основой метода Inter Simple Sequence Repeat (**ISSR**) является анализ полиморфных участков ДНК между микросателлитами [12], широко представленными в геномах растений. В качестве праймеров для ПЦР используют ди- и тринуклеотидные микросателлитные повторы. Нуклеотидный состав «якоря» должен отличаться от такового повторов микросателлита, а не служить его аналогичным продолжением. ISSR-праймер при амплификации отжигается только с одного конца микросателлита, расположенного в матричной ДНК, поэтому фрагменты, получаемые с помощью ISSR – это последовательности ДНК, расположенные между соседними инвертированными микросателлитами. ISSR метод был успешно использован для идентификации и паспортизации сортов продовольственных [2] и ягодных культур [8]. Для паспортизации генетически гомогенных популяций сортов вполне достаточно одного метода выявления полиморфизма ДНК. Для паспортизации генетически гетерогенных природных популяций редких видов растений необходим анализ большего числа генетических элементов генома. Широко в геномах растений представлены мобильные генетические элементы-ретротранспозоны. В некоторых случаях число их копий может составлять более 70 % ядерного генома [10]. Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) – это анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между ретротранспозонами [9]. Методика генетической паспортизации на основе ISSR- и IRAP-маркеров имеет высокую разрешающую способность, дает результаты стабильно воспроизводимые в различных лабораториях, характеризуется высоким уровнем стандартизации, как набора маркеров, так и техники выполнения анализа, и поддается автоматизации. Именно использование IRAP- вместе с ISSR-маркерами позволило нам провести паспортизацию гетерогенных природных популяций редких видов растений.

На втором этапе генетической паспортизации собраны фрагменты листьев изучаемых видов и из них выделена ДНК. На третьем этапе отобраны наиболее информативные ISSR- и IRAP-праймеры, с помощью которых выявлены эффективные для изучаемых видов ISSR- и IRAP-маркеры (табл.1). Проведен ПЦР анализ выделенных проб ДНК электрофорез (рис.1). На четвертом этапе паспортизации провели анализ выявленных и отбор идентификационных молекулярных маркеров. На пятом этапе маркеры ДНК, избранные для паспортизации, представили в виде молекулярно-генетической формулы.

Нами предложен новый способ записи молекулярного маркера генома или амплифицированного фрагмента ДНК. В отличие от предлагаемого ранее способа его записи [8] при составлении молекулярно-генетической формулы используются не только полиморфные, но и «родовые», «видовые», «полиморфные» и «уникальные» ДНК маркеры, что позволяет характеризовать геномы изучаемых объектов на надвидовом, видовом, популяционном или сортовом уровнях [1].

Предлагается основной характеристике молекулярного маркера – длине – придать больший статус и указывать ее большими буквами после указания типа фрагмента – $A_{v,830M12}$. В

молекулярно-генетической формуле предлагается указывать тип и номер праймера нижним индексом.

Например, Av_p650_{IR75} амплифицирован IRAP методом посредством праймера под номером 2175.

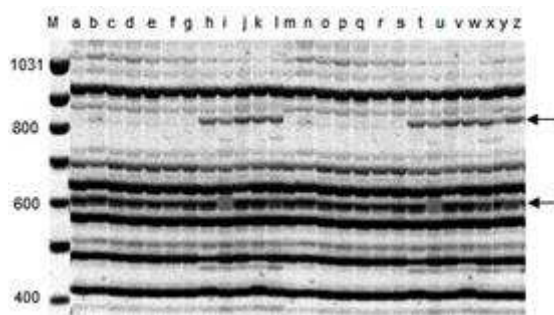


Рис. 1. IRAP спектр популяции *A. vernalis* около д. Иштерьяки Пермского края с праймером 2078 (gсggagtcgсса): буквами обозначены номера проб, М - молекулярный маркер, стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты ДНК

Молекулярный маркер Av_v830_{ISM12} выявлен ISSR методом с использованием праймера M12. В случае, когда праймер возможно записать в виде короткой формулы как при ISSR анализе, запись молекулярного маркера можно представить в следующем виде $Av_v830(CA)_6G$. Данная форма записи молекулярного маркера является самой информативной.

Таким образом, в предлагаемой записи молекулярно-генетической формулы указан вид растения, тип амплифицированного фрагмента ДНК, его размер и дана характеристика исследуемой части генома посредством указания метода анализа полиморфизма ДНК и номера или последовательности праймера. Данная форма записи применима как для гомогенных сортов растений, так и для гетерогенных природных популяций.

Маркер молекулярного веса, пн	Штрих-код	Номер фрагмента ДНК	Обозначение фрагмента
1000			
900		1	ADr_{850}_{IR98}
		2	Av_v830_{M12}
800			
		3	Av_v710_{IR04}
700			
		4	Av_v630_{M1}
600			
		5	AD_r550_{X11}
500			
		6	Av_v490_{X11}
		7	AD_r480_{M3}
400			
		8	AD_r380_{M1}
300			
		9	Av_p300_{X11}
		10	Av_p260_{IR75}

Рис.2. Штрих-код популяции *Adonis vernalis* L. около с.Алтынное Пермского края

Для составления молекулярно-генетической формулы популяций редких видов рода *Adonis* и идентификации растительного сырья предложено отбирать 4 родовых молекулярных маркера, т.е. общих и для двух изучаемых видов этого рода; 4 видовых, т.е. специфических для двух изучаемых видов этого рода; а также от 1 до 4 полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК, сочетания которых специфичны для исследуемых популяций. Для генетической паспортизации исследованных популяций рекомендуется использовать от 10 до 12 молекулярных маркеров. Сочетания полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК не совпадают ни у одной из

изученных популяций. Например, молекулярно-генетическая формула популяции №6 *A.vernalis* около с. Ишимово Пермского края записывается следующим образом:

$AD_r 550_{X11}$; $AD_r 850_{IR98}$; $AD_r 480_{M3}$; $AD_r 380_{M1}$; $Av_v 830_{M12}$; $Av_v 710_{IR04}$;
 $Av_v 630_{M1}$; $Av_v 490_{X11}$; $Av_p 1100_{IR98}$; $Av_p 880_{IR97}$; $Av_p 750_{IR02}$; $Av_p 650_{IR75}$

Впервые в мире предложена запись молекулярно-генетической формулы в виде штрих-кода [1]. Родовые фрагменты предлагается обозначить толстой линией, видовые – линией средней толщины, а полиморфные фрагменты – тонкой линией. Для штрих-кода предлагается использовать от 10 до 12 штрихов, из которых четыре характерны для рода, четыре – для вида, а от 1 до 4 – для популяции (рис. 2).

Фрагменты ДНК в штрих-коде располагаются в зависимости от их длины от большего к меньшему. Как молекулярно-генетическая формула так и штрих-код позволят идентифицировать принадлежность как растительного сырья, так и отдельных особей не только к роду и виду, но и к группе популяций или к конкретной популяции.

На заключительном этапе генетической паспортизации составляется генетический паспорт популяции редкого или находящегося под угрозой исчезновения вида растения. Определены общепринятые показатели состояния популяций и их генетического разнообразия, включенные в генетический паспорт.

Заключение

В основе предлагаемой методики генетической паспортизации лежит молекулярный анализ высоко полиморфных областей генома редких видов растений. Для каждого вида предложен набор маркеров, который позволяет проводить паспортизацию популяций и форм в рамках вида [1]. Генофонд популяции документируется в виде формул и штрих-кода, отражающих состав аллелей в отдельных локусах генома. Новый принцип составления и записи молекулярно-генетической формулы основан на выявлении идентификационных (общих) маркеров ДНК с использованием ISSR и IRAP методов анализа полиморфизма ДНК, охватывающих большую часть геномов растений и пригодных для генетической паспортизации мало генетически изученных видов растений. Новый способ записи содержит полную информацию об идентификационном молекулярном маркере, включая вид растения, тип молекулярного маркера, его размер и характеристику исследуемой части генома посредством указания метода анализа полиморфизма ДНК и номера или последовательности праймера.

Основным достижением заключительных этапов предлагаемой методики генетической паспортизации является механизм обобщения данных молекулярно-генетического анализа посредством выявления идентификационных маркеров, отражающих большую часть генома изучаемого вида. Результаты кластеризации представляются в обобщенном виде молекулярно-генетической формулы и штрих-кода, вносятся наряду с общепринятыми показателями состояния популяции и характеристикой ее генофонда в генетический паспорт. Методика генетической паспортизации популяций редких и нуждающихся в охране видов растений позволяет, на наш взгляд, произвести молекулярное маркирование большей части сложных геномов растений, а также выявить идентификационные для рода, вида, популяции или иной совокупности ДНК маркеры и систематизировать и обобщать информацию о генетической изменчивости редких видов растений на популяционном уровне. Данная методика позволяет установить уровень и состав генетического разнообразия на популяционном уровне и проследить их динамику в дальнейшем, выделить популяции с уникальными генотипами, т.е. оптимизировать процедуру сохранения генофондов редких и нуждающихся в охране видов растений.

Список литературы

1. Боронникова, С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений: монография / С.В. Боронникова. – Перм.ун-т. Пермь, 2008 – 120 с.
2. Брик, А.Ф. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация сортов сои (*Glycinemax L.*) / А.Ф. Брик, Ю.М. Сиволап // Генетика. Е.37. – №9. – С. 1260–1237.
3. Горчаковский, П.Л. Редкие и исчезающие растения Урала и Предуралья / П.Л. Горчаковский, Е.А. Шурова. – М. : Наука, 1982. – 283 с.
4. Зеленин, А.В. Геном растений / А.В. Зеленин // Вестник Российской академии наук. 2003. – №9. – Т.73. – С. 797–806.
5. Боронникова, С.В. Ретротранспозоны в геномах лекарственных растений / С.В. Боронникова, Р.Н. Календарь // Нанотехнологии в сельском хозяйстве: доклады Международной научно-практической конференции. М.: Изд-во РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, 2008. – С. 20–21.

6. Красная книга Пермского края / науч. ред. А.И. Шепель. Пермь: Книжный мир, 2008. – 256 с.
7. Малышев, С.В. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК маркеров: Методические рекомендации / С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович, Н.А. Картель. – Минск, 2006. – 28 с.
8. Соболев, В.В. Использование ISSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и паспортизации сортов малины / В.В. Соболев, Г.И. Карлов, А.Г. Соболева, А.В. Озеровский, И.В. Казаков, А.А. Феськов // Сельскохозяйственная биология. 2006. – №5. – С. 48–52.
9. Kalendar, R. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar, T.Grob, M.Regina // Theor. and Applied Genetics. 1999. – V. 98. – P. 704–711.
10. Kumar, A. Plant retrotransposons / A. Kumar, J. Bennetzen // Annu. Rev. Genet. 1999. – V. 33. – P. 479–532.
11. Torres, A.M. Linkage among sozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* / A.M. Torres, N.F. Weeden, A. Martin // Theor Appl. Genet. 1993. – V.5. – P. 937–945.
12. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. 1994. – V.20. – P. 176–183.

Genetic Certification of Rare and Endangered Species of Plants as Basis for their Gene Pool Preservation Optimization

S.V. Boronnikova

Perm State University, Perm

Key words and phrases: genetic diversity, gene pool; identification; certification; polymorphism; ISSR and IRAP markers.

Abstract: The technology of the genetic certification and population zip-coding on the basis of molecular marking of 4 rare plant species genomes is offered. The molecular-genetic research has allowed revealing common and specific combinations of DNA amplification fragments lengths of 4 rare plant species using ISSR- and IRAP-markers. The technology of the genetic certification has the model for the resource plants and the approach for assessing the state of the population gene pool.