

УДК 577.21:635.142

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОБРАЗЦОВ ПЕТРУШКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD И ISSR МАРКЕРОВ

А.С. Домблидес, Е.А. Домблидес, В.А. Харченко, Г.А. Потехин

(Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур; e-mail: arthurdom@inbox.ru)

RAPD и ISSR маркеры были использованы для классификации 32 образцов петрушки (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill), включая корневые и листовые разновидности. 51 RAPD и 66 ISSR маркеров было амплифицировано с пятью RAPD и шестью SSR праймерами. Среднее количество полос в ISSR-спектрах составляло 11, а в RAPD-спектрах 10,2. Матрица генетических расстояний между изучаемыми образцами была построена с применением коэффициента Жаккарда. Дендрограмма, построенная UPGMA методом, графически отражала значения генетических дистанций. Расстояние между корневыми и листовыми формами петрушки составляло 0,292.

Ключевые слова: *Petroselinum crispum* [Mill.] Nym ex A.W. Hill, RAPD, ISSR, коэффициент Жаккарда.

Петрушка относится к роду *Petroselinum* Hill. семейства зонтичные Apiaceae. Вид *Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill, $2n = 22$ представлен двулетними растениями, которые повсеместно выращивают и применяют в медицине и кулинарии. Центр происхождения петрушки расположен по берегам Средиземноморского бассейна, где она и сейчас встречается в диком виде. По внешним признакам среди культурных форм можно выделить три основные разновидности: листовая обыкновенная (*var. vulgare* (Nois.) Danert), курчавая (*var. crispum* Gand.) Mazk.) и корневая, известная ранее как *var. radicosum*. (Alef) Danert, а сейчас часто упоминающаяся как *var. tuberosum* (Bernh.) Mart. Crov. Генетические взаимоотношения между различными разновидностями петрушки остаются пока не выясненными. Публикаций, посвященных изучению общего генетического разнообразия петрушки с использованием молекулярных маркеров, крайне мало. Методы, основанные на анализе полиморфизма амплифицированных ДНК фрагментов, широко используют для определения уровня генетической изменчивости и для выявления филогенетических отношений между растениями. Методы, которые не требуют предварительной информации о последовательности ДНК, такие как RAPD [1, 2] и ISSR [3], по отдельности и в комбинации показали свою эффективность в филогенетических исследованиях растений.

Материалы и методы

Изучены 32 образца петрушки из коллекции лаборатории зеленных и пряно-вкусовых культур

ВНИИССОК, включающей семь образцов из Всероссийского института растениеводства имени Вавилова (ВИР) и коммерческие сорта семеноводческих компаний (таблица). При выделении суммарной ДНК применяли метод с использованием СТАВ-буфера [4] и двукратной депротенинизацией хлороформом. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием реагентов и праймеров производства компании "СИНТОЛ", Москва. Процедура RAPD-анализа соответствовала стандартному протоколу [5]. Для проведения ISSR-анализа подбирали оптимальную температуру отжига микросателлитных праймеров на ДНК матрице в диапазоне от 46 до 52°. Продукты амплификации разделяли для RAPD-фрагментов в 1,7%-м агарозном геле в $1 \times$ TBE-буфере, а ISSR-фрагменты разделяли в 2%-м агарозном геле SFR высокого разрешения (Amresco, США) и окрашивали бромистым этидием. Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс 100 bp DNA ladder (MBI FERMENTAS, Латвия). Учитывали только четкие ДНК-фрагменты, воспроизводимые в трех независимых экспериментах. Для классификации образцов петрушки использовали пять RAPD-праймеров (FPT12, OPD03, OPA10, FPT16, OPC19), отобранных из 20 и 6 микросателлитных праймеров ((ca)₈gc, (ca)₈g, (ggat)₄, (ac)₈yt, (tg)₈gc, (ca)₈rg), отобранных из 13. Анализ результатов проводили с использованием программ GenStat ver. 6 [6] и TREECON [7]. Коэффициент Жаккарда [8] был использован для построения матрицы генетической схожести. Индексы бутстрепа представлены в процентах для 1000 реплик.

Исследованные образцы петрушки (*Petroselinum crispum* (Mill) Nym).

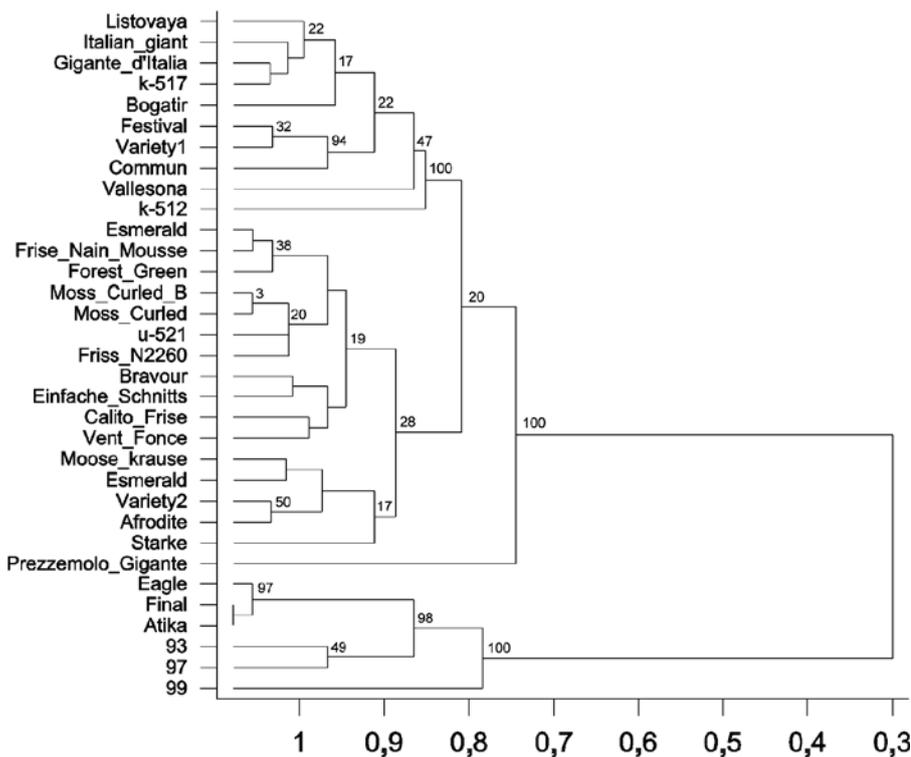
№	Название	Происхождение	Разновидности
1	Эсмеральда/Esmérald	“Гавриш”	Кудрявая
2	Мооскраузе/Moose krause	“Модуль”	Кудрявая
3	Frise Nain Mousse	Франция	Кудрявая
4	Variety 2	США	Кудрявая
5	Bravour	Великобритания	Кудрявая
6	Afrodite	Германия	Кудрявая
7	Forest Green	США	Кудрявая
8	Starke	США	Кудрявая
9	Calito Frise	Франция	Кудрявая
10	Moss Curled B	—	Кудрявая
11	Vent Fonce	Франция	Кудрявая
12	Einfache Schnitts	Германия	Обыкновенная
13	Gigante d'Italia	Италия	Обыкновенная
14	Vallesona	Германия	Обыкновенная
15	Festival	Германия	Обыкновенная
16	Variety 1	США	Обыкновенная
17	Богатырь/Bogatir	“Семена НК”	Обыкновенная
18	Итальянский гигант/Italian Giant	“Престиж”	Обыкновенная
19	Листовая обыкновенная/Listovaya	“Поиск”	Обыкновенная
20	U-521	ВИР	Обыкновенная
21	K-512	ВИР	Обыкновенная
22	Prezzemolo Gigante	ВИР	Обыкновенная
23	Commun	ВИР	Обыкновенная
24	Friss 2260	ВИР	Обыкновенная
25	Moss-Curled	ВИР	Обыкновенная
26	K-517	ВИР	Обыкновенная
27	Atika	Чехия “SEMO”	корневая
28	Eagle	“Enza Zaden”	корневая
29	Финал/Final	“Гавриш”	корневая
30	образец 97	ВНИИССОК	корневая
31	образец 99	ВНИИССОК	корневая
32	образец 93	ВНИИССОК	корневая

Результаты и обсуждение

Среднее количество амплифицированных RAPD-фрагментов составило 10,2, а ISSR-фрагментов — 11. Образцы, которые отличались по ISSR-спектрам, как правило, также выделялись и при RAPD-анализе, и общий процент полиморфизма составляет 95%. Наибольший полиморфизм был выявлен с использованием микросателлитного праймера с TG повторами (до 100%). Нужно отметить, что из общего количества продуктов амплификации 23 ДНК-фрагмента были специфичны только для корневых

форм петрушки, а 22 присутствовали у листовых и отсутствовали у корневых образцов.

Дендрограмма, построенная методом UPGMA на основе совместного анализа RAPD и ISSR маркеров, отображает генетические взаимоотношения между изученными образцами (рисунок). Наиболее удаленные (0,292) друг от друга два больших кластера, имеющие максимальную поддержку, соответствуют листовым и корневым разновидностям петрушки. В кластере листовых образцов с большим значением генетической схожести (0,858) образовались два подкластера листовых кудрявых и листо-



UPGMA дендрограмма генетических расстояний между разновидностями и сортами петрушки, построенная по результатам анализа RAPD и ISSR маркеров

вых обыкновенных форм. В кладе листовой петрушки с обыкновенным типом листа диапазон генетической схожести варьирует от 0,873 до 0,921, в то время как у листовых кудрявых форм этот показатель составляет от 0,845—0,924. Два образца U-521 (ВИР) и Einfache Schnitts с обыкновенным типом листа попали в кластер с кудрявыми формами петрушки.

Низкие значения бутстрепа показывают невысокую степень надежности разделения в кластере

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalsky J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acids Res. 1990. N 18. P. 6531—6535.
2. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucleic Acids Res. 1990. N 18. P. 7213—7218.
3. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. N 20. P. 176—183.
4. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II // Plant Mol. Biol. Rep. 1983. N 1(4). P. 19—21.
5. Waugh R. RAPD Analysis: use for genome characterization, tagging traits and mapping // Plant Molecular Bio-

листных форм. Нечеткое разделение между листовыми формами может быть объяснено мультилокусной природой наследования признака формы листа. Также не было отмечено высокоспецифичных фрагментов для каждой из листовых форм петрушки в амплифицированных ДНК-спектрах. Только итальянский генотип с темно-зеленым, большим и гладким листом Prezzemolo Gigante d'Italia отделился от других форм петрушки, что может подтвердить в данном случае его отношение к часто отдельно выделяемой листовой разновидности *neapolitanum* Darnet. В подкластере корневых разновидностей коэффициент Жаккарда составляет 0,889—0,989. Об определенном разделении листовых и корневых форм петрушки с помощью молекулярных, биохимических и морфологических данных сообщалось ранее [9], тем не менее информации о ДНК-маркерах, позволяющих дифференцировать разновидности листовых

кудрявых и обыкновенных форм петрушки, не было дано. Эти листовые разновидности в нашем исследовании оказались генетически очень близкими. Впервые проведенный ISSR-анализ петрушки выявил достаточное количество микросателлитных повторов для филогенетических исследований *Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill. Комбинированное использование двух типов маркеров позволяет успешно применять их в филогенетических исследованиях растений.

- logy — A Laboratory Manual / Ed. S. Melody. Clark. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. P. 305—333.
6. GenStat 6 Committee. The guide to GenStat release 6.1. VSN. Oxford: International Ltd., 2002.
7. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. Vol. 10. P. 569—570.
8. Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale // Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 1908. Vol. 44. P. 223—270.
9. Lohwasser U., Dittbrenner A., Marthe F., Borner A. Taxonomy of plant genetic resources — an interaction of morphological, molecular and phytochemical data // Eucarpia 19 Genetic Recourses Section/Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije, 2009. P. 36.

Поступила в редакцию 14.04.10

RAPD AND ISSR MARKERS FOR STUDY OF GENETIC VARIATION AMONG PARSLEY (*PETROSELINUM CRISPUM* (MILL.) NYM.) ACCESSIONS

A.S. Domblides, E.A. Domblides, V.A. Kharchenko, G.A. Potekhin

Five RAPD primers out of 20 and 6 SSR primers out of 13 were selected to discriminate 33 accessions of parsley (*Petroselinum crispum* [Mill] Nym. ex A.W. Hill). In the total, 51 RAPD and 66 ISSR bands were generated with these primers. The UPGMA dendrogram based on the Jaccard's coefficients was constructed. The two clusters of leaf and root plant forms were the most distant at similarity 0,292 from each other. Consequently, root form-specific markers were observed. Not all flat leaf and curly-leaf forms have been clearly separated, but some of curly-leaf accessions formed their own sub-cluster.

Key words: *Petroselinum crispum* [Mill] Nym. ex A.W. Hill., RAPD, ISSR, Jaccard's coefficient.

Сведения об авторах

Домблидес Артур Сергеевич — канд. с.-х. наук, зав. сектором ПЦР диагностики Всероссийского научно-исследовательского института селекции и семеноводства овощных культур. Тел. (495)780-91-78; 8-916-836-27-01; e-mail: arthurdom@inbox.ru

Домблидес Елена Алексеевна — канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., сектор ПЦР диагностики Всероссийского научно-исследовательского института селекции и семеноводства овощных культур. Тел. (495)780-91-78; 8-916-593-22-32; e-mail: Edomblides@mail.ru

Харченко Виктор Александрович — канд. с.-х. наук, зав. лабораторией зеленных и пряно-вкусовых культур Всероссийского научно-исследовательского института селекции и семеноводства овощных культур. Тел. (495)780-91-78; 8-916-187-17-56; e-mail: kharchenkoviktor777@gmail.com

Потехин Григорий Анатольевич — аспирант, лаборатория зеленных и пряно-вкусовых культур Всероссийского научно-исследовательского института селекции и семеноводства овощных культур. Тел. (495)780-91-78.