

© Т. В. Матвеева<sup>1</sup>,  
О. С. Машкина<sup>2</sup>, Ю. Н. Исаков<sup>3</sup>,  
Л. А. Лутова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский  
государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Воронежский государственный  
университет, Воронеж, Россия

<sup>3</sup> ФГУП Научно-  
исследовательский институт  
лесной генетики и селекции,  
Воронеж, Россия

✿ На 4 клонах карельской березы (*Betula pendula* Roth var *carelica* Merckl.) из коллекции карельской березы лаб. генетики НИИЛГиС, одном образце березы повислой (*Betula pendula* Roth.) и одном образце березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.), взятых из природы в качестве контроля, проанализирована возможность использования ПЦР с полуслучайными 12- и 15-членными праймерами — semi-RAPD для их молекулярной паспортизации. Выявлены праймеры, дающие наиболее высокий процент полиморфных маркеров. Данные праймеры могут быть рекомендованы для типирования образцов березы.

✿ **Ключевые слова:** береза; semi-RAPD; молекулярная паспортизация

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ КЛОНОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ ПРИ ПОМОЩИ ПЦР С ПОЛУСЛУЧАЙНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ

УДК 575.222

### ВВЕДЕНИЕ

Молекулярное маркирование находит широкое применение как в фундаментальной генетике, так и в прикладных отраслях биологической науки. Одним из его приложений является паспортизация ценных генотипов. Молекулярные маркеры (**ММ**), основанные на применении ПЦР являются наиболее активно используемыми в силу простоты и дешевизны метода (Гостимский и др., 2005; Хлесткина, Салина, 2006). Одним из наиболее распространенных из них является RAPD (random amplified polymorphic DNA — случайная амплифицированная полиморфная ДНК). Метод не требует знаний последовательности ДНК-мишени. RAPD-маркеры генерируются амплификацией случайных сегментов ДНК при использовании одиночных праймеров любой последовательности (Williams et al., 1990). Образующиеся ПЦР-продукты являются генотип-специфичными и могут быть легко разделены в агарозном геле. Этот метод нерадиоактивный, требует наногаммы ДНК и применим к широкому спектру видов. Как правило, в работе используют десятинуклеотидные праймеры, содержащие более 50 % GC. Однако, можно использовать и более протяженные праймеры, но при этом температура их отжига должна быть значительно ниже оптимальной. Для увеличения количества комбинаций ПЦР можно использовать не отдельные праймеры, а комбинировать их в пары. «Двупраймерный» RAPD дает больше мелких фрагментов, чем стандартная методика; при этом больше половины синтезированных продуктов отличаются от «однопраймерного» RAPD (Welsh, McClelland, 1991; Hu et al., 1995)

Менее распространенным на данный момент является метод, основанный на использовании праймеров, содержащих консервативную и случайную части. В качестве консервативных частей используют последовательности ДНК двух (левой и правой) интрон-экзонных границ. В работах Пржетакевич и соавт. (Przetakewicz et al., 2002) и Гавел и соавт. (Gawel et al., 2002), консервативные части праймеров составляли в длину 7 и 9 нуклеотидов, а их последовательности были следующими: AGCAGGT и АСТТАССТG. В различных источниках, говоря о данном методе, используют термины «полуспецифичные праймеры» (semi-specific primers) или «полуслучайные маркеры» (semi-random markers) (Przetakewicz et al., 2002; Gawel et al., 2002), нам кажется логичным обозначить метод как semi-RAPD, поскольку он имеет много общих черт с RAPD, но отличается от него полуслучайной последовательностью праймеров, а следовательно и частично предопределенным местом их отжига. Метод хорошо себя зарекомендовал при картировании пшеницы, тритикале и картофеля, редиса.

Карельская береза (*Betula pendula* Roth var *carelica* Merckl.) представляет большую хозяйственную ценность, благодаря высокодекоративной узорчатой текстуре древесины. В лаб. генетики ФГУП НИИЛГиС разработаны технологические приемы клонального микроразмножения взрослых (20–40-летних) экземпляров хозяйственно ценных узорчатых форм (Бутова и др., 1990; Машкина и др., 1999). Клоны, полученные на их основе, в подавляющем большинстве случаев имеют нормальный фенотип и развитие, сохраняют специфичные для их исходных генотипов особенности роста. К их числу относятся использованные в данной работе клоны высокоствольной (клоны Ю и Ш-3), а также короткоствольной (клон А) формы. В тоже время в процессе микроразмножения отмечены случаи соматоклональной изменчивости. Она проявилась как на уровне отдельных пробирочных растений (формирующих вместо корней каллусоподобное образование — клон Л), так и вегетирующих *in vivo* растений

Поступила в редакцию 15.06.2008  
Принята к публикации 25.09.2008

Таблица 1

## Краткая характеристика клонов узорчатых форм карельской берёзы, находящихся в пробирочной культуре

Клон	№ исходного дерева	Форма	Морфо-биологические особенности клона
А	ПК-2	Коротко-ствольная	Нормальный фенотип, хороший рост, развитые корни. Укореняемость микропобегов — $94,9 \pm 1,9 \%$
Л	7319, получено от свободного опыления дерева ПК-2	Коротко-ствольная	Соматональный вариант с комплексом измененных признаков. Хороший рост побегов в высоту, при полном отсутствии способности к укоренению. В базальной части микропобегов образуется вместо корней морфогенный «каллус». На средах без гормонов изолированный «каллус» проявляет гормон-независимость и регенерирует множество адвентивных почек и побегов. В пазухе листьев закладывается не одна, а группа (2–6 и более) пазушных почек, развивающихся в новые боковые побеги в пределах цикла микрочеренкования. Листья гофрированные с хорошо выраженными зубчатыми краями (сложнопильчатые)
Ю	Ш-3	Высоко-ствольная	Нормальный фенотип, хороший рост в высоту, развитые корни. Укореняемость микропобегов — $90,9 \pm 1,6 \%$
Ш-3	Ш-3	Высоко-ствольная	Нормальный фенотип, хороший рост в высоту, развитые корни. Укореняемость микропобегов — $95,6 \pm 2,5 \%$

(появление среди клонов высокоствольной формы карельской берёзы карликов). Такие генетические вариации служат удобной моделью для изучения генетики развития.

Целью данной работы было исследование возможности использования ПЦР с полуслучайными праймерами для молекулярной паспортизации клонов берёзы.

В конкретные задачи работы входило:

- 1) оценить количество и долю полиморфных ММ, выявляемых у клонов берёзы методами semi-RAPD с одиночными 12-членными праймерами, с одиночными 15-членными праймерами и их двупраймерными комбинациями;
- 2) выявить полиморфные маркеры, характеризующие исследуемые клоны берёзы;

- 3) выявить праймеры, перспективные для молекулярного маркирования клонов берёзы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовались клоны из коллекции ценных генотипов карельской берёзы, поддерживаемой в длительной культуре (*in vitro*) — свыше 10 лет. Клоны А и Ш-3 были получены путем прямой регенерации (пролиферация пазушных меристем узлового сегмента), а клоны Л и Ю — путем регенерации растений через стеблевые каллусные культуры с последующим их микрочеренкованием и длительным культивированием на питательных средах без гормонов. Клон Л характеризуется способностью обазовывать каллусоподобные структуры вместо корней в культуре *in vitro* (рис. 1) (Машкина и др., 1999; Машкина, Табацкая, 2005). Исходные деревья карельской берёзы финского происхождения отобраны в испытательных культурах проф. М. М. Вересина. Характеристика клонов представлена в таблице 1.

В качестве контроля использовались нормальные по фенотипу деревья берёзы повислой (*Betula pendula* Roth) и берёзы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.).

ДНК выделяли по модифицированной нами ранее методике Дрейпера и Скотта (Matveeva et al., 2003).

ПЦР проводили в объеме 50 мкл с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-технологии»). Реакционная смесь содержала 10 нг ДНК, 10 пкМ праймера (-ов), 2,5 U Taq полимеразы (Силекс М), буфер, предложенный фирмой-производителем фермента (концентрация  $Mg^{2+}$  в  $1 \times$  буфере Силекс М составляет 2,5 мМ) и 200 мкМ каждого dNTP. Semi-RAPD анализ был проведен в двух вариантах: с использованием 12- и 15-членных праймеров, последовательности которых приведены в таблице 2, а схематичное изображение — на рисунке 2. Праймеры синтезированы фирмой «Синтол». Для каждого варианта

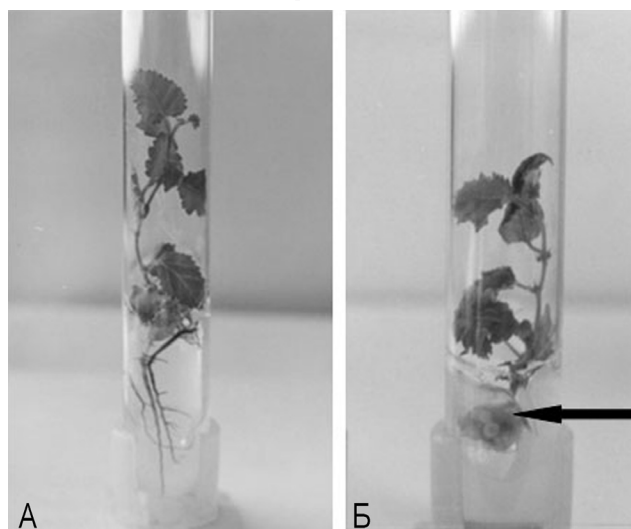


Рис. 1. Размноженные *in vitro* клоны карельской берёзы: нормальное по фенотипу растение клона Ю (а) и соматональный вариант Л (б). Стрелкой показано разрастание тканей основания побега.

Таблица 2

## Последовательности полуслучайных праймеров

Название	Последовательность 5'–3'
12-членные праймеры	
SR1	AGCAGGTCAGGC
SR2	AGCAGGTTGCCG
SR3	AGCAGGTAGTCA
SR4	AGCAGGTAATCG
SR5	AGCAGGTAGGTC
SR6	AGCAGGTGGTCC
SR7	AGCAGGTGAACG
SR8	AGCAGGTGTGAC
SR9	AGCAGGTGGGTA
SR10	AGCAGGTGTGAT
15-членные праймеры	
SR11	ACTTACCTGCCCTTC
SR12	ACTTACCTGGAGCTG
SR13	ACTTACCTGAGCCAC
SR14	ACTTACCTGCGCCGT
SR15	ACTTACCTGGTCTTG
SR16	ACTTACCTGCCTGAC
SR17	ACTTACCTGCGGGTG
SR18	ACTTACCTGCGTAGG
SR19	ACTTACCTGAACGCC
SR20	ACTTACCTGTCGCAG

использовано по 10 праймеров. Кроме того, проведены ПЦР с 22 двупраймерными комбинациями 15-членных праймеров.

ПЦР с использованием 12-членных праймеров проводили по программе: 5 мин. 93 °С, 33 цикла (17 сек. 93 °С, 40 сек. 37 °С, 40 сек. 72 °С), далее 5 мин. 72 °С.

ПЦР с использованием 15-членных праймеров проводили по программе: 5 мин. 93 °С, 7 циклов (17 сек. 93 °С, 40 сек. 46 °С, 40 сек., 72 °С), 26 циклов (17 сек. 93 °С, 40 сек. 48 °С, 40 сек., 72 °С), далее 5 мин. 72 °С.

Данные температурные условия реакций были выбраны на основании предварительных экспериментов как дающие наиболее стабильные и воспроизводимые результаты.

Фрагменты разгоняли в 1%-м агарозном геле на 1-кратном буфере ТВЭ. В качестве маркера молекулярных весов использовали 100 bp + 1,5 kb ladder («Сибэнзим»), или 1 kb ladder («Медиген»).

В случае наблюдения межклоновых различий среди продуктов реакций проводили повторные ПЦР для оценки воспроизводимости результатов.

Документацию результатов осуществляли с использованием системы ввода и анализа изображения («Силекс М»).

## СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ.

Для каждого варианта опыта подсчитывали среднее количество ММ для конкретного праймера, или двупраймерной комбинации, его ошибку. Сравнение методов по

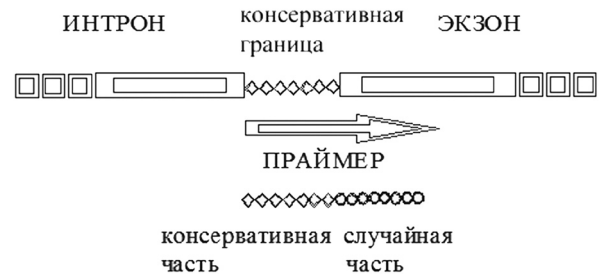


Рис. 2. Схема полуслучайного праймера

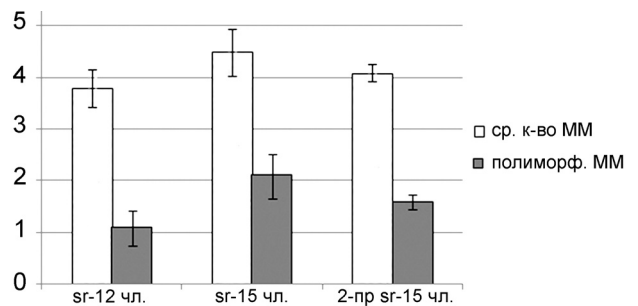


Рис. 3. Среднее количество продуктов ПЦР, полученных на ДНК образцов березы при использовании различных праймеров и доля полиморфных ММ среди них

количеству генерируемых ММ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Кроме того, определяли процент полиморфных ММ для каждого варианта опыта и его ошибку (Терентьев, Ростова, 1979).

Дендрограмму строили с помощью компьютерного пакета TREECON, используя UPGMA метод (Van der Peer, de Wachter, 1994). Родство между клонами устанавливали путем сравнения профилей амплифицированных ПЦР-продуктов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПЦР с полуслучайными праймерами наблюдали образование продуктов, размер которых, как правило, варьировал от 100 до 2000 нп. Количество продуктов варьировало от 1 до 7.

Всего при использовании 20 праймеров и 22 двупраймерных комбинаций нами было получено 482 ММ, среди которых 99 были полиморфными.

В случае использования 12-членных полуслучайных праймеров, среднее количество ММ на реакцию составило  $3,8 \pm 0,36$  %. Среднее количество ММ на реакцию в случае 15-членных праймеров было несколько выше и составило  $4,5 \pm 0,45$  %, а для двупраймерных комбинаций составило  $4,1 \pm 0,16$  % (рис. 3). Показано, что процент полиморфных ММ клонов берез при использовании коротких полуслучайных праймеров составляет  $29 \pm 7,5$  %, для длинных полуслучайных праймеров этот показатель

Таблица 3

**Полиморфные ММ и характеристики клонов березы, полученные с их помощью**

Маркер	Береза повислая	Береза пушистая	Клоны карельской березы			
			Л	Ап	Юк	Ш-3
Sr4-600	+	+		+	+	+
Sr4-800	+	+	+		+	+
Sr4-1000	+		+	+	+	+
Sr14-200	+	+	+	+		+
Sr14-300	+				+	
Sr14-500	+	+		+		+
Sr14-600			+	+	+	+
Sr15-400	+			+		
Sr15-900	+		+	+	+	+
Sr15-1500					+	+
Sr1314-300		+	+	+	+	+
Sr1314-450		+	+	+	+	+
Sr1314-550	+		+	+		
Sr1314-800	+					
Sr1314-1100		+	+	+	+	+
Sr1314-1500	+					
Sr1314-1800	+					
Sr1418-500	+	+	+	+		
Sr1418-1000	+	+				
Sr1418-1600		+	+	+		+
Sr1719-1000	+					
Sr1719-1200		+	+	+	+	+
Sr1719-1700	+					

равняется  $47 \pm 7,5 \%$ , а для их дупраймерных комбинаций —  $39 \pm 5,2 \%$ . Статистический анализ продемонстрировал отсутствие достоверных различий по числу генерируемых фрагментов и степени их полиморфности для всех типов использованных праймеров. Из числа проанализированных праймеров и дупраймерных комбинаций были выделены те, которые давали максимальное количество полиморфных фрагментов (рис. 4). Эти праймеры могут быть рекомендованы для типирования ценных генотипов березы (включая карельскую). В нашей работе было показано, что с использованием предложенных маркеров можно надежно различать исследованные клоны. При анализе образцов карельской березы было продемонстрировано, что каждый из них имеет характерный только для него набор маркеров (табл. 3). Вместе с тем, некоторые маркеры являются общими для исследованных форм карельской березы. Примером таких маркеров могут служить фрагменты, амплифицированные при помощи комбинации праймеров SR13 и SR14.

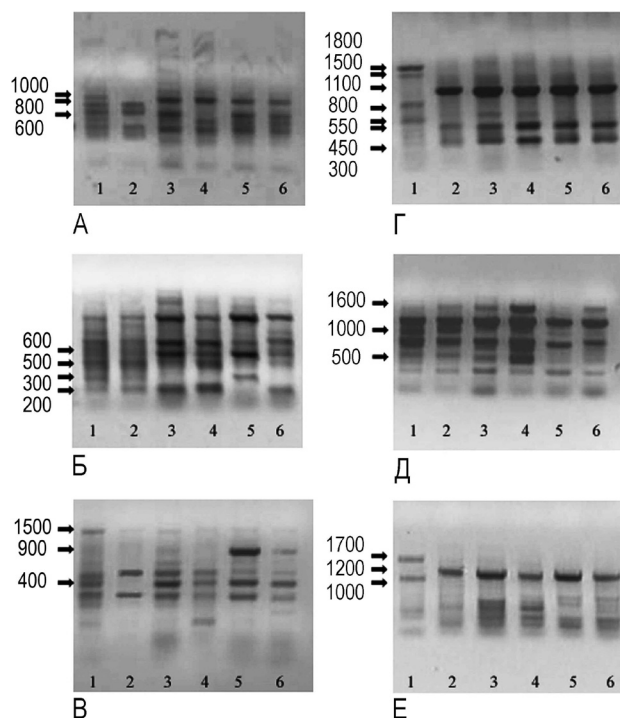


Рис. 4. Результаты ПЦР с праймерами SR4 (А), SR14 (Б), SR15 (В) и комбинациями SR13–SR14 (Г), SR14–SR18 (Д), SR17–SR19 (Е), с помощью которых было амплифицировано наибольшее количество ММ.

Размеры фрагментов указаны на рисунке.

Расположение продуктов ПЦР по дорожкам:

1. Нормальное растение *B. pendula*
2. Растение *B. pubescens*
3. Клон карельской березы Л
4. Клон карельской березы А
5. Клон карельской березы Ю
6. Клон карельской березы Ш-3

По результатам анализа была построена дендрограмма (рис. 5), в которой можно выделить 3 ветви. Наиболее удаленной ветвью является береза повислая. Более близкой к изученным клонам является береза пушистая. Третья ветвь, представляет собой кластер, разделенный на две группы, в которых расположены две подгруппы, объединяющие клоны с похожими ПЦР-профилями: клоны А и Л, клоны Ш-3 и Ю. Действительно, клоны А и Л родственны между собой, т.к. исходное дерево клона Л (7319) было отобрано в потомстве от свободного опыления исходного дерева клона А (ПК-2) — таблица 1. Клоны же Ш-3 и Ю являются клонами одного исходного дерева Ш-3, но полученные разным способом — прямой регенерацией (пролиферация пазушных меристем — клон Ш-3) или через каллусные культуры (клон Ю).

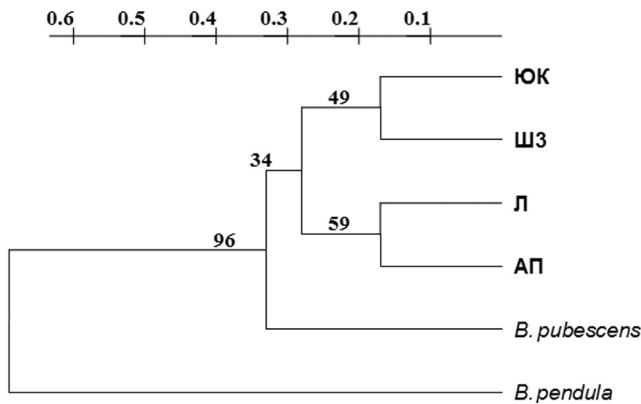


Рис. 5. Дендрогрaмма исследованных образцов березы, построенная с помощью компьютерного пакета TREECON, используя UPGMA метод.

Полученные данные свидетельствуют о возможности паспортизации клонов карельской березы методом ПЦР с полуслучайными 12- и 15-членными праймерами — semi-RAPD. В то же время, хотя клоны Л и А близки между собой по ПЦР-профилям, тем не менее фенотип А — это норма, а фенотип Л — соматоклональный вариант. Возможно, это связано с изменением экспрессии генов (эпигенетической изменчивостью). В пользу такого предположения свидетельствует выявленное нами ранее нарушение баланса фитогормонов у соматоклонального варианта (Самсонова и др., 2001).

Интересно отметить, что при использовании двупраймерных комбинаций SR13-SR14 и SR17-SR19 набор амплифицируемых фрагментов, сходный с таковым, полученным на ДНК из образцов карельской березы, наблюдали при амплификации фрагментов ДНК другого вида — березы пушистой. Вместе с тем, при использовании тех же праймеров и ДНК-матриц из независимых нормальных растений березы повислой наблюдали амплификацию фрагментов ДНК других размеров. Полученные данные свидетельствуют в пользу ранее высказанных гипотез о роли межвидовой гибридизации в происхождении карельской березы (Баранов, 2002; Баранов, Марковская, 2003; Ветчинникова, 2005). Вероятно, факт отдаленной гибридизации можно рассматривать как одну из причин изменения свойств древесины берез. Продолжение исследований с привлечением более обширной выборки позволит приблизиться к решению одного из трудных и волнующих умы многих ученых вопросов — происхождение карельской березы.

Данная работа осуществлена при финансовой поддержке Министерства образования РФ (грант PD02—1.4—142).

## Список литературы

1. Баранов О. Ю., 2002. Изучение уровня генетической изменчивости и дифференциации среди форм

берез // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. трудов. ин-та леса НАН Беларуси. Вып. 55. Гомель: ИЛ НАН Беларуси. С. 143—147.

2. Баранов О. Ю., Марковская Ю. А., 2003. Особенности генетической структуры березы карельской по гену *Gpi-2* // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. трудов. ин-та леса НАН Беларуси. Вып. 50. Гомель: ИЛ НАН Беларуси. С. 181—185.
3. Бутова Г. П., Табацкая Т. М., Скрябина Л. Л., 1990. Способ микроклонального размножения карельской березы // А. с. N 1597386 АИ С N5/00 опубл. 7.10.90. Бюл. № 37.
4. Ветчинникова Л. В., 2005. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука, 269 с.
5. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А., 2005. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика. Т. 41. С. 480—492.
6. Машкина О. С., Табацкая Т. М., 2005. Рекомендации по сохранению и воспроизводству методами биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего. Воронеж: НИИЛГиС, 29 с.
7. Машкина О. С., Табацкая Т. М., Стародубцева Л. М., 1999. Длительное микроочернение для массового клонального размножения карельской березы и тополя // Физиология растений. Т. 46, С. 950—953.
8. Самсонова А. Е., Машкина О. С., Исаков Ю. Н., 2001. Эндогенные регуляторы роста и укореняемость различных генотипов карельской березы при микроклональном размножении // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Сб. науч. тр. Воронеж: ВГУ. С. 97—102.
9. Терентьев П. В., Ростова Н. С., 1979. Практикум по биометрии. Л.: Из-во ЛГУ, С. 151.
10. Хлёткина Е. К., Салина Е. А., 2006. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы. Генетика. Т. 42, № 6. С. 725—736.
11. Gawel M., Wisniewska I., Rafalski A., 2002. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale // Cellular and Molecular Biology Letters. Vol. 7. P. 577—582
12. Hu J., van Eysden J., Quiros C. F., 1995. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions // PCR Methods Appl. Vol. 4. P. 346-351.
13. Matveeva T. V., Lutova L. A., Wood D., Nester E. W., 2003. Search for sequences homologous to *Agrobacterium* T-DNA in different plant genomes // Biology of Plant-Microbe Interactions. Vol. 4. P. 526—529
14. Przetakewicz J., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W., 2002. The use of RAPD and semi-random markers to

verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. // Cellular and Molecular Biology Letters, Vol. 7. P. 671–676

15. Van der Peer Y., de Wachter R., 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. Vol. 10, P. 569–570
16. Welsh J., McClelland., 1991. Genomic fingerprinting genomes using arbitrary primed PCR and matrix of pairwise combinations of primers // NAR. Vol. 19, P. 5275–5279.
17. Whilliams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. // NAR. Vol. 18, P. 6531–6535.

#### Molecular passportization of clones of Karelian birch using PCR with semi-specific primers

T. V. Matveeva, O. S. Mashkina, Yu. N. Isakov, L. A. Lutova

✿ **SUMMARY:** Using 4 clones of Karelian birch (*Betula pendula* Roth var *carelica* Merckl.) from the collection of the Karelian birch of the laboratory of genetics of Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh, one normal tree of *Betula pendula* Roth. and one tree of *B. pubescens* Ehrh., collected from the nature, we have analyzed the possibility of application of PCR with semi-specific primers for molecular typing. We found primers with high percentage of polymorphic markers. These primers could be recommended for molecular typing of birch.

✿ **KEY WORDS:** birch; semi-RAPD; molecular markers

#### Информация об авторах:

**Матвеева Татьяна Валерьевна**, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб, д. 7/9. E-mail: radishlet@yahoo.com. St. Petersburg State University, St. Petersburg.

**Машкина Ольга Сергеевна**, Воронежский государственный университет, 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1. Voronezh State University, Voronezh.

**Исаков Юрий Николаевич**, ФГУП Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, 394087, Воронеж, Ломоносова ул., 105 д. Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh.

**Лутова Людмила Алексеевна**, д. м. н., профессор, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб, д. 7/9. St. Petersburg State University, St. Petersburg