

УДК 581.4: 582.632.2(477.75)

RAPD-PCR ФРАКЦИИ ДНК КАК МАРКЕРЫ ЖЕСТКОСТИ И ОПУШЕННОСТИ ЛИСТЬЕВ ДУБА ПУШИСТОГО И СКАЛЬНОГО

Ивашов А.В., Симчук А.П., Оберемок В.В.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Республика
Крым, Российская Федерация
E-mail: aivashov@mail.ru*

С использованием метода RAPD-маркеров показано, что индивидуальные спектры амплифицированных фрагментов ДНК из дубов пушистого и скального содержат от четырех до десяти RAPD-маркеров. Наличие фракции ДНК длиной 400 пар нуклеотидов маркирует более высокий уровень опушенности и жесткости листьев дуба пушистого.

Ключевые слова: дуб пушистый, скальный, жесткость и опушенность листьев, RAPD-PCR, полиморфизм.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на бурное развитие современных методов анализа ДНК, использование RAPD-PCR (случайно амплифицируемая полиморфная ДНК) по-прежнему остается приемлемым методом в популяционных исследованиях самых разных видов. Хотя он и не дает информации о структуре и функциональной роли того или иного гена, зато позволяет исследовать генетическую изменчивость в случайно выбранном наборе участков генома [1]. Ранее маркирующие свойства фрагментов ДНК с использованием праймер ОРА-14 были обнаружены при оценке индивидуальных различий в накоплении микроэлементов в листьях дуба [2]. Для решения экологических задач связанных с поиском факторов устойчивости лесных насаждений к повреждению листогрызущими насекомыми такой поиск может быть перспективным на начальных этапах генетических исследований в экосистемах. Хорошо известно, что жесткость листьев дуба и их опушенность являются важными свойствами, которые в определенной мере определяют их доступность для листогрызущих насекомых. Так, ранее нами было установлено, что экологические ниши, занимаемые различными видами фитофагов, дифференцированы в зависимости от жесткости листа и рН [3–5]. В частности для зеленой дубовой листовертки было показано, что адаптация ее разных генотипических классов к листьям разной жесткости напрямую связана с выживанием и определяет поддержание оптимальной численности популяции [6]. Априори очевидно, что эти свойства кормовой листвы как фенотипические признаки определяются условиями среды, и генами растений. В этой связи в данной работе сделана попытка подобрать

случайно амплифицированные праймеры, пригодные для маркирования опушенности и жесткости листьев у дубов скального и пушистого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований служили 8 модельных деревьев дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.), произрастающих на площадке «Дубки», два дерева дуба скального (*Q. petraea* Matuschka/Liebl.), произрастающие на площадке «Лавровое» Листья, собранные авторами с крымских дубов были также доставлены в лабораторию. Из массы свежих листьев, собранных с каждого дерева отбирали пробы для исследования генетического полиморфизма по RAPD-PCR.

Образцы ДНК выделяли, используя 0,5 см² свежего листа дуба. Экстракцию тотальной ДНК проводили согласно стандартной методике. Для исследования полиморфизма методом RAPD-PCR использовали праймер OPA-14 – TCTGTGCTGG (Operon Technologies, USA).

RAPD-PCR проводили в реакционной смеси, объемом 25 мкл на термоциклере «Герцик» (ДНК-Технология, Россия) с использованием реактивов для полимеразной цепной реакции GenePak™ PCR Universal (ИзоГен, Москва). Амплификацию проводили в режиме: 1 цикл денатурации 95⁰ С в течение 5 мин и последующие 45 циклов по схеме: 95⁰ С – 1 мин, 36⁰ С – 1 мин, 72⁰ С – 2 мин. Терминальную стадию синтеза проводили при 72⁰ С – 10 мин.

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,8 %-ном агарозном геле и после окрашивания бромистым этидием анализировали под ультрафиолетом. В качестве маркера использовали DNA-markers M 100 (ИзоГен, Москва) с длиной фрагментов 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 и 1000 пар нуклеотидов.

Жесткость листьев дубов пушистых определяли с использованием методики, предложенной П. Фини [7]. Степень опушенности листьев исследовали под бинокулярным микроскопом МБС-9. Для математической обработки полученных результатов применяли стандартные статистические процедуры с использованием возможностей программы MSExcel-XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование методики выявления случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD) с применением стандартного праймера OPA-14 позволило получить в совокупности 11 RAPD-маркеров (рис.). Набор полученных маркеров достаточно хорошо отражает специфику каждого дерева дуба. В то же время, не было получено удовлетворительной картины полиморфизма и при использовании праймеров OPA-1 и OPA-8.

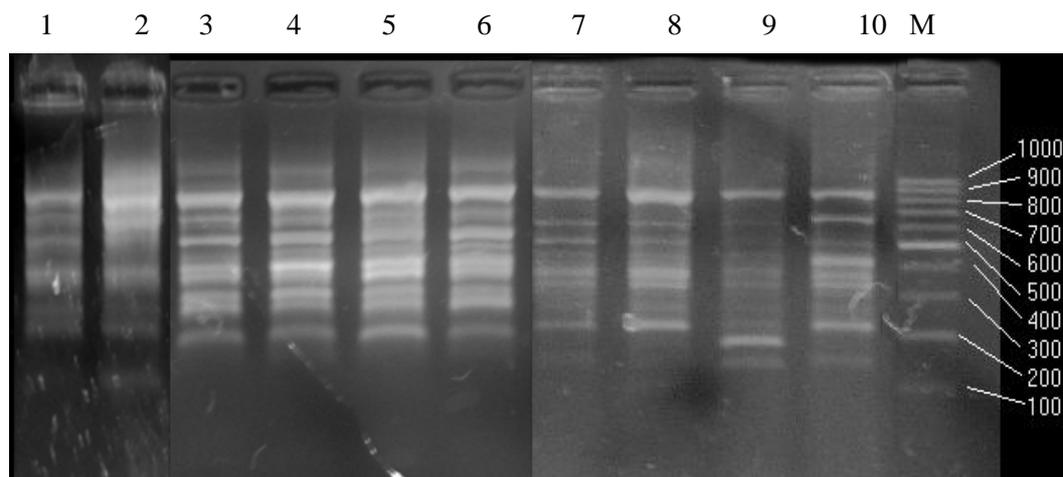


Рис. Индивидуальные электрофоретические спектры амплифицированных фрагментов ДНК деревьев дуба пушистого (1-8) и скального (9, 10) с праймером ОРА-14: М – маркеры молекулярных масс от 100 до 1000 п.н.

В целом, как видно на рисунке, анализируемые модельные деревья проявляют существенный генетический полиморфизм по набору полученных RAPD-маркеров. При этом индивидуальные спектры амплифицированных фрагментов ДНК содержали от четырех до десяти RAPD-маркеров.

Таким образом, использование методики полимеразной цепной реакции позволяет исследовать генетический полиморфизм дубов пушистого и скального. Наиболее информативным оказался праймер ОРА-14, применение которого позволило получить четкую воспроизводимую картину полиморфизма дубов по ДНК фрагментам.

Применение методики полимеразной цепной реакции с праймером ОРА-14 позволило охарактеризовать каждое из исследованных деревьев дуба по спектру случайно амплифицированных фрагментов ДНК. В то же время, для каждого дуба из популяции «Дубки» имеются данные по таким морфологическим признакам листьев, как жесткость их тканей и опушенность листовой пластинки. Это позволяет провести анализ наличия связей между данными морфологическими признаками и наличием или отсутствием той или иной фракции ДНК в RAPD-PCR спектре.

Только ДНК фракция длиной около 400 п.н. (№4) проявила связь с жесткостью и опушенностью листа (табл.). У модельных деревьев 3, 4 и 6, имеющих в RAPD-PCR спектрах эту фракцию ДНК и жесткость, и пушистость листьев оказалась в среднем выше, чем у деревьев 1, 2 и 5, в спектрах которых данная фракция отсутствует.

Таблица

Жесткость и опушенность листьев дуба пушистого, различающихся по наличию или отсутствию фракции ДНК длиной 400 пар нуклеотидов

Параметр	Жесткость листа (усл. ед)	Опушенность листа (волосков на 1мм ²)
	Отсутствие фракции ДНК длиной 400 п.н.	
Среднее	4,73	33,50
Стандартная ошибка	0,05	2,42
Дисперсия выборки	0,22	628,03
Счет	110	107
	Наличие фракции ДНК длиной 400 п.н.	
Среднее	5,06	52,46
Стандартная ошибка	0,05	3,31
Дисперсия выборки	0,21	778,77
Счет	73	71
t-статистика	4,75	4,72
P	0,000004	0,000005

Вероятно, участок ДНК дуба, который проявляется как фракция длиной 400 п.н. несет в себе гены, влияющие на проявление таких морфологических признаков дуба, как жесткость его тканей и опушенность листовой пластинки. Эти признаки листа дуба в определенной степени характеризуют пищевую ценность и доступность листы дерева для насекомых-вредителей. В связи с этим, ДНК фракция длиной 400 п.н. может оказаться перспективной в отношении поиска генетических маркеров дуба, определяющих или влияющих на его устойчивость к вредителям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У дубов пушистого и скального по набору RAPD-маркеров обнаружен генетический полиморфизм. При этом индивидуальные спектры амплифицированных фрагментов ДНК содержали от четырех до десяти RAPD-маркеров.
2. Жесткость и опушенность листьев у дубов пушистых с наличием или отсутствием фракции ДНК длиной 400 пар нуклеотидов достоверно различается. Причем наличие этой фракции маркирует более высокий уровень опушенности и жесткости, что создает предпосылки использования этого молекулярного маркера для отбора плюсовых деревьев, устойчивых к повреждению листогрызущими насекомыми.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Совета министров Республики Крым в рамках инициативного научного проекта 14-44-01591 «р_юг_а»

Список литературы

1. Sambrook J. Molecular Cloning: Laboratory Manual. / Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. – New York: Cold Spring Harbour Univ. Press, 1989. – 1626 p.
2. Пелецкая И.Г. Содержание тяжелых металлов на различных фенологических этапах развития листьев дуба пушистого / И.Г. Пелецкая, Г.Е. Бойко // Экосистемы Крыма их оптимизация и охрана. – Симферополь, 2002. – С. 94-98.
3. Simchuk A.P. Single oak tree as a heterogeneous resource for herbivores: inter-species differentiation of trophic niches / A.P. Simchuk, A.V. Ivashov // Экология та ноосферологія. – 2005. –Т. 16, № 1-2. – С.54–60.
4. Симчук А.П. Эколого-генетические аспекты дифференциации трофических предпочтений некоторых насекомых-филлофагов в микросообществах дуба / А.П. Симчук, А.В. Ивашов // Журнал общей биологии. –2005. –Т. 66, № 6. – С. 191-199.
5. Simchuk A.P. Genetics of Interactions among Moths, Their Host Plants and Enemies in Crimean Oak Forests, and Its Perspective for Their Control / A.P. Simchuk, V.V. Oberemok, A.V. Ivashov // Chapter 7 In: Moths: Types, Ecological significance and Control ; ed. Luis Cauteruccio. – New York : Nova Science Publishers, 2012. – P. 187-205.
6. Simchuk A.P. Genetic patterns as possible factors causing population cycles in oak leafroller moth *Tortrix viridana* L. / A.P. Simchuk, A.V. Ivashov, V.A. Companytsev // Forest Ecology & Management /– 1999. –V. 113. P. 35-49.
7. Feeny P. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars / P. Feeny // Ecology, 1970. – Vol. 51. – P. 565-581.

RAPD-PCR DNA FRACTIONS AS THE MARKERS FOR LEAF STIFFNESS AND PUBESCENCE IN SESSILE AND PUBESCENT OAKS

Ivashov A.V., Simchuk A.P., Oberemok V.V.

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea Republic, Russia
E-mail: aivashov@mail.ru*

Application of the RAPD-marker method with the OPA-14 primer for the analysis of genetic polymorphism in the pubescent and sessile oaks has shown that the individual spectra of amplified DNA fragments contain from four to ten RAPD-markers. At the same time use of OPA-1 and OPA-8 primers has shown no distinct polymorphism of amplified DNA fragments.

Leaf stiffness and pubescence associated in oaks with the presence or absence of DNA fraction of 400 bp in lengths. Moreover, the presence of this fraction marks a higher levels of pubescence and stiffness. Probably the region of the oak DNA, which manifests itself as a fraction of 400 bp in length, carries the genes that influence the expression of such the oak morphological traits as stiffness of its leaf tissues and pubescence of its leaf blade.

These characteristics of the oak leaf to a certain extent characterize its nutritional value and availability for foliage tree pests. In this regard, the DNA fraction of 400 bp in length (OPA-14 primer) may be promising in respect to finding of such the oak genetic markers, which should influence its resistance to pests. Thus, selection of “plus” trees that are resistant to damage the leaf-eating insects may be done among others in accordance to their molecular markers.

Keywords: pubescent oak, sessile oak, leaf stiffness, leaf pubescence, RAPD-PCR, polymorphism.

References

1. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: Laboratory Manual.* – New York: Cold Spring Harbour Univ. Press, 1626 p. (1989)
2. Peletskaya I.G., Boyko G.E. Heavy metal content at different phenological stages of leaf development in pubescent oak. *Crimean Ecosystems, their optimization and defense.* Simferopol, 94-98. (2002)
3. Simchuk A.P., Ivashov A.V. Single oak tree as a heterogeneous resource for herbivores: inter-species differentiation of trophic niches, **16**, № 1-2., 54–60. (2005)
4. Simchuk A.P., Ivashov A.V. Ecological-genetic aspects of differentiation of trophic preferences of some herbivores in oak micro-communities. *Journal of General Biology*, **66**, № 6, 191–199. (2005)
5. Simchuk A.P., Oberemok V.V., Ivashov A.V. Genetics of Interactions among Moths, Their Host Plants and Enemies in Crimean Oak Forests, and Its Perspective for Their Control // Chapter 7 In: *Moths: Types, Ecological significance and Control* ; ed. Luis Cauteruccio. – New York : Nova Science Publishers, 187-205. (2012)
6. Simchuk A.P., Ivashov A.V., Companiytsev V.A. Genetic patterns as possible factors causing population cycles in oak leafroller moth *Tortrix viridana* L. *Forest Ecology & Management*. **113**, 35-49. (1999)
7. Feeny, P. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, **51**, 565-581. (1970)

Поступила в редакцию 15.11.2014 г.