

УДК 631.523.5:633.32

RAPD-АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

© 2012 г. А. М. Близнюк¹, Ю. Н. Дугарь¹,
Т. А. Долгова¹, В. Н. Попов^{2,3}

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)

²Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева
Национальной академии аграрных наук Украины
(Харьков, Украина)

³Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)

Изучен геномный полиморфизм природных популяций клевера лугового Харьковской и Черниговской областей с использованием 14 произвольных олигонуклеотидных праймеров. Выявлен высокий уровень полиморфизма, который составил 79,7%. Вычисленные значения генетических расстояний Nei и Li позволили построить дендрограмму, на которой популяции клевера лугового распределились в три кластера. Обсуждаются возможные причины их группирования в кластеры.

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

Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) среди кормовых трав является наиболее распространенным и ценным видом, к которому со стороны генетиков возрос интерес в связи с недостаточной его изученностью по многим современным направлениям молекулярной биологии. За последнее десятилетие международным консорциумом ученых на специально созданных картированных популяциях клевера лугового изучена его геномная структура с использованием методов молекулярной цитогенетики и геномики (Sato et al., 2005), построены первые генетические карты с использованием разных ДНК-маркеров с интеграцией на нее QTL агрономических признаков (Isobe et al., 2003; Isobe et al., 2007; Klimenko et al., 2010), а также разработана обобщенная карта с расположением на ней ДНК-маркеров трех типов: SSR, AFLP и RFLP (Isobe et al., 2009).

Наряду с этим проводятся исследования по детектированию межсортового полиморфизма клевера лугового с использованием мультилокусных маркерных систем – RAPD (Kongkiantgam et al., 1996; Campos-de-Quiroz et al., 2001; Ulloa et al., 2003) и AFLP (Herrmann et al., 2005), а также монолокусных – SSR (Kolliker et al., 2006; Dias et al., 2008). В этих работах изучен молекулярно-генетический полиморфизм сортов из Европы, Южной и Северной Америки, Японии. В меньшей степени по ДНК-маркерам изучены сорта клевера украинской селекции. В единственной работе с использованием RAPD-маркеров проведена молекулярная характеристика 15 сортов клевера лугового из Украины (Дугарь, Попов, 2011). Необходимо отметить, что гораздо меньшее внимание уделяется изучению генетической структуры природных популяций клевера лугового. Единичные работы посвящены анализу нескольких природных популяций с помощью изоферментных систем (Семериков, Беляев, 1995; Semerikov et al., 2002; Mosjidis et al., 2004) и только в

Адрес для корреспонденции: Долгова Татьяна Анатольевна, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;
e-mail: tadolga@rambler.ru

RAPD-АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

одной работе описана изменчивость AFLP-маркеров (Herrmann et al., 2005).

Целью настоящей работы было изучение геномного полиморфизма природных популяций клевера лугового из разных ареалов Харьковской и Черниговской областей с помощью RAPD-маркеров.

МЕТОДИКА

В качестве растительного материала использовали девять природных популяций клевера лугового, отобранных из разных ареалов Харьковской и Черниговской областей (табл. 1). Материал для исследования был собран на пойменных лугах реки Северский Донец и его левого притока реки Волчья (Харьковская обл.), а также реки Десна (Черниговская обл.).

ДНК клевера лугового выделяли из смеси семян СТАВ методом (Ausubel et al., 1987). Для проведения ПЦР использовали 14 произволь-

ных праймеров (табл. 2), из которых ОРА-11, ОРС-20, ОРФ-10, ОРІ-19, ОРР-10, ОРU-01, ОРW-04, ОРW-06, ОРW-10, ОРZ-04 разработаны в Operon Technologies (США), а Р28, Р37, Р39, Р52 в Южном биотехнологическом центре в растениеводстве (Украина).

Аmplификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core, Россия) 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 электро-

Таблица 1. Местонахождение природных популяций клевера лугового, отобранных для исследования

Область	Район	Окрестности населенного пункта
Харьковская	Волчанский	с. Тихое (1)* г. Волчанск (3)
	Балакле́йский	с. Ольховатка (4) с. Довгалевка (6) с. Чепель (8)
	Изюмский	с. Лысогорка (7)
Черниговская	Новгород-Северский	с. Путивск (2) с. Роговка (9)
	Коропский	с. Мезин (5)

Примечание. * здесь и на рис. 2 в скобках обозначен порядковый номер популяции

Таблица 2. Нуклеотидная последовательность произвольных праймеров и уровень полиморфизма, выявленный с помощью RAPD-анализа

Праймер	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Количество ампликонов, шт.	Количество полиморфных ампликонов, шт.	Полиморфизм, %
ОРА-11	СААТСГСССГТ	14	14	100
ОРС-20	АСГГААГТГГ	8	4	50
ОРФ-10	ГГААГСТТГГ	11	10	91
ОРІ-19	ААТГСГГГГАГ	6	5	83
ОРР-10	ТСССГССТАС	17	17	100
ОРU-01	АСГГАСГТСА	14	12	86
ОРW-04	САГААГСГГА	14	13	93
ОРW-06	АГГСССГАТГ	11	7	64
ОРW-10	ТСГСАТСССТ	6	5	83
ОРZ-04	АГГСТГТГСТ	5	3	60
Р28	САААСГТСГГ	6	3	50
Р37	СТГАССАГСС	7	5	71
Р39	ССАГТТСГСС	11	10	91
Р52	АГГАСТГГАС	13	12	92

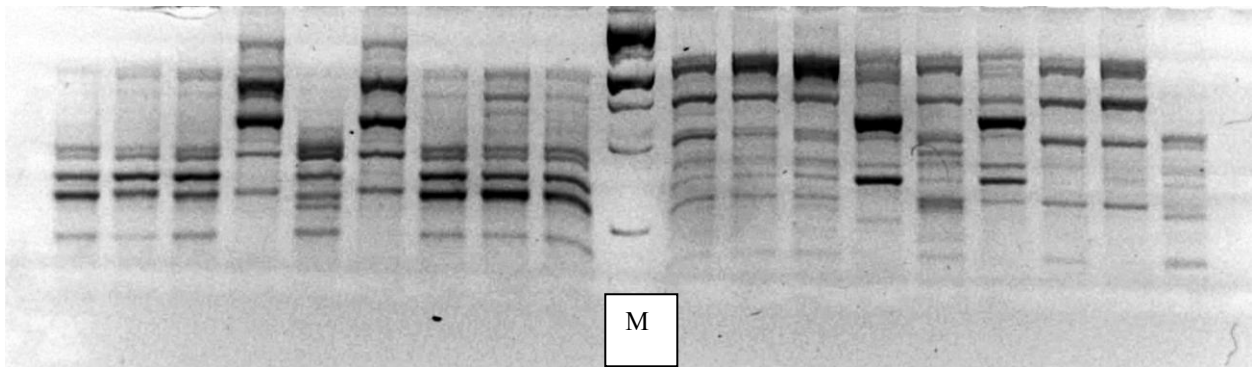


Рис.1. RAPD компоненты *Itzdnb* природных популяций клевера лугового, полученные с использованием праймеров: ОРА-11 (слева от маркера) и ОРС-01 (справа от маркера).

М – маркер молекулярной массы 1 kb DNA ladder.

фореза 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 ТСП-20МС (Франция) с последующим фотографированием гелей. В качестве маркера молекулярной массы для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали 1 kb DNA ladder.

Для вычисления молекулярной массы продуктов амплификации использовали демо версию программного пакета “TotalLab TL120”.

По результатам анализа электрофореграмм была составлена бинарная матрица. В матрице присутствие ампликона обозначали цифрой 1, а отсутствие – 0. Каждый RAPD-компонент рассматривался как отдельный генетический локус. Уровень полиморфизма определяли как соотношение 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 (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

Набор из 14 олигонуклеотидных праймеров позволил идентифицировать хорошо вос-

производимые RAPD фрагменты (ампликоны) генома клевера лугового и провести дальнейший молекулярный анализ девяти природных популяций, отобранных из разных ареалов Харьковской и Черниговской областей. Используемые праймеры дали возможность выявить полиморфизм между всеми тестируемыми образцами клевера лугового. В результате RAPD-анализа для каждой анализируемой популяции было идентифицировано достаточное количество индивидуальных фрагментов ДНК (рис. 1). Исследуемые популяции различались по количеству RAPD компонентов, число которых варьировало от 5 до 17 для ОРЗ-04 и ОРР-10, соответственно, и в среднем составило 10,2 ампликона на один использованный праймер. Размер амплифицированных компонентов варьировал в широких пределах. Минимальный размер ампликона составил ~ 103 п.н., а максимальный – ~3000 п.н., которые были выявлены с применением праймеров ОРВ-04 и ОРР-10, соответственно.

Используя случайную амплификацию ДНК, удалось в общей сложности детектировать 143 ампликона, из которых 114 оказались полиморфными. Используемые произвольные олигонуклеотидные праймеры позволили выявить полиморфизм, который варьировал от 50 (ОАС-20) до 100% (ОРР-10 и ОРА-11). В среднем уровень полиморфизма, выявленный с помощью 14 произвольных праймеров, составил 79,7%, что является достаточно высоким показателем, зависящим не только от нуклеотидного состава праймеров, но и от вида тестируемых растений.

Обращает на себя внимание наличие уникальных RAPD фрагментов, которые были

Таблица 3. Генетические расстояния между природными популяциями клевера лугового

Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	0,003491	-							
3	0,002153	0,002527	-						
4	0,017146	0,015930	0,015328	-					
5	0,006444	0,007383	0,005734	0,019204	-				
6	0,011694	0,011350	0,011487	0,004559	0,010064	-			
7	0,003974	0,005413	0,004394	0,017921	0,003248	0,008897	-		
8	0,003786	0,005147	0,004792	0,017280	0,004731	0,009618	0,002320	-	
9	0,005513	0,008577	0,006712	0,018597	0,007937	0,014349	0,005588	0,004907	-

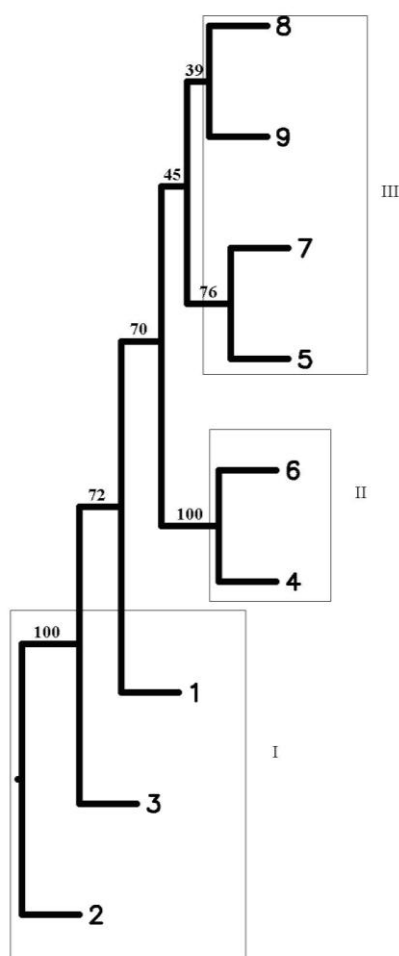


Рис. 2. Дендрограмма генетических взаимоотношений между природными популяциями клевера лугового (номера популяций соответствуют местности в табл. 1).

детектированы при амплификации геномной ДНК клевера с произвольными праймерами.

В целом, 12 из 14 праймеров выявляли такие фрагменты. Всего было получено 20 специфич-

ческих фрагментов. Наибольшее количество уникальных компонентов было выявлено в популяции клевера, произрастающей в окрестностях села Ольховатка. В этой популяции удалось идентифицировать шесть уникальных ампликонов. Также особенностью этой популяции было наличие большого количества RAPD фрагментов, которые характерны не только для данной популяции, но и для образца, отобранного из окрестностей села Довгалевка. В результате были идентифицированы 24 RAPD компонента, присутствующие только в этих популяциях клевера лугового. Можно предположить, что характерные для этих популяций клевера RAPD фрагменты являются результатом общности их происхождения.

Для оценки сходства исследуемых природных популяций клевера лугового мы использовали метрику Nei и Li, которая является наиболее приемлемой для бинарных данных RAPD-анализа. Значения генетических расстояний при попарном сравнении популяций клевера лугового варьировали от 0,002153 до 0,019204 (табл. 3). При детальном рассмотрении генетических дистанций можно констатировать, что минимальное значение было получено между популяциями из одного административного региона – окрестности села Тихое (Волчанский район) и г. Волчанска, а максимальное – для пары популяций из разных регионов Украины. Это популяции, отобранные из окрестностей сел Мезин (Черниговская обл.) и Ольховатка (Харьковская обл.).

На основании указанных расстояний с применением алгоритма ближайших соседей с последующим бутстреп-анализом была построена дендрограмма для отображения закономерностей генетического сходства вовлеченных в анализ природных популяций клевера лугового (рис. 2). Результаты группирования образцов клевера в полученном согласованном дереве позволили выделить три основных кластера.

Характерной особенностью выделенных кластеров в большинстве случаев является разнородность вошедших в них природных популяций клевера лугового. Так, популяции клевера из Черниговской области вошли в два разных кластера. При этом в пределах третьего кластера две популяции из Черниговской области группировались в разные субкластеры. В связи с этим можно предположить, что популяции клевера лугового из этого региона Украины являются генетически обособленными друг от друга.

Весьма вероятно, что популяции из окрестностей г. Волчанска представляют одну популяцию. Они вошли в первый кластер с высоким бутстреп-значением (72%) и, как было показано выше, именно они имеют наименьшее значение генетического расстояния (0,002153). Следует отметить, что географически они близки друг к другу и, вероятно, между ними осуществляется интенсивный обмен генами, причинами которого является близость их ареалов и отсутствие природных преград для естественных опылителей клевера.

Во второй кластер обособлено группируются две популяции клевера лугового, расположенные в окрестностях сел Ольховатка и Довгалевка (Харьковская обл.). Бутстреп-поддержка для этого узла составила 100%. Остальные популяции клевера вошли в третий кластер. Это природные популяции клевера лугового, которые находятся в окрестностях сел Лысогорка и Чепель. В этом кластере был выявлен один достоверный узел с высоким значением бутстрепа (76%), а другой узел имел низкое значение бутстрепа (39%), что теоретически может приводить к иной топологии дерева.

Для окончательного доказательства нашего предположения о генетической обособленности или родстве изученных природных популяций клевера лугового предполагается привлечение также и других ДНК-маркеров, например, молекулярных маркеров, относящихся к монолокусным полиаллельным системам – SSR. Высокий уровень полиморфизма и кодоминантный тип наследования делает их идеальным инструментом для выявления уникальных аллелей и гетерозигот в определенной популяции.

Таким образом, RAPD-анализ позволил выявить высокий уровень полиморфизма в изученных природных популяциях клевера лугового Харьковской и Черниговской областях. Результаты молекулярно-генетического анализа дали возможность дифференцировать попу-

ляции клевера лугового, произрастающие в этих географических регионах Украины.

ЛИТЕРАТУРА

- Дугарь Ю.Н., Понов В.Н.* RAPD-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) разного эколого-географического происхождения // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія. – 2011. – № 947 (вип. 13). – С. 81-86.
- Семериков В.Л., Беляев А.Ю.* Аллозимный полиморфизм в природных популяциях и культурных сортах клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 6. – С. 815-819.
- Ausubel F. M., Brent R. Kingston R.E., Moor D.D., Seidman J.G.* Current protocols in molecular biology / John Wiley & Sons. – New York, 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. – V. 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. – V. 122. – P. 61-67.
- Dias P., Bernadette Julier B., Sampoux J-P., Barre P., Dall'Agnol M.* Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers // Euphytica. – 2008. – V. 160. – P. 189-205.
- 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. – V. 48. – P. 474-486.
- Isobe S., Akihiro Nakaya A., Satoshi Tabata S.* Genotype matrix mapping: searching for quantitative trait loci interactions in genetic variation in complex traits // DNA Research. – 2007. – V. 14. – P. 217-225.
- Isobe S., Klimenko I., Ivashuta S., Gau M., Kozlov N.* 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. – V. 108. – P.105-112.
- Isobe S., Kölliker R., Hisano H., Sasamoto S., Wada T., Klimenko I., Okumura K., Tabata S.* Construction of a consensus linkage map for red clover (*Trifolium pratense* L.) // BMC Plant Biology. – 2009. – 9:57.
- Klimenko I., Razgulayeva N., Gau M., Okumura K., Nakaya A., Tabata S., Kozlov N., Isobe S.* Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover // Theor. Appl. Genet. – 2010. – V. 120. – P. 1253-1263.

RAPD-АНАЛІЗ ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ

- Kolliker R., Enkerli J., Widmer F. Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries // Molecular Ecology Notes. – 2006. – V. 6. – P. 50-53.
- 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. – V. 89. – P. 355-361.
- Mosjidis J., Greene S., Klingler K., Afonin A. Isozyme Diversity in Wild Red Clover Populations from the Caucasus // Crop Sci. – 2004. – V. 44. – P. 665-670.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – V. 76. – P. 5269-5273.
- Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y., Kaneko T., Sakurai N., Okumura K., Klimenko I., Sasamoto S., Wada T., Watanabe A., Kohara M., Fujishiro T., Tabata S. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.) // DNA Research. – 2005. – V. 12. – P. 301-364.
- Semerikov V., Belyaev A., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals // Theor. Appl. Genet. – 2002. – V. 106. – P. 127-132.

Поступила в редакцію
06.02.2012 г.

RAPD ANALYSES OF THE NATIVE OF POPULATION OF RED CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

O. M. Bliznuk¹, Yu. M. Dugar¹, T. A. Dolgova¹, V. M. Popov^{2,3}

¹Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)

²V.Ya. Yurjev Plant Production Institute
of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
(Kharkiv, Ukraine)

³V.N. Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)

Genomic polymorphic of native population of red clover was studied by 14 arbitrary oligonucleotides primers. The high level of polymorphism was exposed which is 79,7%. The values of genetic distances of Nei and Li allowed to build dendrogram, on which populations of clover distributed in three clusters. Possible causes of clustering their in clusters are discussed.

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

RAPD-АНАЛІЗ ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

О. М. Близнюк¹, Ю. М. Дугарь¹, Т. А. Долгова¹, В. М. Попов^{2,3}

¹Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)

²Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва
Національної академії аграрних наук України
(Харків, Україна)

³Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)

Досліджено геномний поліморфізм природних популяцій конюшини лучної Харківської та Чернігівської областей з використанням 14 довільних олігонуклеотидних праймерів. Виявлений високий рівень поліморфізму, який склав 79,7%. Обчислені значення генетичних відстаней Nei та Li дозволили побудувати дендрограму, на якій популяції конюшини лучної розподілилися у три кластери. Обговорюються можливі причини їх групування у кластери.

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