

УДК 634.18:631.527.5 + 577.21

**ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯДОЛЕЙ И ISSR-МАРКЕРОВ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГИБРИДОВ
МЕЖДУ *SORBUS SIBIRICA* HEDL.
И *SORBOCOTONEASTER POZDNJAKOVII* POJARK.**

© 2014 г. С.В. Асбаганов, Е.В. Кобозева, А.В. Агафонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: cryonus@mail.ru

Поступила в редакцию 24 октября 2013 г. Принята к публикации 18 июля 2014 г.

Показана возможность использования методов электрофореза запасных белков семян (SDS PAAG) и межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR) для идентификации гибридных генотипов при гибридизации *Sorbus sibirica* Hedl. (рябина сибирская) и *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. (рябинокизильник Позднякова). У гибридов наблюдается рекомбинация молекулярно-генетических и морфологических признаков, что свидетельствует о близком родстве их геномов и, следовательно, о перспективности использования рябинокизильника в селекции рябины. Полученные результаты подтверждают данные о происхождении *Sorbocotoneaster* Pojark. в результате гибридизации *Sorbus* L. и *Cotoneaster* Medik.

Ключевые слова: рябинокизильник, рябина, межродовая гибридизация, молекулярные маркеры.

ВВЕДЕНИЕ

Рябинокизильник (*Sorbocotoneaster* Pojark.) – узколокальный эндемик Южной Якутии, находящийся под угрозой исчезновения (Коропачинский, Встовская, 2012). Он занесен в список «Редких и исчезающих растений Сибири» (1980 г.), в «Красную книгу Республики Саха (Якутия)» (2001 г.) и «Красную книгу РФ» (2008 г.). Рябинокизильник Позднякова (*Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark.) – единственный представитель гибридного рода *Sorbocotoneaster*, возникшего от спонтанной гибридизации между *Sorbus* L. и *Cotoneaster* Medik.

По мнению А.И. Поярковой, «приуроченность рябинокизильника к растительной формации, характеризующейся комплексом реликтовых видов плейстоценового возраста, допускает предположение, что и возникновение этого межродового гибрида следует датировать этим же возрастом» (Петрова и др., 1992. С. 75–76).

На наш взгляд, рябинокизильник может оказаться донором ценных признаков в селекции рябины, поскольку характеризуется комплексом необходимых для рябины признаков: хорошей зимостойкостью, низкорослостью, скороплодностью, самоплодностью, отсутствием горечи и терпкости в плодах, хорошей укореняемостью черенков.

Однако при отдаленной гибридизации рябины семена могут завязываться не только в результате истинной гибридизации, но и в результате стимулятивного апомиксиса (Liljefors, 1953, 1955; Robertson *et al.*, 2004). Поскольку от момента получения гибридных семян до плодоношения проходят годы и затрачиваются значительные ресурсы, то необходимо иметь экспресс-методы, позволяющие диагностировать гибридность полученных семян и проводить раннюю селекцию сеянцев. Это дало бы возможность существенно сократить затраты, связанные со сложной и длительной пред-

посевной подготовкой семян и многолетним выращиванием бесполезных для дальнейшей работы сеянцев.

Нами была поставлена следующая цель: определить возможность использования методов электрофореза запасных белков семядолей (SDS PAAG) и межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR) для идентификации гибридных генотипов при гибридизации *S. sibirica* и *S. pozdnjakovii*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали семена и свежие или замороженные хранившиеся при -20°C листья кизильника черноплодного (*Cotoneaster melanocarpus* Fisch. ex Blytt.), кизильника цельнокрайнего (*Cotoneaster integerrimus* Medik.), кизильника блестящего (*Cotoneaster lucidus* Schlecht.), рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.), рябины сибирской (*Sorbus sibirica* Hedl.), рябинокизильника Позднякова (*Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark.) и гибридов F_1 (*S. sibirica* \times *S. pozdnjakovii*).

Для экстракции и электрофоретического разделения запасных белков семян использовали SDS-гелево-буферную систему У.К. Laemmli (1970), адаптированную для объектов исследования.

Для размягчения оболочки семян перед экстракцией их замачивали в дистиллированной воде на 24 ч. Препаровальной иглой делали надрез семенной оболочки и через отверстие выдавливали зародыш.

Для экстракции белков одну семядолю зародыша растирали пестиком в 0,2 мл эппендорфе в 5 мкл дистиллированной воды, другую – в 5 мкл SDS-экстрагирующего буфера, содержащего трис-НСI pH = 6,8, глицерин, воду в соотношении 4 : 1 : 5, 3 %-й SDS и краситель бромфеноловый синий. Далее доводили объемы воды и буфера до 100 мкл. Экстракт перемешивали на вортексе 5–10 с и инкубировали при комнатной температуре – 3–4 ч или при $+4^{\circ}\text{C}$ – 12–18 ч. После этого снова встряхивали на вортексе 2–3 с и центрифугировали при 13 000 об/мин 5 мин. Экстракт разделялся на 3 фракции: нерастворимый осадок и верхнюю фракцию и раствор в промежуточной фазе. Из промежуточной фазы отбирали 50–70 мкл раст-

вора. Полученный экстракт разделяли на две части. Одну смешивали в соотношении 2 : 1 с 20 %-м раствором 2-меркаптоэтанола (для разрушения четвертичной структуры белка в варианте +Me) в 1 \times SDS-экстрагирующем буфере в варианте с SDS-экстракцией и 2 \times SDS-экстрагирующем буфере в варианте с водным экстрактом. Для выравнивания концентрации с первым вариантом вторую часть смешивали в соотношении 2 : 1 с 1 \times и 2 \times SDS-экстрагирующим буфером. Экстракты прогревали 1,5 мин при 99°C в термоциклере, электрофоретическое разделение проводили в 1 мм 12,5 % ПААГ. В качестве маркеров молекулярных масс использовали стандартный набор белков Fermentas с диапазоном 14,4–116 кДа. Для точной идентификации каждого компонента была построена шкала относительной электрофоретической подвижности (ОЭП), позволяющая сравнивать результаты разных опытов в единой системе отсчета (Агафонов, Агафонова, 1992).

Для выделения ДНК использовали методику Д.А. Puchooa (2004). Поскольку методика была значительно модифицирована, приводим ее полный вариант. 20 мг свежих или замороженных листьев растереть в керамической ступке с 2 мл экстрагирующего буфера, содержащего 2 %-й PVP-40, 5 %-й 2-меркаптоэтанол, 2 %-й СТАБ, 100 mM Tris-НСI, 2M NaCl, 20 mM EDTA. В чистый 1,5 мл эппендорф перенести 1,5 мл, добавить 5 мкл РНКазы, встряхнуть 5 с на вортексе и инкубировать 20 мин при 37°C , затем аккуратно перемешать и инкубировать еще 10 мин при 60°C . Центрифугировать 5 мин на 13 000 об/мин. Отобрать 800 мкл супернатанта в чистую пробирку. Добавить 700 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), аккуратно перемешать до образования однородной эмульсии, инкубировать 15 мин при комнатной температуре (КТ). Центрифугировать 15 мин на 13 000 об/мин, супернатант перенести в чистую пробирку. Повторить очистку хлороформом. В чистую пробирку перенести 555 мкл супернатанта и осадить ДНК 1 мл 95 %-го этанола, аккуратно перемешивая до полного растворения спирта. Центрифугировать 5 мин на 13 000 об/мин. Жидкость слить, осадок промыть раствором, содержащим 75 %-й этанол, ТЕ, 10 mM ацетат аммония и 10 mM ацетат натрия. Далее осадок

промыть 96 %-м этанолом. Спирт слить, центрифугировать 10 с на 2000 об/мин, отобрать остатки спирта пипеткой, осадок подсушить до исчезновения блеска. Осадок растворить 555 мкл смеси ТЕ и 5М NaCl (2 : 1), инкубировать 10 мин при КТ. Добавить 800 мкл хлороформа (24 : 1), перемешать и убедиться, что нерастворившаяся часть осадка плавает в растворе, а не прилипла к стенкам пробирки. Центрифугировать 10 мин на 13 000 об/мин. Перенести 500 мкл супернатанта в чистую пробирку и осадить 1 мл 95 %-го этанола, спирт слить, осадок промыть вначале 80 %-м, а затем 95 %-м этанолом, высушить и растворить в 200 мкл ТЕ или mQH_2O .

ПЦР проводили на амплификаторе C-1000 (Bio-Rad, USA) в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала: 1,5 ед. Таq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия, 5 ед/мкл); 1× Таq-буфер без Mg^{2+} (Медиген, Россия); 2,3 мМ MgCl ; 0,8 мМ dNTPs (Медиген, Россия); 0,8 мМ ISSR-праймер (Медиген, Россия); раствор ДНК – 2 мкл, вода mQH_2O – до 25 мкл.

Амплификацию проводили по следующей программе: первичная денатурация при 95 °С – 2 мин; 38 циклов – денатурация 94 °С – 20 с, отжиг праймеров (T_a – температуры отжига и нуклеотидные последовательности указаны в табл. 2) – 45 с, элонгация – 1,5 мин; конечная элонгация – 7 мин.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1,5 %-м агарозном геле в 1× ТАЕ-буфере при напряжении 4 В/см.

Для количественной оценки полиморфизма использованных маркеров и определения уровня дивергенции между изученными генотипами полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие пептидных компонентов или ПЦР-фрагментов одинакового размера рассматривалось как состояние 1 и 0.

Для статистической обработки данных использовали пакет программ TREECON (version 1.3b) (Peer, Wachter, 1994). Генетические дистанции рассчитывали по Нею (Nei, Li, 1979), использовали формулу $GD_{xy} = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, где N_{xy} – число общих фрагментов для образцов x и y , N_x и N_y – число фрагментов для образцов x и y соответственно. Для построения дендро-

грамм применяли метод neighbor-joining (NJ) с bootstrap-поддержкой – 100 псевдореплик. Уровень полиморфизма (P) каждого праймера (в процентах) рассчитывали по формуле $P = 100 * N_p / N$, где N_p – число полиморфных фрагментов, N – общее число фрагментов.

Для изучения возможности гибридизации рябины с рябинокизильником в качестве материнских растений были выбраны две перспективные для интродукции и селекции формы рябины: ЦВР-5 – отборная форма *S. sibirica*, характеризующаяся крупноплодностью, хорошими вкусовыми качествами плодов и раскидистой формой кроны; БК-1 – межвидовой гибрид рябины F_1 (*Sorbus sambucifolia* (Cham. et Schlecht). M. Roem. (рябина бузинолистная) × *S. sibirica*), характеризующийся крупноплодностью, отсутствием горечи и терпкости в плодах, скороплодностью и низкорослостью. В качестве отцовского растения использовали форму рябинокизильника, произрастающую в коллекции дендрария ЦСБС и характеризующуюся хорошим вкусом плодов, низкорослостью, скороплодностью, самоплодностью, хорошей укореняемостью черенков, обильным плодоношением. Пыльцу выделяли из полураспустившихся бутонов и проверяли ее фертильность ацетокарминовым методом. Гибридизацию проводили в соответствии с методическими рекомендациями Я.С. Нестерова (Программа и методика ..., 1972).

Гибридные семена хранились высушенными при комнатной температуре и были заложены на непрерывную стратификацию 16.02.2012 г. при температуре 1–3 °С. Сеянцы выращивали при комнатной температуре с 16-часовым освещением под ДРЛ-лампой в течение 5 месяцев, после чего их перенесли в помещение с температурой 1–8 °С и с 6-часовым освещением. После прохождения периода покоя сеянцы вернули к прежнему режиму выращивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По нашим данным, в условиях Новосибирска в 2011 г. семенная фертильность выбранной нами формы рябинокизильника составляла 59 %, пыльцевая фертильность – 92 %. Следует отметить, что высокая пыльцевая и семенная фертильность отдаленных гибридов является

признаком сбалансированности гибридного генома и свидетельствует о высоком уровне родства исходных видов.

Результаты проведенных в 2011 г. скрещиваний *S. sibirica* и F₁ (*S. sambucifolia* × *S. sibirica*) с *S. pozdnjakovii* представлены в табл. 1.

Поскольку для видов рода *Sorbus* в зависимости от индивидуальных особенностей растения и погодных условий характерно апомиктичное завязывание плодов (Liljefors, 1953, 1955; Robertson *et al.*, 2004), то помимо контроля самофертильности проводились скрещивания с яблоней Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana* Dieck). Также для сравнения представлены сведения по свободному опылению (табл. 1).

По нашим данным, в 2011 г. в вариантах с самоопылением и опылением пыльцой *M. niedzwetzkyana* плоды не завязались, что свидетельствует о самостерильности форм ЦВПП-5 и БК-1 и снижает вероятность завязывания плодов путем стимулятивного апомиксиса. В вариантах со свободным опылением и при реципрокном скрещивании ЦВПП-5 и БК-1 наблюдался высокий процент завязываемости плодов и семян. Это свидетельствует о благоприятных

погодных условиях для гибридизации (при неблагоприятных погодных условиях завязываемость может отсутствовать или завязываются единичные плоды).

В комбинациях ЦВПП-5 и БК-1 с рябинокизильником завязываемость плодов составила 86,7 и 34,9 % соответственно. При свободном и реципрокном опылениях этот показатель был выше 70 %. В комбинациях с рябинокизильником по сравнению с контрольными вариантами наблюдалось снижение семенной фертильности, но она все же оставалась относительно высокой – более двух семян на плод.

Таким образом, полученные результаты по скрещиваемости рябины и рябинокизильника свидетельствуют о достаточно большой вероятности завязывания гибридных семян. Однако на основании этих данных нельзя полностью исключить вариант апомиктичного образования плодов и семян.

Для достоверного определения гибридной или апомиктичной природы полученных семян мы использовали SDS PAAG метод. Поскольку данная работа была направлена на выявление возможности использования молекулярных

Таблица 1

Результаты скрещиваний *Sorbus sibirica* Hedl. и F₁ (*Sorbus sambucifolia* (Cham. et Schlecht). M. Roem. × *S. sibirica*) с *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. и *Malus niedzwetzkyana* Dieck.

Материнское растение	Опылитель	Число опыленных цветков, шт.	Число завязавшихся плодов, шт.	Завязавшиеся плоды, %	Число выполненных семян, шт.	Число выполненных семян на плод, шт.
<i>S. sibirica</i> (ЦВПП-5)	<i>Sorbocotoneaster pozdnjakovii</i>	210	182	86,7	486	2,7
	<i>Malus niedzwetzkyana</i>	300	0	0,0	–	–
	Самоопыление	200	0	0,0	–	–
	Свободное опыление	200	146	73,0	505	3,5
	F ₁ (<i>S. sambucifolia</i> × <i>S. sibirica</i>) (БК-1)	200	154	77,0	336	2,2
F ₁ (<i>S. sambucifolia</i> × <i>S. sibirica</i>) (БК-1)	<i>Sorbocotoneaster pozdnjakovii</i>	175	61	34,9	129	2,1
	<i>Malus niedzwetzkyana</i>	125	0	0,0	–	–
	Самоопыление	100	0	0,0	–	–
	Свободное опыление	150	109	72,7	547	5,0
	<i>S. sibirica</i> (ЦВПП-5)	132	106	80,3	379	3,6

методов, то в силу ряда причин мы исследовали лишь один вариант скрещивания – *S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*.

Известно, что запасные белки растений подразделяются по типам растворимости на альбумины, глобулины, проламины и глютелины (Осборн, 1935). В связи с этим было необходимо уточнить тип растворимости и выбрать оптимальный метод экстракции белков семядолей исследуемых объектов. Для этой цели белки одной семядоли каждого семени экстрагировали в дистиллированной воде (экстрагируются водорастворимые альбумины), а другой – в SDS-буфере, который экстрагирует все названные типы белков. Полученные электрофореграммы представлены на рис. 1. Поскольку полипептидные спектры не различались по составу компонентов, то, следовательно, все экстрагируемые белки относятся к водорастворимым альбуминам. Варианты +Me и –Me имеют значительные отличия, что говорит о сложном полимерном строении части белков и, соответственно, о потенциально большей информативности спектров их субъединиц.

Поскольку экстракция в SDS-буфере сокращает процедуры, то в дальнейших экспериментах все экстракты были получены в этом буфере

в двух вариантах – с добавлением β-меркаптоэтанол (+Me) и без него (–Me).

На рис. 2 представлены SDS-электрофореграммы белков семядолей гибридных семян F₁ (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*) в сравнении с родительскими формами и электрофореграммами *C. lucidus* и *S. aucuparia*.

Полученные спектры запасных белков семядолей у гибридных семян и у семян исходных видов подтвердили гибридное происхождение семян в комбинации *S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*, а также гибридное происхождение *S. pozdnjakovii*. Возвратное скрещивание *S. pozdnjakovii* с *S. sibirica* приводит к образованию генотипов, значительно различающихся по набору альбуминовых компонентов, характерных для обоих родов.

Проявление у некоторых гибридов (образцы 4, 5, 6, 10) в варианте –Me компонентов, отсутствующих у родительских генотипов (рис. 2), можно объяснить гетерозиготностью родительских форм и, в особенности, сложным составом генома отцовского растения.

Использованный нами в скрещивании образец *S. pozdnjakovii* является сложным межродовым гибридом с неустановленным числом хромосом. По данным В.Н. Гладковой (1967),

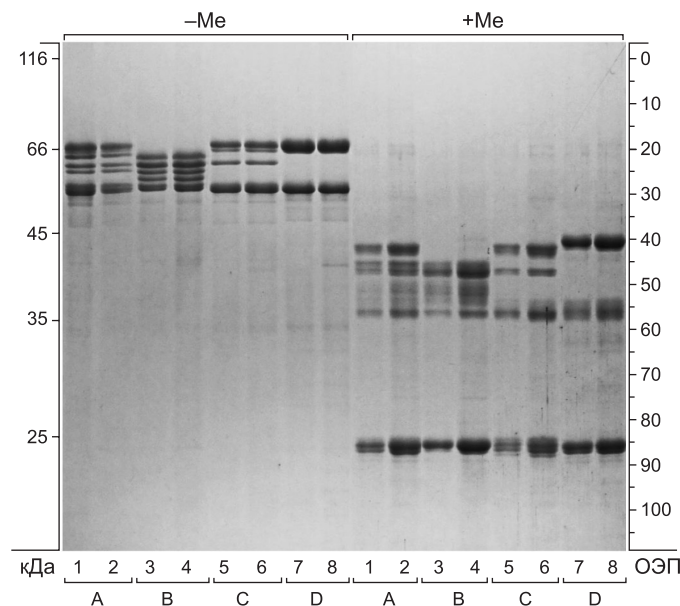


Рис. 1. SDS-электрофореграммы белков семядолей семян *S. pozdnjakovii* (A), *C. lucidus* (B), F₁ (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*) (C), *S. sibirica* (D).

1, 3, 5, 7 – водные экстракты; 2, 4, 6, 8 – SDS-экстракты. Полипептидные спектры отдельных семян в вариантах –Me и +Me.

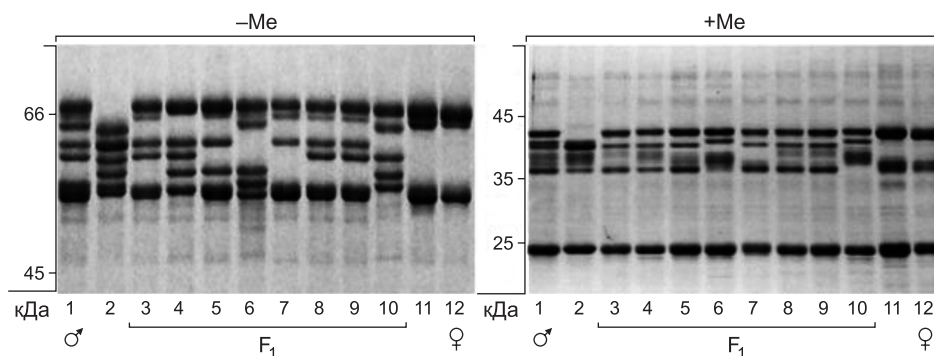


Рис. 2. SDS-электрофореграммы белков семян гибридных семян F_1 (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*) в сравнении с родительскими формами.

1 – ♂ – отцовская форма *S. pozdnjakovii*; 2 – *C. lucidus*; 3–10 – F_1 – выборка гибридных семян; 11 – *S. aucuparia*; 12 – ♀ – материнская форма ЦВПР-5 (*S. sibirica*). Полипептидные спектры отдельных семян в вариантах –Me и +Me.

хромосомный набор *Sorbocotoneaster* может быть $2n = 68, 85$. Неизвестно, сколько гапломов *Cotoneaster* и *Sorbus* содержит гибридный геном *Sorbocotoneaster* и какие гаметы он формирует. Например, не исключено образование мужских гамет, содержащих гапломы только одного из родительских видов из рода *Cotoneaster* или *Sorbus*. С учетом того что основной набор хромосом ($2n = 17$) в подсемействе *Maloideae* (*Rosaceae*) произошел в результате комбинации ($n = 7, 8$ или 9) древних гапломов (Evans, Campbell, 2002), в ситуации с рябинокизильником не исключены самые разнообразные варианты рекомбинации. Термин «рекомбинация» мы используем в широком смысле, поскольку для аллополиплоидных геномов, помимо кроссинговера и комбинационной аллельной изменчивости, характерны значительные перестройки, связанные с активацией мобильных элементов, эпигенетическими, транскриптомными и прочими изменениями (Щербань, 2013). Например, в результате таких перестроек возможны проявления молекулярных и морфологических новообразований или, напротив, спектров признаков, неотличимых или очень похожих на родительские.

На основе полученных данных нельзя убедительно судить о действительных филогенетических связях между *Sorbocotoneaster*, *Cotoneaster*, *Sorbus* и их гибридами. Для этих целей необходимы репрезентативные выборки представителей в каждом из трех родов. В наши задачи такой анализ не входил, так как основная цель состояла в том, чтобы показать на конкретном примере

возможность применения молекулярных методов для экспресс-контроля успешности гибридизации. Поскольку в данном анализе точно известны родительские генотипы, то, по нашему мнению, проявление в потомстве пептидных спектров, очень похожих на отцовский спектр, свидетельствует об успешности гибридизации и, следовательно, об эффективности использованного метода. Несомненно, что данный метод в комплексе с методами морфометрического и генетического анализа позволит решать и вопросы филогении.

На основе полученных полипептидных спектров в вариантах –Me и +Me были рассчитаны генетические дистанции и построена консенсусная NJ-дендрограмма (рис. 3). На дендрограмме родительские формы достоверно отделяются от гибридов, которые в зависимости от наследованной доли генов занимают промежуточное или более близкое к одному из родителей положение. Полученные данные свидетельствуют о протекании достаточно сбалансированного процесса рекомбинации при гибридизации рябинокизильника с рябиной сибирской, что, вероятно, обусловлено близким генетическим родством исходных форм на уровне гомологии их геномов.

Всхожесть гибридных семян после предварительной холодной стратификации в комбинации (*S. sambucifolia* × *S. sibirica*) (БК-1) × *S. pozdnjakovii* составила 89 %, в комбинации *S. sibirica* (ЦВПР-5) × *S. pozdnjakovii* – 72 %. Каких-либо существенных нарушений в развитии сеянцев не наблюдалось, процент выпадов

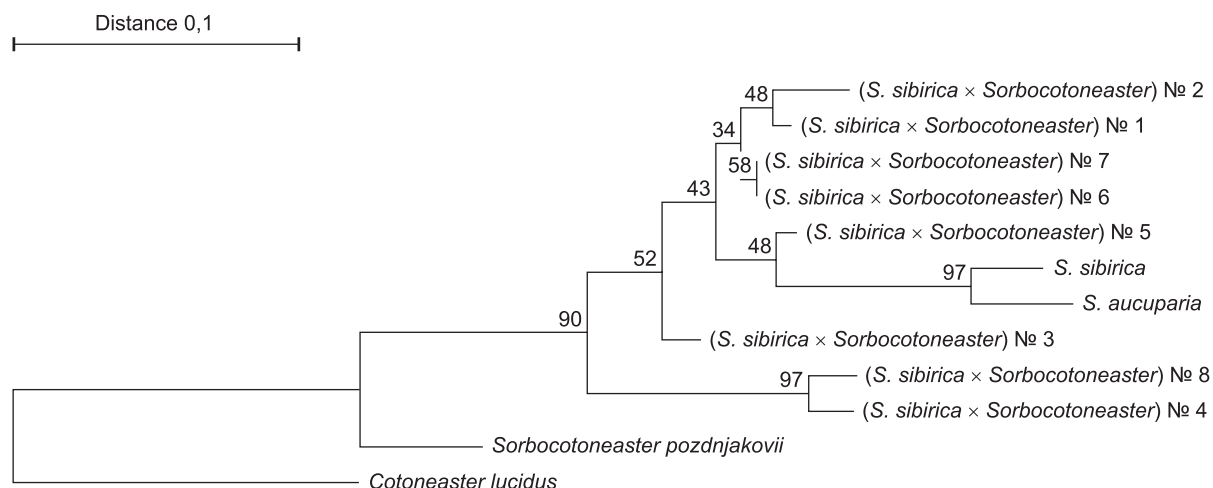


Рис. 3. Консенсусная дендрограмма (варианты –Me и + Me), построенная методом neighbor-joining (NJ) на основе данных по альбуминам семядолей отдельных семян *S. sibirica*, *S. pozdnjakovii*, *C. lucidus*, F_1 (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*).

Шкала сверху – генетические расстояния (по: М. Nei, W.-Li, 1979). Цифры над узлами показывают уровень статистической поддержки ветвей (bootstrap).

был незначительным. После прохождения покоя заметных нарушений в развитии сеянцев также не наблюдалось.

Все гибридные сеянцы в различных долях сочетали признаки родительских форм. По внешнему виду они были похожи на рябину, но имели нетипичное для рябины сибирской густое опушение нижней стороны листа и часто редкое опушение с верхней стороны. Верхняя часть листа за счет частичного или полного срастания центрального листочка с верхней парой боковых листочков имела характерное для рябинокизильника асимметричное строение (рис. 4).

Опушение побегов и центральных жилок листьев также было значительно более интен-

сивным, чем у рябины сибирской. Почти все гибридные сеянцы F_1 (*S. sambucifolia* × *S. sibirica*) (БК-1) × *S. pozdnjakovii*) наследовали от *S. sambucifolia* глянецкую поверхность листа.

Таким образом, высокий процент прорастания семян, полученных при половой гибридизации, и характер развития гибридных сеянцев свидетельствуют о хорошей жизнеспособности гибридных генотипов, а особенности морфологии листьев подтверждают их гибридное происхождение.

Однако в ряде случаев, особенно при гибридизации близкородственных форм, морфологические различия вегетативных органов могут быть недостаточны для идентифика-

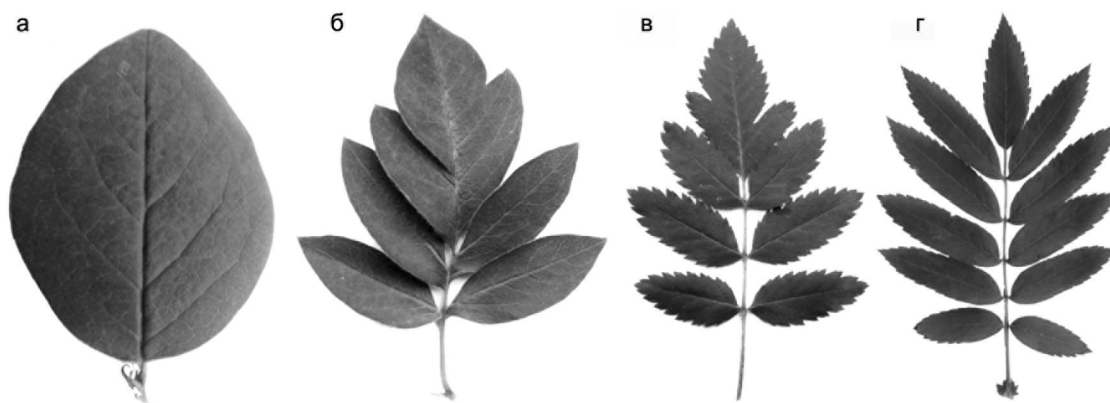


Рис. 4. Листья (а) – *C. melanocarpus*, (б) – *S. pozdnjakovii*, (в) – F_1 (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*), (г) – *S. sibirica*.

ции гибридных семян. В этих случаях для ранней диагностики и селекции гибридных генотипов могут быть использованы молекулярно-генетические методы. Одним из самых распространенных и информативных методов является анализ электрофоретических спектров межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR).

Проведенный нами предварительный скрининг 20 ISSR праймеров позволил отобрать 6 наиболее информативных маркеров по числу синтезируемых полиморфных ДНК-фрагментов, которые были использованы в дальнейшей работе. В результате были получены электрофореграммы продуктов амплификации (рис. 5).

На 6 электрофореграммах было выявлено 136 фрагментов размером от 350 до 2 500 пар нуклеотидов, из которых 125 были полиморфными – выявляли различия между образцами. Число фрагментов, амплифицируемых одним

праймером, варьировало от 19 (17898А) до 26 (НВ-10) и в среднем в пересчете на праймер составило 23 (табл. 2).

Уровень полиморфизма, выявляемого отдельно взятым праймером, варьировал от 84,6 (при амплификации с праймером НВ-10) до 96 % (с праймером UBC-857) и в среднем составил 90,5 %.

В данном эксперименте, как и в случае с электрофорезом белков, поведение некоторых ISSR-компонентов не соответствовало строго доминантному типу наследования. Всего было обнаружено 3 ампликона, присутствующих у некоторых гибридных генотипов, но отсутствующих у обоих родителей (по одному у праймеров 17898В, М-1 и UBC-857), и три ампликона, присутствующих у родителей, но отсутствующих у некоторых гибридов (один у праймера М-1 и два у UBC-857). Даже если полностью исключить из анализа эти три мар-

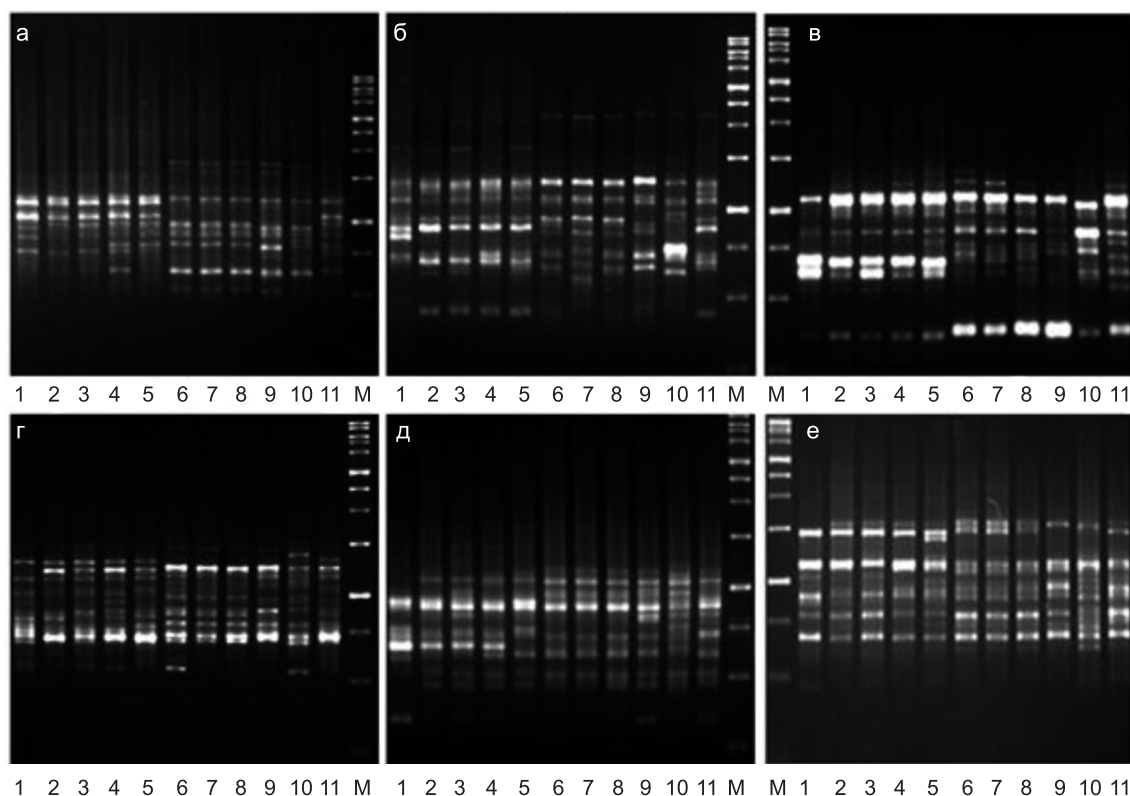


Рис. 5. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК (метод ISSR-PCR) гибридных семян F₁ (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*) (треки 2–5) в сравнении с родительскими формами *S. sibirica* (трек 1) и *S. pozdnjakovii* (трек 11) и формами *C. integerrimus* (треки 6–8), *C. melanocarpus* (трек 9), *C. lucidus* (трек 10).

Трек М – ДНК-маркер 1kb (250–10000 bp). а – праймер 17898А; б – 17898В; в – 17899В; г – НВ-10; д – UBC-857; е – М-1.

Таблица 2

Характеристика праймеров, использованных для изучения ДНК-полиморфизма образцов *Sorbus*, *Cotoneaster*, *Sorbocotoneaster*

Нуклеотидная последовательность 5'–3'	Наименование праймера	Ta (°C)	Число амплифицируемых фрагментов	Уровень полиморфизма, %	Размер фрагментов ДНК, п.н.
(CA) ₆ AC	17898A	42	19 (17)	89,5	500–2500
(CA) ₆ GT	17898B	42	20 (18)	90,0	450–2250
(CA) ₆ GG	17899B	41	22 (21)	95,5	375–2000
(GA) ₆ CC	НВ-10	44	26 (24)	84,6	500–2250
(AC) ₈ CG	М-1	47	24 (21)	87,5	450–2500
(AC) ₈ YG	UBC-857	55	25 (24)	96,0	350–1600

кера, то топология дерева и дистанции между образцами практически не изменяются.

Для ISSR-анализа мы взяли меньшее число гибридных образцов, но увеличили число представителей *Cotoneaster*. Предполагалось, что хотя бы один из имеющихся в нашей коллекции биотипов кизильника может оказаться достаточно близок к рябинокизильнику. Тогда этот образец можно было выбрать в качестве одного из родителей для попытки искусственного ресинтеза рябинокизильника. Однако на полученной консенсусной NJ-дендрограмме (рис. 6) все представители *Cotoneaster* оказались в отдельной ветви почти на одинаковом расстоянии от рябинокизильника, который вместе с *S. sibirica* и гибридами выделился в другую ветвь. Все искусственно полученные

гибриды F₁ (*S. sibirica* × *S. pozdnjakovii*) заняли промежуточное между родительскими видами положение, что в очередной раз подтверждает гибридное происхождение их геномов.

В заключение следует отметить, что возникновение и устойчивое воспроизведение в природе таких гибридов, как *Sorbocotoneaster*, в очередной раз подтверждают значительную роль симпатрического пути образования новых таксонов в подсемействе яблоневых. Возникнув в результате комбинации двух существенно различающихся морфологических форм, полиплоидный геном *Sorbocotoneaster* оказался способен к апомиктичному воспроизведению, что позволяет ему сохранять свой новый морфологический тип. В то же время, формируя фертильную пыльцу, *Sorbocotoneaster* не утра-

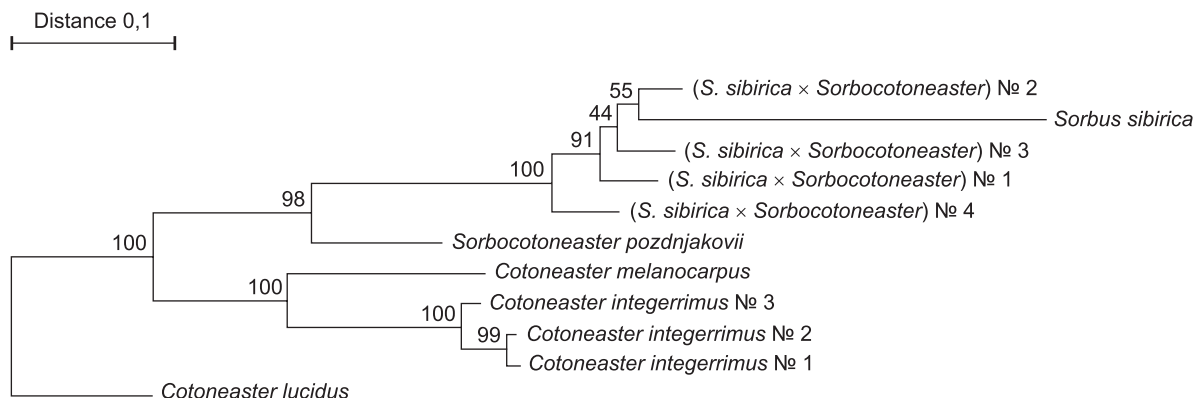


Рис. 6. Консенсусная дендрограмма, построенная методом neighbor-joining (NJ) на основе данных по ISSR-PCR спектрам *S. sibirica*, *S. pozdnjakovii*, *C. melanocarpus*, *C. integerrimus*, *C. lucidus*, F₁ (*S. sibirica* × *Sorbocotoneaster pozdnjakovii*).

Шкала сверху – генетические расстояния (по: М. Nei, W.-Li, 1979). Цифры над узлами показывают уровень статистической поддержки ветвей (bootstrap).

тил возможности скрещиваться по крайней мере с одним из исходных видов – *S. sibirica*, что способствует рекомбинации и переносу генов между значительно различающимися по адаптивному потенциалу и морфологии таксонами.

В отличие от рябинокизильника все другие известные спонтанные или искусственные межродовые гибриды с участием *Sorbus* возникли в результате гибридизации со слабовзимостойкими формами и практически непригодны для выращивания в условиях Сибири. *Sorbocotoneaster* в этом смысле уникален, поскольку возник в результате гибридизации полностью зимостойких в наших условиях видов.

Таким образом, использование кизильника открывает широкие возможности в селекции рябины в Сибири, поскольку представители этого рода являются потенциальными донорами необходимых признаков, источники которых очень ограничены или отсутствуют, а имеющиеся – слабовзимостойки в наших условиях.

Показанная в настоящем исследовании возможность использования рябинокизильника в селекции рябины в перспективе позволит не только получать устойчивые в Сибири сорта рябины с комбинацией ценных признаков, но и благодаря его более широкому вовлечению в интродукционный процесс будет способствовать сохранению и более детальному изучению этого редкого и находящегося под угрозой исчезновения рода. Использование молекулярно-генетических методов позволит сократить трудоемкость этого процесса и в короткие сроки получать достоверную информацию для контроля этапов интродукционных исследований.

ВЫВОДЫ

Методы электрофореза запасных белков семядолей (SDS PAAG) и межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR) являются эффективными инструментами для идентификации и селекции гибридных генотипов при гибридизации *Sorbus sibirica* Hedl. и *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark.

Полученные результаты по распределению компонентов запасных белков семядолей и межмикросателлитных последовательностей ДНК подтверждают данные о происхождении

рябинокизильника Позднякова в результате гибридизации рябины и кизильника.

При гибридизации рябинокизильника с рябиной сибирской наблюдается рекомбинация молекулярно-генетических и морфологических признаков, что свидетельствует о близком родстве их геномов и, следовательно, о перспективности использования рябинокизильника в селекции рябины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 14-04-01096-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов А.В., Агафонова О.В. SDS-электрофорез белков эндосперма у представителей рода пырейник (*Elymus* L.) с различной геномной структурой // Сиб. биол. журнал. 1992. Вып. 3. С. 7–12.
- Гладкова В.Н. Цитологическое изучение спонтанного гибридогенного рода *Sorbocotoneaster* Pojark // Ботан. журнал. 1967. Т. 52. № 3. С. 981–983.
- Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Гео, 2012. С. 376–377.
- Красная книга Республики Саха (Якутии). Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Якутск: НИПК «Сахаполиграфиздат», 2000. С. 176–177.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 855 с.
- Осборн Т.Б. Растительные белки. М.; Л.: Биомедгиз, 1935. 220 с.
- Петрова А.Е., Назарова Е.И. Романова А.Ю. Интродукция рябинокизильника Позднякова – эндема Южной Якутии // Ботанические исследования в криолитозоне. Якутск: ЯНЦ СО РАН, 1992. С. 74–80.
- Программа и методика отдаленной гибридизации плодовых и ягодных культур / Под ред. Я.С. Нестерова. Мичуринск: ЦГЛ им. И.В. Мичурина, 1972. 144 с.
- Редкие и исчезающие растения Сибири. Новосибирск: Наука, 1980. 224 с.
- Щербань А.Б. Реорганизация генома растений в ходе аллополиплоидизации // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 277–285.
- Evans R.C., Campbell C.S. The origin of the apple subfamily (*Maloideae*; *Rosaceae*) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes // Am. J. Bot. 2002. V. 89. No. 9. P. 1478–1484.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. No. 5259. P. 680–685.
- Liljefors A. Studies on propagation, embryology and pollination in *Sorbus* // Acta Horti Bergiani. 1953. V. 16. P. 277–329.
- Liljefors A. Cytological studies in *Sorbus* // Acta Horti Bergiani. 1955. V. 17. P. 47–113.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic

- variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. No. 10. P. 5269–5273.
- Peer Van de Y., Wachter R.D. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.
- Puchooa D.A. simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) // Afr. J. April. 2004. V. 3. No. 4. P. 253–255.
- Robertson A., Newton A.C., Ennos R.A. Breeding systems and continuing evolution in the endemic *Sorbus* taxa on Arran // Heredity. 2004. V. 93. P. 487–495.

APPLICATION OF THE ELECTROPHORESIS OF COTYLEDON PROTEINS AND ISSR-MARKERS TO THE IDENTIFICATION OF HYBRIDS BETWEEN *SORBUS SIBIRICA* HEDL. AND *SORBOCOTONEASTER POZDNJAKOVII* POJARK.

S.V. Asbaganov, E.V. Kobozeva, A.V. Agafonov

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: cryonus@mail.ru

Summary

It is shown that cotyledon protein SDS-electrophoresis and inter-simple sequence repeat DNA markers (ISSRs) can be used in identification of hybrid genotypes in *Sorbus sibirica* Hedl. and *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. hybridization. Recombination of molecular and morphological characters was observed in hybrids, which proves close relationships of the parental genomes and, as a consequence, the potential of utilizing *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* genotypes in breeding of *Sorbus* cultivars. The results confirm that the genus *Sorbocotoneaster* arose as a result of *Sorbus* and *Cotoneaster* hybridization.

Key words: *Sorbocotoneaster*, intergeneric crosses, molecular markers.