

## ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ ГИБРИДНЫХ ФОРМ РОДОДЕНДРОНОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

**О.Г. Васильева<sup>1</sup>, А.А. Криницына<sup>2</sup>, О.А. Чурикова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Главный ботанический сад РАН, Россия, г. Москва

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова

Формирование живых коллекций растений *in vivo* и *in vitro* позволяет сохранять ценные генотипы, размножать растения, проводить целый комплекс фундаментальных и прикладных исследований, получать оздоровленный материал для использования в селекционной работе. Создание таких коллекций обуславливает необходимость проведения исследований, подтверждающих идентичность исходных образцов и полученных в асептической культуре регенерантов. Особенное значение такие исследования имеют для видов, легко скрещивающихся между собой с образованием гибридных форм. В работе показана возможность и целесообразность использования ядерных и хлоропластных молекулярных маркеров для идентификации генотипов гибридных форм рододендронов при культивировании их *in vivo* и *in vitro*, с достаточно высокой степенью достоверности полученных результатов, что является важнейшим условием при депонировании растений в живые коллекции.

**Ключевые слова:** рододендрон, молекулярные маркеры, генотип, культивирование *in vivo* и *in vitro*

Последнее время большое внимание уделяется созданию коллекций живых организмов, в том числе и живых растений. Одним из удобных способов их создания является депонирование растений в стерильной культуре. Формирование таких коллекций позволяет не только сохранять ценные генотипы, но и, при необходимости, размножать растения, проводить целый комплекс фундаментальных и прикладных исследований, получать оздоровленный материал для использования в селекционной работе. Один из важных моментов – прослеживаемость генотипической идентичности получаемых растений исходным образцам. Особенно это касается растений, родиной которых являются отдаленные от места создания коллекции регионы, что приводит к необходимости использовать в качестве маточных растений интродуцированные экземпляры, растущие в коллекциях ботанических садов или частных собраниях. Особое внимание необходимо уделять родам, виды которых легко скрещиваются между собой с образованием гибридных форм. Для них важно разрабатывать схемы, позволяющие прослеживать генотипическую идентичность маточных растений и регенерантов в стерильной культуре.

Одним из таких родов является род *Rhododendron* (сем. *Ericaceae*). Для растений этого рода свойственна естественная гибридизация, особенно для видов, произрастающих на ограниченных территориях. Например, в подроде *Rhododendron* subg. *Hymenanthes* (Blume) K. Koch, насчитывающем в своем составе около 225 видов, на территории восточных Гималаев и в провинции Юннань (Китай) было выявлено более 15 естественных гибридов [5, 7].

Способность к межвидовой гибридизации также активно используется для получения новых эффектных форм рододендронов, сочетающих в себе высокую декоративность с признаками адаптации к различным условиям среды. На сегодня получено более 1000 культурных гибридных форм, которые активно используются в озеленении. Одна из таких гибридных форм, отличающаяся высокодекоративными свойствами и хорошей зимостойкостью, в единственном экземпляре выращивается в коллекции лаборатории дендрологии ГБС РАН им. Н.В. Цицина на экспозиции «Вересковый сад» с начала 2000-х годов.

Для определения генетической стабильности растений, в том числе, получаемых в стерильной культуре, используют такие маркерные системы, как RAPD, ISSR и другие, каждая из которых показала неплохие результаты для разных видов рододендронов. Дополнительно

используют информацию о структуре участков ядерных и хлоропластных геномов. В частности, последовательность нуклеотидов внутреннего транскрибуируемого спайсера между генами, кодирующими 18S и 25S рРНК, включающий ген 5.8S рРНК, а также некоторые участки пластомной ДНК, такие как часть гена, кодирующего матуразу K и/или межгенный спайсер trnK-matK, участок пластома trnL-trnF. Гибриды, как правило, сочетают в себе морфологические признаки обоих родителей, а по молекулярным данным демонстрируют несоответствие филогении по ядерным и хлоропластными участкам.

Целью работы была оценка возможности использования ядерных и пластомных маркерных последовательностей для подтверждения идентичности генотипов маточных растений, особенно в случае отсутствия достоверной информации об их происхождении, и растений, полученных в стерильной культуре.

Для работы была выбрана гибридная форма из открытого грунта, произрастающая в «Вересковом саду» и растения из стерильной культуры на стадии размножения после 6 пассажей, полученные в результате микроклонального размножения указанной формы в лаборатории биотехнологии растений ГБС им. Н.В. Цицина РАН. Молекулярно-биологические исследования проводили в лаборатории биологии развития растений каф. Высших растений биологического факультета МГУ.

Методика биотехнологических исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений, а также методиках, разработанных в лаборатории биотехнологии растений [1, 3]. Для индукции культуры в качестве первичных эксплантов использовали терминальные вегетативные почки активно растущих побегов текущего года (последняя декада мая – начало июня) с небольшим участком стебля, которые после стерилизационной обработки помещали на питательную среду Андерсона [4] с добавлением ИУК и 2iР в соотношении 1:5 (1 и 5 мг/л соответственно). При дальнейшем культивировании на стадии, собственно, микроразмножения увеличивали концентрацию гормонов до 4 и 15 мг/л соответственно. Культивирование *in vitro* проводили в условиях люминостатной комнаты при 16-часовом фотопериоде, освещенности 2000 лк, температуре 23-25°C и влажности воздуха 70%.

ДНК выделяли из листьев растений рододендрона из открытого грунта и стерильной культуры с использованием СТАВ-метода с модификациями [2], качественную и количественную оценку проводили при помощи спектрофотометрического и флуориметрического методов, соответственно. Для определения генотипа по rDNA, а также хлоропластных гаплотипов использовали участки (1) ITS, (2) trnK-matK, (3) matK, (4) trnL-trnF. ПЦР с праймерами на указанные области проводили с использованием набора реактивов для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl<sub>2</sub>) (Биолабмикс, Россия) по программам 95°C - 5 мин, 35 циклов 95°C - 15 сек, 55°C - 20 сек, 72°C - 30 сек, 72°C - 5 мин (для амплификации участка ITS) и 95°C - 5 мин, 35 циклов 94°C - 60 сек, 50°C - 1 мин с увеличением температуры на 0.3°C/с; 65°C - 5 мин, 65°C - 5 миг; 65°C - 5 мин (для амплификации участков хлоропластной ДНК).

Для оценки генетической стабильности растений использовали праймеры UBC807, 808, 810 и HB12, амплификацию проводили по программе 94°C - 5 мин, 38 циклов 94°C - 15 сек, 58°C - 20 сек, 72°C - 2 мин, финальная элонгация 72°C - 10 мин.

Детекцию продуктов амплификации проводили в 1,8% агарозном геле в буфере ТВЕ с последующим окрашиванием бромистым этидием. Очистку продуктов амплификации для последующего секвенирования по Сэнгеру проводили при помощи набора Cleanup-mini (Евроген, Россия). Секвенирование по Сэнгеру осуществляли в компании Евроген с уникальными праймерами. Анализ данных секвенирования проводили с использованием программ BioEdit и MEGAX, базы данных NCBI. Результаты ПЦР вносили в бинарную матрицу для проведения дальнейшего анализа при помощи макроса GenAlEx 6.41 [6].

В результате анализа данных секвенирования маркерных последовательностей маточного растения и растений-регенерантов было показано, что и ядерные (ITS1-ITS2), и хлоропластные участки (matK, trnL-trnF и межгенный спайсер trnK) имеют 100% идентичность друг с другом. Несмотря на то, что взятый в работу образец имеет гибридное происхождение, исследуемый участок ядерного генома не имеет ни одной полиморфной позиции. На филогенетических

деревьях, построенных с использованием метода Maximum Likelihood, хлоропластные участки объединяются в один кластер с высоким уровнем поддержки. Кроме того, в этот же кластер попадают и последовательности вида, который, скорее всего, принимал участие в формировании исследуемой гибридной формы. Похожая картина была получена и при анализе последовательностей ITS.

При проведении амплификации с использованием 4 ISSR праймеров были получено суммарно 53 фрагмента, размер которых находился в диапазоне 200-1200 п.н. Анализ генетической однородности исходного растения и двух растений-регенерантов также показал 100% их сходство между собой. На полученной дендрограмме образец исходного растения и образцы растений-регенераторов из стерильной культуры объединились в один обособленный кластер.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования ядерных и хлоропластных молекулярных маркеров, в том числе, для идентификации и подтверждения идентичности генотипов гибридных форм рододендронов при культивировании их *in vivo* и *in vitro*. Изучение участков геномов, которые используют при баркодинге и видовой идентификации, позволяет провести дополнительную верификацию систематической принадлежности растения, которое депонируется в живую коллекцию. Такой подход, на наш взгляд, позволяет получить результаты достаточно высокой степени достоверности, что является важнейшим условием для создания живых коллекций растений.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках ГЗ МГУ имени М.В. Ломоносова №121032500082-2 и ГЗ ГБС РАН № 122042700002-6

Авторы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории дендрологии ГБС РАН им. Н.В. Цицина к.б.н. И.О. Яценко за предоставленный материал из коллекции открытого грунта.

### Библиографический список

1. Васильева О.Г. Биолого-морфологические основы клonalного микроразмножения некоторых представителей рода *Rododendron* L. Автореферат дисс. канд. биол. наук. М.: ГБС РАН, 2009, 22 с.
2. Криницына А.А., Меркушкин Д.С., Чурикова О.А. Возможность использования системы SRAP для молекулярной паспортизации сортов сирени в сборнике Всероссийской конференции «Коллекции как основа изучения генетических ресурсов растений и грибов» (в рамках первого научного форума «Генетические ресурсы России», 21–24 июня 2022 г.). Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, тезисы, с. 26.
3. Молканова О.И., Королева О.В., Стажеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелещук Е.А. Совершенствование технологии клonalного микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий. Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т.32. – № 9. – С. 66 – 69.
4. Anderson W.C. A revised tissue cultured medium for shoot multiplication of rhododendron. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1984. – Vol. 109. – P. 343-347.
5. Chamberlain D.F. A revision of *Rhododendron* II: subgenus *Hyemanthes*. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh. – 1982. – Vol. 39. - P. 209 – 486.
6. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288-295.
7. Zhang J.L., Zhang C.Q., Gao L.M. et al. Natural hybridization origin of *Rhododendron agastum* (Ericaceae) in Yunnan, China: inferred from morphological and molecular evidence. J Plant Res. – 2007. – Vol. 120. – P.457-463