

ВЫЯВЛЕНИЕ ИНФОРМАТИВНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ ПОЛИМОРФИЗМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ СОРТООБРАЗЦОВ *STEVIA REBAUDIANA*

Елена Олеговна Колесникова¹
Татьяна Петровна Жужжалова¹
Никита Александрович Карпеченко¹
Наталья Дмитриевна Верзилина²
Елена Николаевна Васильченко¹
Валентина Васильевна Знаменская¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова

²Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Представлены результаты исследований молекулярного тестирования с помощью ДНК-маркеров коллекционных образцов *Stevia rebaudiana* (Bertoni), эндемика плоскогорий Северо-восточного Парагвая у границы с Бразилией, ценного многолетнего растения, содержащего в составе всех надземных органов комплекс дитерпеновых гликозидов (стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, Д, Е и др.). В связи с образованием в результате длительной селекционной работы коллекции сортобразцов *Stevia rebaudiana* целесообразным стало проведение идентификации всех генотипов, поскольку информация об анализе генома растений *Stevia* с использованием ДНК-маркеров практически отсутствует или представлена фрагментарно. В результате исследований изучены особенности полиморфизма амплифицированных фрагментов нуклеиновых кислот 8 сортобразцов *Stevia rebaudiana* различного происхождения и 9 соматоклональных вариантов с использованием RAPD-праймеров Oligo. Показано, что наиболее информативным оказалось применение праймера Oligo 29, позволившее разделить изучаемый материал на 3 группы, различающиеся по спектрам амплифицированных фрагментов. Использование секвенирования фрагментов ДНК хлоропластного генома *Stevia rebaudiana* (Bertoni), амплифицированных с помощью праймеров ITS1 и ITS4, дало возможность выявить генетические различия нуклеотидных последовательностей геномов сортобразцов и установить генетическое родство материала № 0 Бразильского происхождения и № 35, созданного на его основе. Результаты молекулярно-генетического анализа ДНК имеют теоретическую и практическую значимость, так как позволяют определять структурные изменения в нуклеотидной последовательности, что может служить основой для маркирования и паспортизации коллекционных сортобразцов *Stevia rebaudiana* (дикорастущих форм, полученных на их основе селекционных сортов и соматоклональных вариантов).
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стевия, идентификация генотипов, праймеры, локус, генетический полиморфизм, ДНК-маркеры.

IDENTIFICATION OF INFORMATIVE DNA MARKERS CHARACTERIZING THE POLYMORPHISM OF NUCLEIC ACID SEQUENCES IN *STEVIA REBAUDIANA* VARIETIES

Elena O. Kolesnikova¹
Tatiana P. Zhuzhhalova¹
Nikita A. Karpechenko¹
Natalia D. Verzilina²
Elena N. Vasilchenko¹
Valentina V. Znamenskaya¹

¹A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

²Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

The authors present the results of research on molecular testing using the DNA markers of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) collection samples, endemic to the highlands of North-Eastern Paraguay near the border with Brazil. This is a valuable perennial plant that contains diterpene glycosides (stevioside, rebaudioside A, B, C, D, E, etc.)

in all its aerial parts. A collection of *Stevia rebaudiana* varieties has been created due to long-term selection work; thus, it would be beneficial to perform an identification of all genotypes, since the information on genome analysis of *Stevia* plants using the DNA markers is virtually absent or represented by fragments. The results of research helped to study the peculiarities of polymorphism in the amplified fragments of nucleic acids from 8 *Stevia rebaudiana* varieties of different origin and 9 somaclonal variations using the Oligo RAPD primers. It is shown that the most informative was the Oligo 29 primer that allowed dividing the studied material in 3 groups distinguished by the spectra of amplified fragments. The use of sequencing of DNA fragments of *Stevia rebaudiana* chloroplast genome amplified with ITS1 and ITS4 primers allowed identifying the genetic differences in genomic nucleotide sequences of varieties and establishing the genetic relationship between the materials №0 of Brazilian origin and its derivative №35. The results of molecular-genetic analysis of the DNA have a certain theoretical and practical importance, since they allow determining the structural changes in the nucleotide sequence, which can provide the basis for marking and certification of *Stevia rebaudiana* collection varieties (wild forms, selection cultivars derived from them and somaclonal variations).

KEY WORDS: stevia, genotype identification, primers, locus, genetic polymorphism, DNA markers.

В ведение

Увеличение экологической и техногенной нагрузки на человека приводит к поиску новых препаратов растительного происхождения без побочных эффектов. Источником последних могут быть новые растительные культуры, такие как *Stevia rebaudiana*, сладость которой определяется содержанием комплекса дитерпеновых гликозидов (стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, Д, Е и др.). Это особенно ценно для людей с нарушенной толерантностью к углеводам и более серьезными проблемами с обменом веществ [7, 10]. Кроме того, листья *Stevia rebaudiana* содержат дубильные вещества, флавоноиды, кофейную и хлорогеновую кислоты, которые обуславливают антиоксидантные свойства культуры [5].

Stevia rebaudiana (Bertonii) является эндемиком плоскогорий Северо-восточного Парагвая у границы с Бразилией [9]. Возможность интродукции стевии в Центрально-Черноземном регионе России определяется адаптационной способностью культуры в новых для нее условиях. В связи с этим необходима работа по созданию сортов с адаптивными свойствами с применением биотехнологических методов [6]. За длительные годы исследований в ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» проводились работы по изучению форм различного происхождения и созданию новых сортов *Stevia rebaudiana*, в результате чего сформировалась постоянная коллекция сортоформ, отличающихся по морфологии и происхождению.

Для идентификации изменений у растений из коллекции, а также новых полученных сортов и форм стевии целесообразно использовать молекулярно-генетические методы анализа, позволяющие осуществлять первичный скрининг полученных генотипов уже на ранних этапах развития растения, что значительно ускоряет и повышает точность и надежность селекционного процесса. Методы селекции растений, основанные на применении молекулярных маркеров, вносят существенный вклад в оценку и сохранение природного разнообразия как основного ресурса селекции. Однако информация об анализе генома растений *Stevia* с использованием ДНК-маркеров практически отсутствует или представлена фрагментарно. Также отсутствуют данные о ДНК-маркерах, отражающих изменчивость изучаемых последовательностей нуклеиновых кислот в зависимости от их органелльной локализации, а также характеризующих дикорастущие формы растений *Stevia*, полученные на их основе новые селекционные сорта и соматоклональные варианты при культивировании *in vitro*. В связи с этим актуальным является изучение сортообразцов *Stevia rebaudiana* на основе ПЦР ДНК и отбор измененных форм при культивировании *in vitro*.

Цель исследований заключалась в выявлении информативных ДНК-маркеров, характеризующих полиморфизм последовательностей нуклеиновых кислот и позволяющих детерминировать различные генотипы стевии в культуре *in vitro*.

Материалы и методы исследований

В качестве материалов для исследований были использованы микроклоны сортообразцов из коллекции стевии.

Для изучения полиморфизма нуклеиновых кислот оргanelльных геномов растений *Stevia* были использованы молекулярные подходы. Основу составляли методы молекулярно-генетического анализа: ПЦР, метод ферментативного определения нуклеотидной последовательности (по *Sanger*), фотометрические методы, электрофоретическое фракционирование нуклеиновых кислот, метод с применением СТАВ-буфера [3], а также различные компьютерные программы и приложения: BLAST, FastPCR, AdobePhotoshop, GeneMapper, SeqScape, NEBcutter, MAFFT, включая работу с базой данных генного банка NCBI.

В анализе генетической дифференциации форм стевии использовали микросателлитные праймеры, RAPD-маркеры и микросателлитный митохондриальный локус NAD1 [1, 2, 4, 8]. Применяли 3 микросателлитных ZAG-праймера (ZAG 5b, ZAG 11, ZAG 30), 3 RAPD-праймера для инвертированных повторов (Oligo 1, Oligo 4, Oligo 29) и один микросателлитный митохондриальный праймер (NAD1), которые были отобраны как наиболее информативные (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры, используемые для амплификации участков ДНК стевии

Номер	Название	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига (Ta)
1	QrZAG5b F	TGAAGAGTAAGACCATTACATCA	64°C
	QrZAG5b R	GATGTGAGTGTTTGTGGTTTGG	
2	QrZAG11 F	CCTTGAACCTCGAAGGTGTCCTT	64°C
	QrZAG11 R	GTAGGTCAAACCATTGGTTGACT	
3	QrZAG30 F	TGCTCCGTCATAATCTTGCTCTGA	66°C
	QRZAG30 R	GCAATCCTATCATGCACATGCACAT	
4	Oligo 1	CCTGGGCTTC	43°C
5	Oligo 4	CAAACGGCAC	43°C
6	Oligo 29	CCGGCCTTAC	43°C
7	NAD1_F	CTCTCCCTCACCCATATGATG	57°C
	NAD1_R	AGATCCCATATATTCCCGG	

Для определения длины ампликона использовали стандартные маркеры GeneRuler™, 50 п.н. (50-1031 п.о.).

Для анализа фрагментов хлоропластного генома использовали одну пару ITS1-ITS4, амплифицирующую консервативный домен внутреннего транскрибируемого спейсера.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler фирмы Bio-Rad (США).

Фрагменты ДНК анализировали в трансиллюминаторе «Vilber Lourmat» (Франция).

Результаты и их обсуждение

При выявлении информативных ДНК-маркеров анализ образцов стевии с использованием в качестве затравки ZAG-праймеров не дал ожидаемого результата (рис. 1).

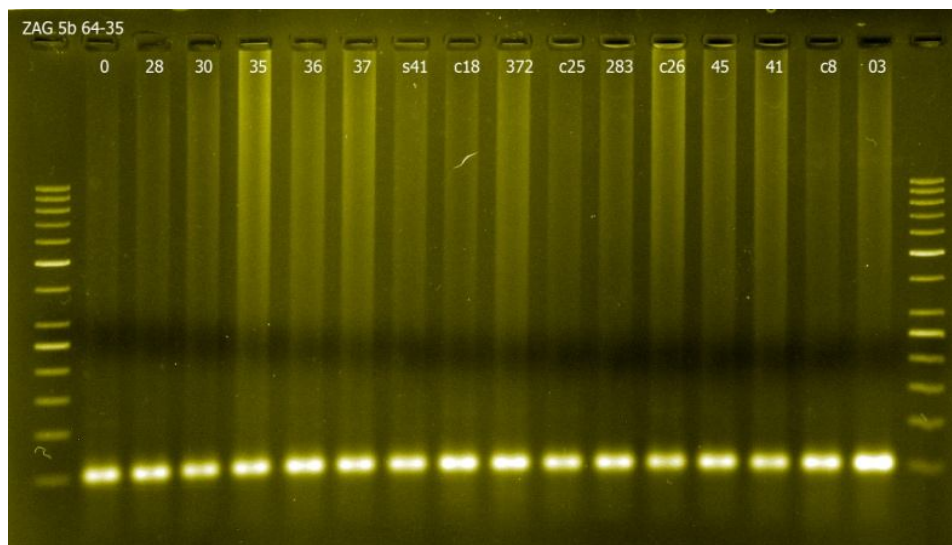
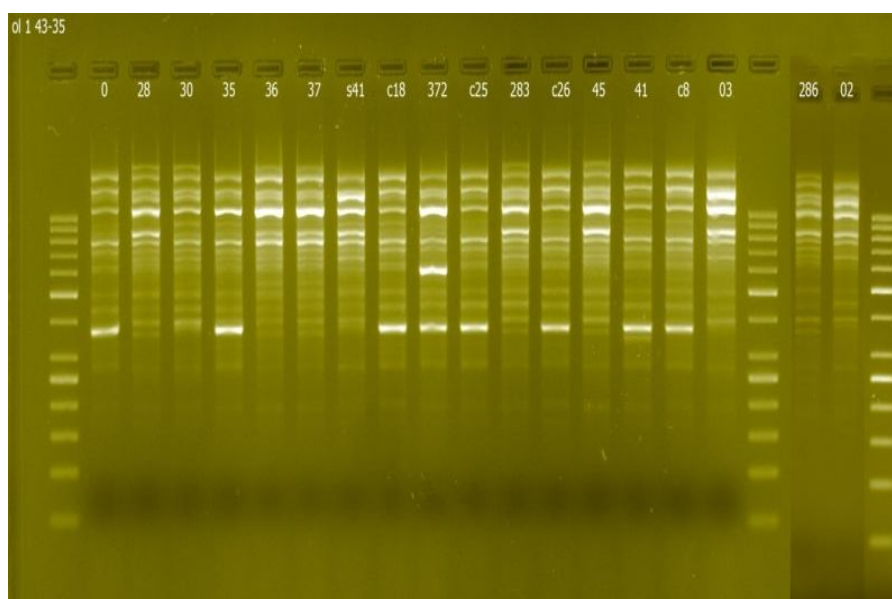


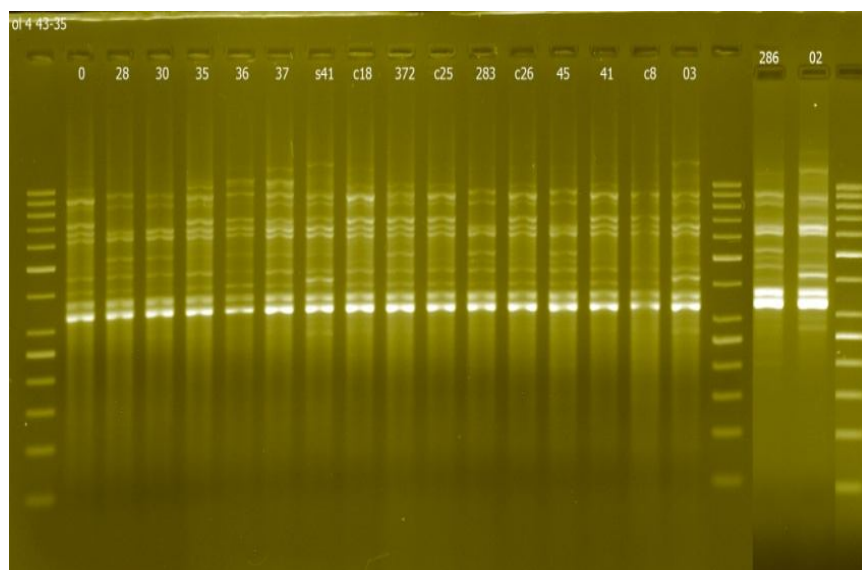
Рис.1. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов стевии с использованием праймера ZAG 5b. Обозначения: 0, 28, 30, ... – номера образцов растений стевии

Полученные электрофореграммы показывают, что для выявления полиморфизма последовательностей нуклеиновых кислот применение трех ZAG праймеров (ZAG 5b, ZAG 11, ZAG 30) не позволяет детерминировать соматклоны стевии в культуре *in vitro*. Данное направление в исследовании полиморфизма нуклеиновых кислот микросателлитных локусов у стевии нуждается в дальнейшем изучении, необходимо продолжать подбор праймеров и выявлять наиболее информативные.

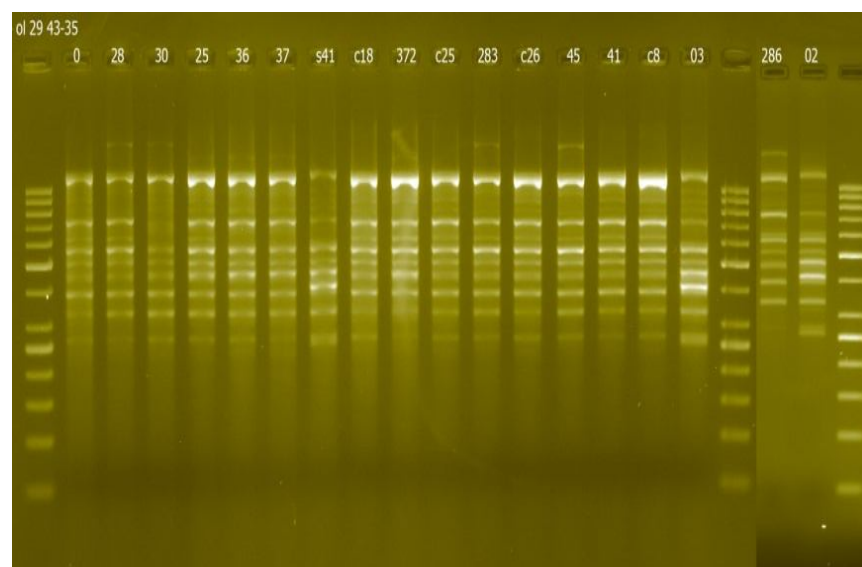
Использование в молекулярно-генетическом анализе стевии трех RAPD-праймеров (Oligo 1, Oligo 4, Oligo 29) позволило выявить характерные спектры ампликонов (рис. 2).



а



б



в

**Рис.2. Электрофореграммы продуктов амплификации образцов стевии с использованием праймеров Oligo 1 (а), Oligo 4 (б), Oligo 29 (в).
Обозначения: 0, 28, 30, 35, 36, 37, 45, 41 – номера образцов растений стевии; S41, c18, c25, 283, c26, c8, 03, 286, 02 – соматональные варианты**

Общее количество амплифицированных локусов по трем RAPD праймерам составило 25, среди которых 9 были полиморфными.

Проанализировав полученные электрофореграммы продуктов амплификации инвертированных локусов растений стевии, можно сделать заключение, что при использовании праймера Oligo 1 вся выборка представленных образцов стевии по их спектру ампликонов условно разделялась на 2 основные группы, имеющие схожие спектры амплифицированных фрагментов:

- 1) образцы № 0, 35, c18, c25, c26, 41, c8;
- 2) образцы № 28, 36, 37, s41, 283, 45, 03, 286, 02.

Образцы № 30 и 372 имели индивидуальные спектры амплифицированных участков, которые не позволяли отнести их ни к одной из 2 выделенных групп.

При использовании в качестве затравки праймера Oligo 4 всю выборку представленных образцов стевии по их спектру ампликонов можно было условно разделить на 2 основные группы:

- 1) образцы № 0, 35, 36, 37, s41, c18, 372, c25, c26, 41, c8, 03, 02;
- 2) образцы № 28, 30, 283, 45, 286.

Анализ полученных ампликонов при использовании праймера Oligo 29 позволил разделить всю выборку на 3 группы:

- 1) образцы № 0, 35, s41, c18, c25, c26, 41, c8, 03, 02;
- 2) образцы № 28, 30, 283, 45, 286;
- 3) образцы № 36, 37, 372.

Обобщенные данные RAPD-анализа образцов стевии приведены в таблице 2.

Таблица 2. Дифференциация образцов стевии на основе результатов RAPD-анализа

Праймер Образец	Oligo 1		Oligo 4		Oligo 29		
	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2	Группа 3
C25	+		+		+		
283		+		+		+	
C26	+		+		+		
45		+		+		+	
41	+		+		+		
C8	+		+		+		
03		+	+		+		
286		+		+		+	
02		+	+		+		
0	+		+		+		
28		+		+		+	
30				+		+	
35	+		+		+		
37		+	+				+
36		+	+				+
S41		+	+		+		
C18	+		+		+		
372			+				+

Исследования показывают, что чем больше признаков и параметров (в данном случае праймеров) берется для анализа, тем достоверней получаются результаты. Очевидно, что если в опытах и дальше увеличивать выборку праймеров, то дифференциация образцов увеличится и, в конечном итоге, одинаковые спектры будут давать только истинные клоны (сортообразцы) стевии.

ПЦР-анализ генома сортообразцов стевии № 0, 28, 30, 35, проведенный при помощи праймеров (ITS1-ITS4), амплифицирующих консервативный домен внутреннего транскрибируемого спейсера, показал присутствие и выровненность локусов хлоропластной ДНК стевии (рис. 3).

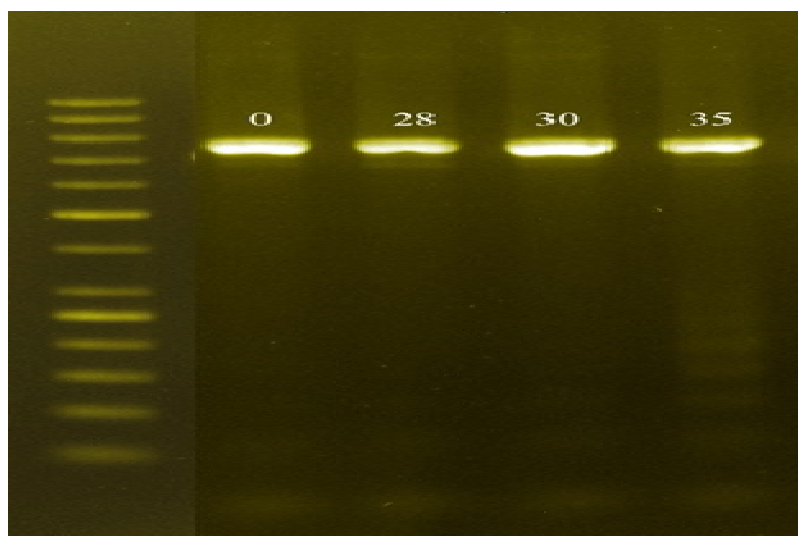


Рис. 3. Электрофореграмма амплифицированных локусов хлоропластной ДНК стевии с использованием праймеров ITS1-ITS4. Обозначения: 0, 28, 30, 35 – номера образцов растений стевии

Молекулярно-генетические исследования с использованием секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК хлоропластного генома коллекционных сортов образцов стевии (№ 0 – бразильского происхождения, № 28 – Парагвай, № 30 – дикорастущая форма, № 35 – тетраплоидный сорт) позволили выявить генетические различия нуклеотидных последовательностей геномов растений с помощью праймеров ITS1-ITS4. Это дало возможность выделить в отдельный кластер сорт образец бразильского происхождения № 0 и полученный на его основе образец № 35, что свидетельствует об их генетическом родстве. Сорт образец из Парагвая № 28 и дикая форма стевии № 30 не объединились в один кластер, отличаясь от вышеуказанных образцов нуклеотидной последовательностью амплифицированных фрагментов, в соответствии с рисунком 4.

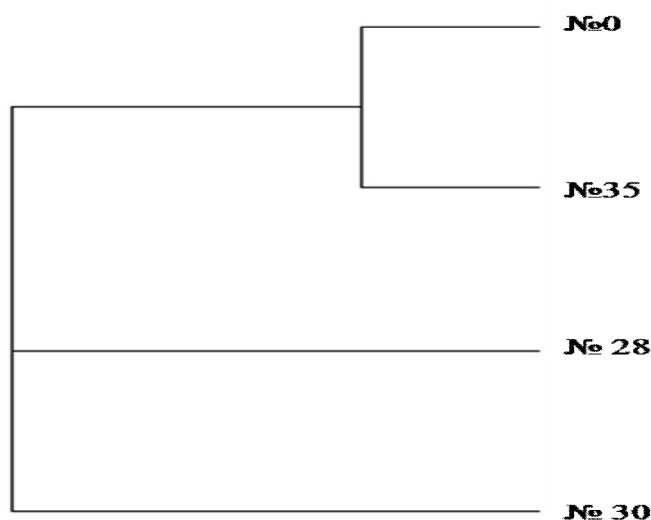


Рис. 4. Дендрограмма генетического родства сортов образцов стевии

Проведенные исследования свидетельствуют, что секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК хлоропластного генома сортов образцов стевии отражает изменчивость его структуры по локусу ITS. Для получения более полной картины об изменчивости структуры хлоропластного генома растений стевии необходимо увеличение числа анализируемых локусов.

Заключение

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований различных форм стевии было установлено, что применяемые ZAG праймеры (ZAG 5b, ZAG 11, ZAG 30) не дают возможности детерминировать генотипы стевии в культуре *in vitro*.

С использованием трех RAPD-праймеров (Oligo 1, Oligo 4, Oligo 29) были выявлены характерные спектры ампликонов.

Молекулярно-генетические исследования позволили идентифицировать информативные ДНК-маркеры, с помощью которых можно определять характерные спектры ампликонов у разных генотипов стевии и условно разделять исследуемые генотипы на основные группы, имеющие схожие спектры амплифицированных фрагментов.

Результаты изучения сортообразцов стевии с использованием секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК хлоропластного генома стевии свидетельствовали об изменчивости его структуры по локусу ITS, на основании чего были выделены отличающиеся сортообразцы.

Проведенные исследования доказывают возможность генотипирования сортообразцов *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. по генетическому родству.

Библиографический список

1. Бирюкова В.А. Оценка генетического разнообразия сортов картофеля и родственных видов *Solanum* методом анализа умеренно повторяющихся последовательностей генома : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / В.А. Бирюкова. – Москва, 2006. – 138 с.
2. Боронникова С.В. Анализ генетической изменчивости популяций двух редких лекарственных видов рода *Adonis* с использованием ISSR-маркеров / С.В. Боронникова, Н.Н. Тихомирова // Известия ТСХА. – 2008. – № 1. – С. 86–94.
3. Зайцев В.С. Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173 / В.С. Зайцев, Э.Е. Хавкин // Докл. РАСХН. – 2001. – № 2. – С. 3–5.
4. Ковалевич О.А. Изменчивость митохондриальной ДНК дуба черешчатого на территории Беларуси / О.А. Ковалевич, Д.И. Каган // матер. международной науч.-практ. конф. «Наука о лесе XXI века». – Гомель : Институт леса НАН Беларуси, 2010. – С. 192–195.
5. Колесникова Е.О. Анализ химического состава *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl., выращенной в условиях ЦЧР / Е.О. Колесникова, Т.Е. Галдина // Отечественная наука в эпоху изменений: постулаты прошлого и теории нового времени : матер. VIII Международной науч.-практ. конф. – Екатеринбург : НАУ, 2015. – С. 106–108.

6. Колесникова Е.О. Особенности каллусогенеза и регенерации *Stevia rebaudiana* (Bertoni) в культуре *in vitro* / Е.О. Колесникова, Т.П. Жужжалова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2012. – Т. 20. – № 15 (134). – С. 28–32.
7. Frohne D. Systematik des Pflanzenreichs / D. Frohne, U. Jensen. – Stuttgart, 1992. – 25 p.
8. Schulman A.H. Molecular markers to assess genetic diversity / A.H. Schulman // *Euphytica*. – 2007. – Vol. 158, No. 3. – P. 313–321.
9. Soejarto D.D. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness / D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn, B.B. Farnworth // *J. Nat. Prod.* – 1982. – Vol. 45, No. 5. – P. 590–599.
10. Tanaka O. Chemistry of *Stevia rebaudiana* Bertoni – New source of natural sweeteners / O. Tanaka // *Recent Adv. Nat. Prod. Res.* – 1980. – Vol. 1. – P. 111–119.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Елена Олеговна Колесникова – кандидат биологических наук, научный сотрудник, зав. лабораторией культуры тканей ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: kolelkb@mail.ru.

Татьяна Петровна Жужжалова – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, зав. отделом биотехнологии и генетики ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Никита Александрович Карпеченко – кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела генетики и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Наталья Дмитриевна Верзилина – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры биологии и защиты растений ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, E-mail: botanika@agronomy.vsau.ru.

Елена Николаевна Васильченко – старший научный сотрудник лаборатории культуры тканей ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Валентина Васильевна Знаменская – доктор сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культуры тканей ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Дата поступления в редакцию 30.11.2017

Дата принятия к печати 19.12.2017

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Elena O. Kolesnikova – Candidate of Biological Sciences, Research Scientist, Head of the Tissue Culture Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, E-mail: kolelkb@mail.ru.

Tatyana P. Zhuzhhalova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Research Scientist, Head of the Dept. of Biotechnology and Genetics, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Nikita A. Karpechenko – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Scientist, Tissue Culture Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Natalia D. Verzilina – Doctor of Agricultural Sciences, Professor, the Dept. of Biology and Plant Protection, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, E-mail: botanika@agronomy.vsau.ru.

Elena N. Vasilchenko – Senior Research Scientist, Tissue Culture Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Valentina V. Znamenskaya – Doctor of Agricultural Sciences, Leading Research Scientist, Tissue Culture Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, E-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Date of receipt 30.11.2017

Date of admittance 19.12.2017