

УДК: [631.526.32:633.32]:581.526

RAPD-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) разного эколого-географического происхождения Ю.Н.Дугарь, В.Н.Попов

Харьковский национальный аграрный университет имени В.В.Докучаева (Харьков, Украина)

Генетическое разнообразие 15 образцов клевера лугового исследовали с помощью RAPD-анализа. По RAPD-локусам выявили высокий уровень полиморфизма среди генотипов клевера лугового, который в среднем составил 71,6%. Исследованные образцы растений клевера на основе матрицы генетических расстояний Nei и Li были объединены в два кластера. Обсуждаются возможные причины их группирования в кластеры.

Ключевые слова: *Trifolium pratense* L., RAPD-анализ, полиморфизм, генетические расстояния.

RAPD-аналіз українських сортів конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) різного еколого-географічного походження Ю.М.Дугарь, В.М.Попов

Генетичне різноманіття 15 зразків конюшини лучної досліджували за допомогою RAPD-аналізу. За RAPD-локусами був виявлений високий рівень поліморфізму серед генотипів конюшини лучної, який в середньому склав 71,6%. Досліджувані зразки рослин конюшини на основі матриці генетичних відстаней Nei та Li були об'єднані у два кластери. Обговорюються можливі причини їх групування у кластери.

Ключові слова: *Trifolium pratense* L., RAPD-аналіз, поліморфізм, генетичні відстані.

RAPD analysis of Ukrainian red clover (*Trifolium pratense* L.) cultivars of different ecology-geographical origin Yu.N.Dugar, V.N.Popov

Genetic diversity of 15 red clover cultivars was examined by RAPD analysis. The red clover genotypes were shown to be highly polymorphic by RAPD loci. It was 71,6% on the average. The studied cultivars of clover plants were merged in two clusters on the basis of Nei and Li genetic distances matrix. Possible reasons of their clustering are discussed.

Key words: *Trifolium pratense* L., RAPD analysis, polymorphism, genetic distances.

Введение

Клевер луговой (*T. pratense* L.) относится к основным кормовым культурам, который занимает доминирующее положение в травосмесях культурных сенокосов и пастбищ, а также является необходимым компонентом в естественных биоценозах, обеспечивающим ценность сена (Культурная флора..., 1993). В последние десятилетия интерес к клеверу луговому со стороны молекулярных генетиков возрос в связи с недостаточной его изученностью по многим современным направлениям генетики. Так, имеется научная информация о построении первых генетических карт клевера только на основе RFLP (Isobe et al., 2003) и SSR локусов (Sato et al., 2005), также проведена работа по разработке консенсусной генетической карты и интеграции в нее QTL-локусов (Isobe et al., 2009; Klimentko et al., 2010). Немаловажным направлением в генетике любой сельскохозяйственной культуры является оценка генетических ресурсов растений, для которой привлекаются разные типы молекулярных маркеров – RAPD (Попов и др., 2002), AFLP (Herrmann et al., 2005), SSR (Кожухова, Сиволап, 2004; Чеботарь, Сиволап, 2001) и другие. ДНК-маркеры позволяют провести генетическую дифференциацию генотипов, структурировать коллекции важных сельскохозяйственных растений и на основе полученной базы данных подбирать генотипы, которые максимально отличаются по локусам определенного типа молекулярных маркеров для построения генетических карт.

Из всех известных на сегодняшний день молекулярных маркеров для клевера лугового с целью описания коллекционных образцов используют RAPD-маркеры, которые иногда сочетают с другими типами маркеров – морфологическими и биохимическими (Kongkiantgam et al., 1995). Однако с применением этого типа ДНК-маркеров охарактеризована только небольшая часть современных сортов из Европы, Чили, Северной Америки и Японии (Kongkiantgam et al., 1996; Campos-de-Quiroz,

Ortega-Klose, 2001; Ulloa et al., 2003). Данные о генетической изменчивости украинских сортов клевера лугового, полученные с помощью RAPD-маркеров, в научной литературе отсутствуют. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение генетического разнообразия клевера лугового украинской селекции с помощью RAPD-анализа.

Объекты и методы исследований

В качестве растительного материала использовали 15 украинских образцов клевера лугового разного эколого-географического происхождения (табл. 1).

ДНК выделяли из смеси семян СТАВ методом (Ausubel et al., 1987). Для проведения ПЦР использовали 14 произвольных праймеров, из которых OPA-11, OPC-20, OPF-10, OPI-19, OPP-10, OPU-01, OPW-04, OPW-06, OPW-10, OPZ-04 разработаны в Operon Technologies (США), а P28, P37, P39, P52 в Южном биотехнологическом центре (Украина).

Аmplification ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе Терцик (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 20 нг ДНК и 0,2 мкМ праймера. ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 4 мин при 94°C, последующие 45 циклов с такими параметрами: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг праймера – 1 мин при 36°C, элонгация – 2 мин при 72°C; конечная элонгация – 7 мин при 72°C.

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Электродный буфер использовали с низкой ионной силой (Brody, Kern, 2004). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли при помощи трансиллюминатора TCP-20МС с последующим фотографированием гелей. В качестве маркера молекулярного веса для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали 1 kb DNA ladder.

Таблица 1.

Образцы клевера лугового и их происхождение

№ п/п	Сорт	Происхождение
1	Тернопольская 3	Тернопольская обл.
2	Тернопольская 4	
3	Дарунок	Киевская обл.
4	Кумач	
5	Маруся	
6	Мироновская 45	
7	Полис	
8	Полянка	Винницкая обл.
9	Агрос 12	
10	Анитра	
11	Политанка	Черниговская обл.
12	Спарта	
13	Фалкон	Полтавская обл.
14	Полтавская 75	
15	UDS 00131	Карпаты

Вычисление молекулярной массы продуктов амплификации проводили при помощи демоверсии программного пакета "TotalLab TL120".

По результатам анализа была составлена бинарная матрица на основе выявленных ампликонов с помощью 14 произвольных праймеров. В матрице присутствие ампликона обозначено цифрой 1, а отсутствие – 0. Каждый RAPD-компонент рассматривался как отдельный генетический локус. Уровень полиморфизма определяли как отношение числа полиморфных локусов к общему числу выявленных локусов, детектируемых с использованием каждого праймера, и выражали в процентах. Анализ генетического разнообразия проводили путем вычисления генетических расстояний по Nei и Li (Nei, Li, 1979). Для изучения генетических взаимоотношений между образцами клевера лугового строили дендрограмму методом ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ). Достоверность полученной дендрограммы проверяли с помощью бутстреп-анализа при 1000

повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ "PHYLIP-3.69".

Результаты и обсуждение

При использовании 14 произвольных праймеров было выявлено достаточное количество продуктов амплификации для дальнейшего анализа генетического разнообразия клевера лугового. Используемые праймеры дали возможность выявить полиморфизм между всеми тестируемыми образцами клевера лугового. Каждый исследуемый генотип клевера лугового отличался от других количеством фрагментов ДНК и их длиной (рис. 1). Количество стабильно воспроизводимых ампликонов варьировало от 5 до 15 для OPC-20 и OPP-10 соответственно и в среднем составило 9,6 ампликонов на один использованный праймер. Их размер варьировал в широких пределах: ~ от 141 до 2024 пн. Минимальный и максимальный размер продуктов детектировался с применением праймеров OPI-19 и OPP-10 соответственно (табл. 2). При анализе электрофореграмм удалось выявить уникальные фрагменты, которые характерны только для определенного образца клевера лугового. Так, у сорта Дарунок при амплификации ДНК с праймерами OPI-19 и OPW-10 обнаруживаются фрагменты длиной ~ 849 и 455 пн. соответственно. У некоторых других сортов также выявлены уникальные фрагменты разной длины – Мироновская 45 (~ 751 пн, OPU-01), Полтавская 75 (~1353 пн, OPF-10), Политанка (~296 пн, OPF-10), Тернопольская 3 (~ 2024 пн, OPP-10), UDS 00131 (~ 821 пн, OPP-10) и Кумач (~ 358 пн, P38). Такие фрагменты представляют интерес для дальнейших исследований, например, их можно использовать для идентификации изученных генотипов и конвертации в другой тип молекулярных маркеров – SCAR.

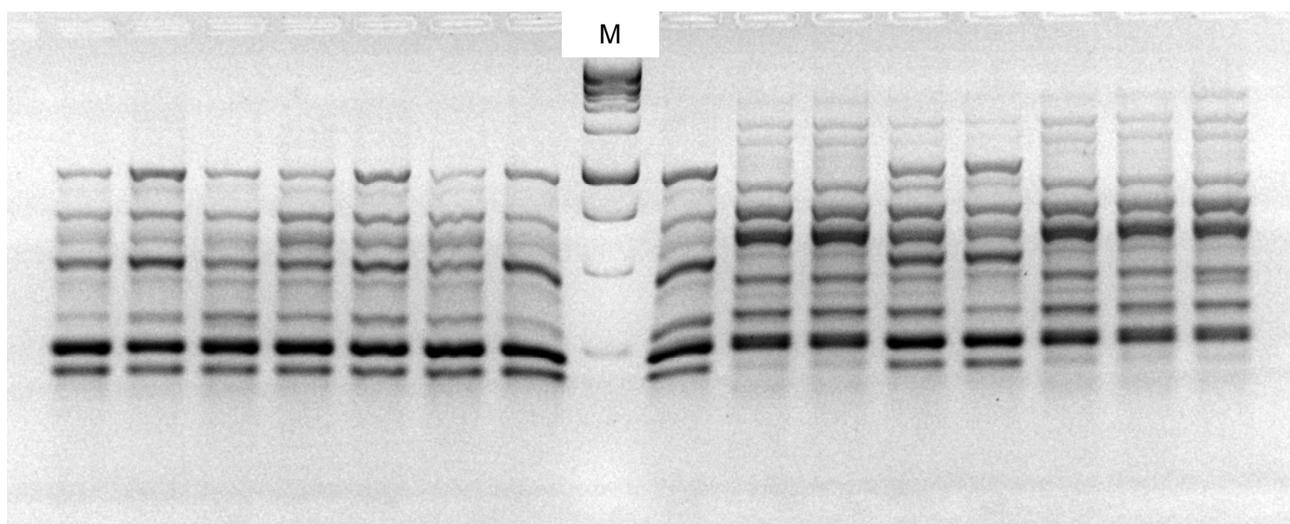


Рис. 1. RAPD-спектры 15 образцов клевера лугового, полученные с использованием праймера OPW-06

Примечание: М – маркер молекулярного веса 1 kb DNA ladder.

В общей сложности нами идентифицировано 134 RAPD-локуса, из которых 96 локусов оказались полиморфными. С использованием праймера P52 детектировался 100% полиморфизм, а самый низкий полиморфизм (14%) отмечен для праймера P37. В среднем уровень полиморфизма, выявляемый 14 произвольными праймерами, составил 71,6%, что является достаточно высоким показателем, зависящим не только от нуклеотидного состава праймеров, но и от вида тестируемых растений. Так, клевер луговой является перекрестноопыляемым энтомофильным растением, который в основном опыляется шмелями. Схожий уровень полиморфизма выявлен при изучении образцов клевера селекции других стран (Kongkiantgam et al., 1996; Ulloa et al., 2003).

Таблиця 2.

Последовательность произвольных праймеров и уровень полиморфизма, выявленный с помощью RAPD-анализа

Праймер	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Количество ампликонов, шт.	Количество полиморфных ампликонов, шт.	Полиморфизм, %
OPA-11	CAATCGCCGT	10	4	40
OPC-20	ACGGAAGTGG	5	2	40
OPF-10	GGAAGCTTGG	10	8	90
OPI-19	AATGCGGGAG	12	8	67
OPP-10	TCCCGCCTAC	15	14	93
OPU-01	ACGGACGTCA	13	9	62
OPW-04	CAGAAGCGGA	12	10	83
OPW-06	AGGCCCGATG	11	8	73
OPW-10	TCGCATCCCT	11	9	82
OPZ-04	AGGCTGTGCT	6	5	83
P28	CAAACGTCCG	6	4	67
P37	CTGACCAGCC	7	1	14
P39	CCAGTTCGCC	8	6	75
P52	AGGACTGGAC	8	8	100

Другой мерой оценки генетического разнообразия растений является установление генетических расстояний, формул для вычисления которых существует достаточное количество, и выбор той или иной метрики, прежде всего, зависит от типа данных. Традиционно при обработке бинарной матрицы, которая составляется на основе данных RAPD-анализа, рассчитывают значения N_{ei} и L_i . Нами была получена матрица генетических дистанций между исследуемыми образцами клевера лугового. Минимальное значение расстояния N_{ei} и L_i было выявлено между образцами Маруся и Тернопольская 4 и составило 0,000927, а максимальное – 0,01217 для пары сортов Агрос 12 и Тернопольская 4.

Для отображения закономерностей генетического сходства вовлеченных в анализ образцов клевера лугового была построена дендрограмма на основе алгоритма ближайших соседей с последующим бутстреп-анализом (рис. 2). Результаты группирования образцов клевера в полученном согласованном дереве позволили выделить два основных кластера. Первый кластер был представлен следующими сортами: Полянка, Агрос 12, Политанка, Анитра, Фалкон, Тернопольская 3, Дарунок и образец UDS 00131. Сорта Спарта, Кумач, Полис, Тернопольская 4, Полтавская 75 и Мироновская 45 сформировали кластер 2. Сорт Маруся расположен обособленно от остальных сортов, т.е. не вошел ни в один из кластеров. В целом выделенные кластеры по набору сортов клевера лугового были представлены образцами разного происхождения. Хотя некоторые закономерности в объединении генотипов клевера все же прослеживались, что, вероятно, связано не только с общностью их происхождения, но и с особенностями селекции. Так, все винницкие сорта вошли в первый кластер, что свидетельствует об их высоком генетическом сходстве. Такие же закономерности наблюдались для сортов киевской селекции. Сорт Полянка и Дарунок сгруппированы в один общий кластер, что является вполне логичным, т.к. для создания первого сорта в сложные скрещивания был вовлечен второй образец – Дарунок. Остальные сорта киевской селекции (Кумач, Полис и Мироновская 45) были объединены во втором кластере. Также интересным является разнесение сортов Тернопольская 3 и Тернопольская 4 в кластеры 1 и 2 соответственно. Нам известно, что эти сорта имеют разный тип развития – озимый для сорта Тернопольская 3 и яровой для сорта Тернопольская 4. Можно предположить, что такое группирование этих сортов связано с разными задачами, которые ставились при их создании, а также вовлечением в отбор совместно адаптационных признаков и определенных маркерных локусов, но это предположение требует проведения дополнительных исследований. К сожалению, информация о родословных других сортов у нас отсутствует.

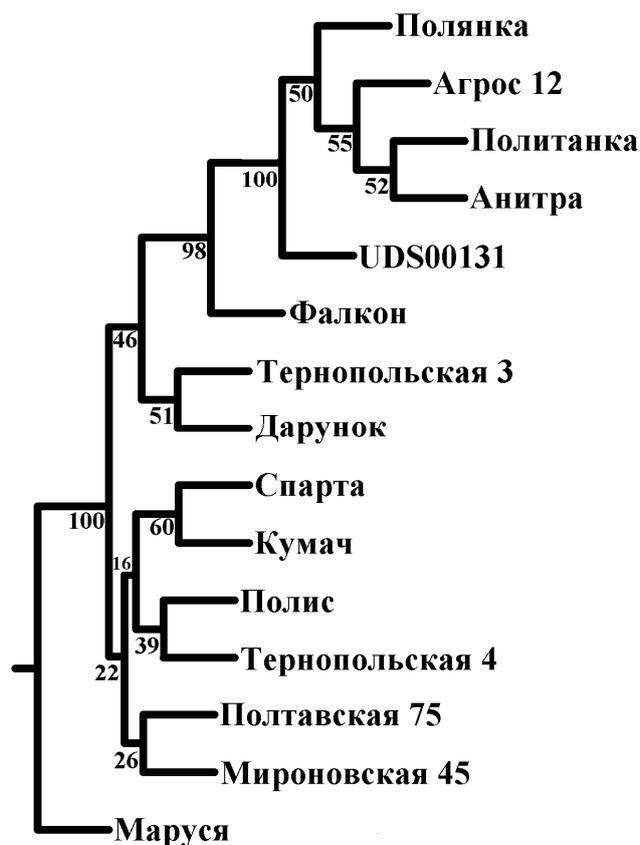


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе матрицы генетических расстояний Nei и Li , между сортами клевера лугового

Примечание: цифры у оснований внутренних узлов соответствуют бутстреп-значениям, %.

Немаловажным статистическим анализом построенного дерева является оценка его достоверности путем расчета бутстреп-значений, по которым можно судить о том, насколько правдоподобным является группирование изученных сортов клевера лугового. Так, образцы клевера, вошедшие в кластер 1, объединялись с высокими бутстреп-значениями по сравнению с сортами второго кластера. Бутстреп-оценка для узлов первого кластера составила от 50 до 100%, что свидетельствует о более вероятном группировании сортов клевера лугового. В кластере 2 был выявлен только один высоко достоверный узел между сортами Спарта и Кумач (бутстреп-поддержка 60%), остальные узлы имели низкие значения бутстрепа, что теоретически может приводить к иной топологии дерева.

Таким образом, при изучении коллекции украинских сортов клевера лугового RAPD-анализом был выявлен высокий уровень полиморфизма и достаточно высокая эффективность его использования для дифференциации генотипов клевера. Полученная информация может быть полезна для дальнейших исследований в области молекулярной генетики клевера, в частности, маркер-зависимой селекции, что значительно оптимизирует трудоемкий селекционный процесс.

Благодарности

Авторы выражают благодарность кандидатам сельскохозяйственных наук В.Н.Кирияну (Устимовская опытная станция НААНУ) и В.Д.Бугаёву (Институт кормов НААНУ) за предоставленные семена сортообразцов клевера лугового.

Список литературы

- Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. – 2004. – Т.40, №1. – С. 59–66. /Kozhukhova N.E., Sivolap Yu.M. Identifikatsiya i registratsiya genotipov kukuruzy pri pomoshchi molekulyarnykh markerov // Genetika. – 2004. – Т.40, №1. – С. 59–66. / Культурная флора: т. XIII. Многолетние бобовые травы (клевер, люцерна) / Под ред. Н.А.Мухиной и А.К.Станкевич. – М.: Колос, 1993. – 335с. /Kul'turnaya flora: t. XIII. Mnogoletniye bobovyeye travy (klever, lyadvenets) / Pod red. N.A.Mukhinoy i A.K.Stankevich. – М.: Kolos, 1993. – 335s./
- Попов В.Н., Урбанович О.Ю., Кириченко В.В. Исследование генетического разнообразия инбредных линий подсолнечника методами RAPD- и изоферментного анализов // Генетика. – 2002. – Т.38, №7. – С. 937–943. /Popov V.N., Urbanovich O.Yu., Kirichenko V.V. Issledovaniye geneticheskogo raznoobraziya inbrednykh liniy podsolnechnika metodami RAPD- i izofermentnogo analizov // Genetika. – 2002. – Т.38, №7. – С. 937–943./
- Чеботарь С.В., Сиволап Ю.М. Дифференциация, идентификация и создание базы данных сортов *T. aestivum* L. украинской селекции на основе STMS-анализа // Цитология и генетика. – 2001. – Т.35, №6. – С.18–27. /Chebotar' S.V., Sivolap Yu.M. Differentsiatsiya, identifikatsiya i sozdaniye bazy dannykh sortov *T. aestivum* L. ukrainskoy seleksii na osnove STMS-analiza // Tsitologiya i genetika. – 2001. – Т.35, №6. – С.18–27./
- Ausubel F.M., Brent R. Kingston R.E. et al. Current protocols in molecular biology. – New York: John Wiley & Sons, 1987. – P. 4.3.1–4.3.3.
- Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // BioTechniques. – 2004. – Vol.36. – P. 214–216.
- Campos-de-Quiroz H., Ortega-Klose F. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers // Euphytica. – 2001. – Vol.122. – P. 61–67.
- Herrmann D., Boller B., Widmer F., Kölliker R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover // Genome. – 2005. – Vol.48. – P. 474–486.
- Isobe S., Klimenko I., Ivashuta S. et al. First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol.108. – P. 105–112.
- Isobe S., Kölliker R., Hisano H. et al. Construction of a consensus linkage map for red clover (*Trifolium pratense* L.) // BMC Plant Biology. – 2009. – 9: 57.
- Klimenko I., Razgulayeva N., Gau M. et al. Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol.120. – P. 1253–1263.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Fortin M.G., Coulman B.E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers // Euphytica. – 1995. – Vol.84. – P. 237–246.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Coulman B.E., Fortin M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA // Euphytica. – 1996. – Vol.89. – P. 355–361.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – Vol.76. – P. 5269–5273.
- Sato S., Isobe S., Asamizu E. et al. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.) // DNA Research. – 2005. – Vol.12. – P. 301–364.
- Ulloa O., Ortega F., Campos H. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers // Genome. – 2003. – Vol.46. – P. 529–535.

Представлено: Р.Л.Богуславський / Presented by: R.L.Boguslavsky

Рецензент: Л.О.Красильнікова / Reviewer: L.A.Krasil'nikova

Подано до редакції / Received: 03.03.2011.