

RAPD-АНАЛИЗ МЕЖВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЛЬНА (РОД *Linum*)

В.А. Лемеш, М.В. Шут, Л.В. Хотылева

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Минск, Беларусь,
e-mail: V.Lemesh@igc.bas-net.by

Цель работы состояла в уточнении таксономического статуса некоторых видов льна и филогенетических взаимоотношений между ними с помощью молекулярных маркеров. Показано, что молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические RAPD-маркеры генома льна, которые могут использоваться для видовой идентификации генотипов. Метод молекулярного маркирования генома на основе RAPD-PCR позволяет определить таксономический статус представителей рода *Linum* и установить филогенетические взаимоотношения между различными видами льна. Целенаправленное использование видоспецифичных праймеров позволит исследователям сократить затраты труда и средств, необходимые для анализа коллекционных образцов.

Введение

Виды рода *Linum* L. имеют широкое географическое распространение во всех областях земного шара. До настоящего времени не существует однозначного мнения по числу видов в роде. Различные исследователи насчитывают от 100 до 300 видов (Ray, 1944; Флора СССР, 1949; Hickey, 1988; Флора Восточной Европы, 1996). Причиной различных мнений может быть не только внутривидовой полиморфизм, но и существующая многочисленная и довольно запутанная синонимика, а также разные подходы исследователей к определению вида. Таксономическое описание рода *Linum* дает не много сведений о взаимоотношениях и эволюции внутри рода. Традиционная систематика основана на географическом принципе и морфологических признаках (структура цветка, окраска лепестков, характер расположения листьев и т. д.), которые не всегда верно определяют положение таксона. Для некоторых видов она уточнялась на основании числа хромосом. Было обнаружено, что число хромосом у льна колеблется от 12 до 64 и более (Darlington, Wylie, 1955), хромосомы мелкие и имеют сходную морфологию. Попытка уточнить систематику видов рода *Linum* с помощью сравнительного анализа

морфологии семян, пыльцевых зерен и монохромно окрашенных кариотипов не разрешила спорных вопросов (Ray, 1944; Хржановский и др., 1979; Chennaweeraiah, Joshi, 1983). Межвидовые взаимоотношения культивируемого льна *Linum usitatissimum* L. и его близкородственных видов *Linum bienne* Mill. и *Linum angustifolium* Huds. были охарактеризованы с помощью молекулярных и хромосомных маркеров (Fu *et al.*, 2002; Муравенко и др., 2003). Тем не менее многие вопросы систематики и филогении рода *Linum* трактуются неоднозначно. Для уточнения систематики рода необходимо применение новых современных методов исследования генома, которые позволили бы прояснить нерешенные вопросы.

В последние годы для изучения генетических связей у растений, межвидовой и внутривидовой идентификации широко используется метод маркирования генетического материала путем амплификации ДНК с произвольными праймерами (RAPD-PCR) (Williams *et al.*, 1990). Ранее нами была проведена оценка генетического родства четырех диких видов и нескольких коллекционных образцов представителей рода *Linum* с использованием молекулярных маркеров на основе RAPD-PCR (Lemesh, Khotyleva, 2000; Lemesh *et al.*, 2001). Было показано, что морфологически

трудноразличимые виды *L. perenne* и *L. austriacum* ($2n = 18$) по RAPD-профилям четко дифференцированы. По данным RAPD-анализа определено систематическое положение льна-прыгунца *L. crepitans* (Boenn.) Dumort ($2n = 30, 32$). Это растение рассматривалось либо как разновидность, либо как подвид *L. usitatissimum* или *L. dehiscens* (Флора Восточной Европы, 1996). По результатам наших исследований сделан вывод, что лен-прыгунец принадлежит к *L. usitatissimum* и генетически близок с примитивными формами (ландрасами).

Цель данной работы состояла в уточнении таксономического статуса некоторых

видов льна и филогенетических взаимоотношений между ними с помощью молекулярных маркеров.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 17 диких видов рода *Linum*, полученные из Генетического банка растений (г. Гатерслебен, Германия), и вид культурного льна *L. Usitatissimum* (таблица). Число хромосом указано согласно данным литературы (Ray, 1944; Gill, Yermanos, 1967; Chennaweeraiah, Joshi, 1983; Флора Восточной Европы, 1996).

ДНК выделяли из листьев и проростков

Таблица

Изученные образцы льна, число хромосом и полученных RAPD-фрагментов

№ п/п	Виды	Число хромосом	RAPD-фрагменты	
			общее количество	уникальные
1	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	$2n = 16$	169	11
2	<i>L. austriacum</i> L. subsp. <i>austriacum</i>	$2n = 18$	166	0
3	<i>L. perenne</i> L.	$2n = 18$	161	1
4	<i>L. tenuifolium</i> L.	$2n = 16$	138	7
5	<i>L. suffruticosum</i> L. subsp. <i>sal-soioides</i> (Lam.)	неизвестно	125	7
6	<i>L. thracicum</i> Degen	неизвестно	134	0
7	<i>L. lewisii</i> Pursh	$2n = 18$	103	3
8	<i>L. capitatum</i> Kit. ex Schultes	$2n = 34$	42	0
9	<i>L. altaicum</i> Ledeb.	$2n = 18$	151	0
10	<i>L. hirsutum</i> L. subsp. <i>hirsutum</i>	$2n = 16$	101	0
11	<i>L. nodiflorum</i> L.	$2n = 26$	164	5
12	<i>L. narbonense</i> L.	$2n = 20$	94	5
13	<i>L. stelleroides</i> Planch.	неизвестно	148	6
14	<i>L. tauricum</i> Willd.	неизвестно	144	2
15	<i>L. komarovii</i> Juss.	$2n = 16$	152	2
16	<i>L. leonii</i> F.W. Schultz	$2n = 18$	139	5
17	<i>L. campanulatum</i> L.	$2n = 16$	143	5
18	<i>L. usitatissimum</i> L.	$2n = 30$	184	16

различных видов льна. Растительный материал измельчали в присутствии жидкого азота, суспендировали в экстракционном буфере следующего состава: 100 мМ Tris-HCl, pH 8,5; 100 мМ NaCl; 50 мМ EDTA, pH 8,0; 2 % SDS. После добавления протеиназы К (до конечной концентрации 0,05 мг/мл) образцы инкубировали 1–1,5 час в зависимости от количества растительного материала при 65 °С, периодически перемешивая. После экстракции фенол-хлороформовой смесью в соотношении (1 : 1) супернатант переносили в другие пробирки. ДНК осаждали добавлением 0,6–0,8 объема изопропилового спирта с последующим центрифугированием. ДНК промывали в 70 %-ном этиловом спирте, подсушивали и растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 1 мМ EDTA). Растворенную ДНК обрабатывали РНКазой 1 час при 37 °С. Затем вторично очищали экстракцией в фенол-хлороформовой смеси и осаждали добавлением двух объемов этанола с последующим растворением в стерильном ТЕ буфере. Полученную ДНК анализировали в 0,8 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого: dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ MgCl₂ и 1,5 единиц Taq-полимеразы в инкубационном буфере. Для RAPD-анализа использовали олигонуклеотидные праймеры – 20 серий UBC (University of British Columbia): 73, 101, 153, 209, 239, 244, 290, 292, 301, 337, 396, 403, 417, 448, 465, 499, 556, 574, 586, 731 и 6 праймеров серии Oligo – 1, 6, 7, 8, 11, 15. ПЦР проводили в амплификаторе Perkin Elmer в следующих условиях: цикл 1 – 5 мин при 95 °С; циклы 2 – 35, 1 мин при 94 °С, 1 мин при 36 °С и 2 мин при 72 °С; цикл 36 – 7 мин при 72 °С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли при использовании в качестве маркера 1 kb DNA ladder (BRL).

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из прайме-

ров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый RAPD-фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. Характер и степень RAPD изменчивости анализировали в отношении праймера и образца. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью программного пакета PhylTools были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами. Для построения дендрограммы, демонстрирующей филогенетические отношения между изученными образцами льна по результатам RAPD-анализа, применили метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы PhylTools.

Результаты и обсуждение

При проведении RAPD-PCR были использованы 26 эффективных произвольных декамерных праймеров, с помощью которых оценивали межвидовое генетическое разнообразие льна. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 2000–200 п.н. В целом учитывалось 2458 амплифицированных фрагментов. Четыре праймера установили наличие мономорфных фрагментов у исследуемых образцов (UBC 209 – около 500 п.н., UBC 448 – около 700 п.н., UBC 499 – около 1600 п.н., UBC 556 – около 500 п.н.). Данные мономорфные фрагменты могут считаться RAPD-маркерами для представителей рода *Linum*. Чем больше генетическая дистанция между исследуемыми видами, тем меньше у них общих продуктов амплификации. Выявляемые при электрофорезе мономорфные полосы у близких видов предполагают общность структурно-функциональной организации геномов этих видов. Каждый из видов имел свой определенный спектр амплифицируемых RAPD-продуктов, отличающийся от других количеством фрагментов, их размером и степенью выраженности. Некоторые праймеры выявили присущие только одному конкретному виду ампликоны и, следовательно, являются видоспецифичными.

Число суммарных зон, полученных при амплификации ДНК 18 изученных видов

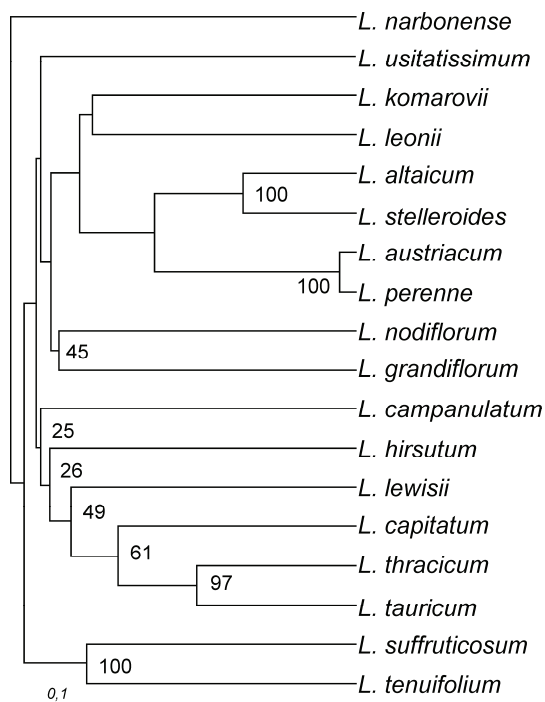


Рис. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между представителями рода *Linum*, построенная на основании анализа генетических дистанций.

льна с каждым из праймеров, варьирует от 1 до 11. Отмечены существенные различия по количеству RAPD-фрагментов между изученными видами. Исследуемые образцы различались также по числу уникальных, характерных только для одного вида ампликонов. Наибольшее их количество присутствует у *L. usitatissimum* – 16 (8,7 %) и *L. grandiflorum* 11 (6,0 %). У некоторых видов уникальных фрагментов не отмечено (табл.).

Для количественной оценки RAPD-полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными видами льна полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в RAPD-спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. По матрицам состояний были рассчитаны матрицы различий с использованием коэффициента Жаккарда (Jaccard, 1908). На основе матрицы невзвешенным парно-групповым методом кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) была построена дендрограмма

генетического подобия между изученными образцами льна (рис.).

Уровень различий по величине расстояния Жаккарда между исследуемыми образцами варьирует от 0,171 (между *L. austriacum* и *L. perenne*) до 0,867 (между *L. narbonense* и *L. altaicum*).

Виды *L. tenuifolium* и *L. suffruticosum*, *L. perenne* и *L. austriacum* слабо морфологически обособлены друг от друга и иногда на основании морфологических данных отождествляются. По данным RAPD-анализа (значения бутстрепа 100 %) виды дифференцированы, несмотря на некоторую степень гомологии как по количеству, так и по размерам фрагментов. Как следует из представленной дендрограммы, правомерно объединить в одну секцию виды *L. tauricum*, *L. thracicum*, *L. capitatum*. Виды *L. grandiflorum*, *L. nodiflorum*, *L. perenne*, *L. austriacum*, *L. stelleroides*, *L. altaicum*, *L. leonii*, *L. komarovii* группируются вместе и наиболее близки в генетическом отношении к возделываемому виду *L. usitatissimum*. Наиболее удален в генетическом отношении вид *L. narbonense*.

Следует отметить, что в один кластер попадают виды, резко отличающиеся хромосомным набором (табл.). Возможно, специализация в пределах рода *Linum* шла двумя путями: в развитии групп с разным набором хромосом сыграла роль полиплоидия, внутри групп обособление видов происходило за счет хромосомных перестроек. Можно полагать, что хромосомный набор $n = 8$ у *L. grandiflorum* и *L. hirsutum* произошел от $n = 9$ путем нисходящей анеуплоидии, $n = 10$ у *L. narbonense* – путем восходящей анеуплоидии, $n = 15$ у культурного вида *L. usitatissimum* является результатом полиплоидизации. Вероятно также, что $n = 15$ и $n = 16$ произошли также от предка с $n = 9$. Хромосомный набор *L. capitatum* ($n = 17$) может быть объяснен происхождением от 8–9 хромосом.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические геномные маркеры, которые могут использоваться для видовой идентификации генотипов. Показано, что метод молекулярного маркирования генома на основе RAPD-PCR позволяет определить таксономический статус представителей рода *Linum* и установить филогенетические взаи-

моотношения между различными видами льна. Целенаправленное использование видоспецифичных праймеров позволит исследователям сократить затраты труда и средств, необходимые для анализа коллекционных образцов.

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН проф. А.В. Зеленину, с.н.с. О.В. Муравенко за сотрудничество.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (Б02Р-024) и ГПОФИ «Современные науки о жизни».

Литература

- Муравенко О.В., Лемеш В.А., Саматадзе Т.Е. и др. Сравнение геномов трех близкородственных видов льна и их гибридов с использованием хромосомных и молекулярных маркеров // Генетика. 2003. Т. 39, № 4. С. 510–518.
- Флора Восточной Европы. Т. 9. Покрыгосеменные / Под ред. Н.Н. Цвелева. С.-Пб., 1996. 456 с.
- Флора СССР. Т. 14 / Под ред. Б.К. Шишкина. М.; Л., 1949. 348 с.
- Хржановский В.Г., Пономаренко С.Ф., Догузашвили В.А. К вопросу о происхождении и эволюции рода *Linum* L. сем. Linaceae // Изв. АН СССР. Сер. биол. № 5. 1979. С. 696–713.
- Chennaweeraiah M.S., Joshi K.K. Karyotypes in cultivated and wild species of *Linum* // Cytologia. 1983. V. 48. P. 833–841.
- Darlington C.D., Wylie A.P. Chromosome Atlas of Flowering Plants. London, George Allen and Unwin, 1955.
- Fu Y.-Bi, Peterson G., Diederichsen A., Richards K.W. RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. // Genetic Resources and Crop Evolution. 2002. V. 49. P. 253–259.
- Gill K.S., Yermanos D.M. Cytogenetic studies of the genus *Linum* L. Hybrids among taxa with 15 as the haploid chromosome number // Crop Sci. 1967. V. 7. P. 623–631.
- Hickey M. 100 Families of Flowering Plants. Cambridge: University Press, 1988.
- Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale // Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 1908. V. 44. P. 223–270.
- Lemesh V.A., Khotyleva L.V. Phylogenetic relationships among varieties of cultivated flax and its wild relatives // Proc. of the Int. Sci. Conf. «Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia». V. 1. 2000. P. 70–72.
- Lemesh V.A., Malyshev S.V., Grushetskaya Z.E., Khotyleva L.V. DNA polymorphism and phylogeny of flax // Proc. of the 2th Global Workshop of the FAO European Cooperative Research Network on Flax and other Bast Plants, Borovets, Bulgaria, June 3–6, 2001. P. 139–145.
- Ray C. Cytological studies on the flax genus *Linum* L. // Amer. J. Bot. 1944. V. 31. P. 326–330.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18, N 22. P. 6531–6535.

Use of RAPD markers for the study of interspecies variability in flax (genus *Linum* L.)

V.A. Lemesh, M.V. Shut, L.V. Khotyleva

Institute Genetics and Cytology of NASB, 220072, Minsk, Belarus,
e-mail: V.Lemesh@igc.bas-net.by

Summary

The aim of the work was to elucidate the taxonomic status of some flax species and phylogenetic relationships between them by molecular markers. Molecular-genetic analysis was shown to reveal specific RAPD markers of flax genome which may be used for species genotype identification. The molecular genome tagging based on RAPD-PCR makes it possible to determine the taxonomic status of *Linum* representatives and to establish phylogenetic relationships between different flax species. The purposeful use of the species-specific markers allows the researchers to reduce the labor and financial expenses needed for the analysis of the collection samples.