

# Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров

Б.Р. Кулуев<sup>1</sup>✉, А.В. Фатерыга<sup>2</sup>, А.Р. Кулуев<sup>1</sup>, Е.В. Михайлова<sup>1</sup>, А.В. Чемерис<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, Феодосия, Россия

Одуванчик осенний (*Taraxacum hybernum* Steven) – растение-каучуконос, одно из альтернативных гевее бразильской растений. В России произрастает только на Крымском полуострове, поэтому его часто называют крым-сагыз. Несмотря на свою потенциальную хозяйственную ценность, генетическая структура крымской популяции одуванчика осеннего на сегодняшний день остается неизученной. В связи с этим целью нашей работы была сравнительная молекулярно-генетическая характеристика одуванчика осеннего из различных местообитаний Крымского полуострова при использовании SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров. В результате проведенной работы из десяти географических точек Крымского полуострова были собраны семянки, листья и корни одуванчика осеннего. В целом одуванчик осенний обнаружен нами в пределах западной части Южного берега Крыма и западной части Крымских Предгорий – двух основных регионов его произрастания на полуострове. Из сухих листьев анализируемых растений при помощи цетилтриметиламмоний бромидом была выделена тотальная ДНК. Впервые на одуванчике осеннем были испытаны 12 SSR- и по три RAPD- и ISSR-маркера. Полиморфизм RAPD- и ISSR-фрагментов определяли аналитическим электрофорезом в 1.7 % агарозном геле. Для сравнительного анализа длин SSR-фрагментов использовали гель-электрофорез в 8 % полиакриламидном геле. В результате проведенной работы была показана гомогенность крымской популяции одуванчика осеннего, что может быть связано с небольшой областью распространения и апомиктичным способом размножения этого вида. Однако известные по литературным данным фенотипические различия внутри крымской популяции говорят о необходимости продолжения исследований полиморфизма ДНК одуванчика осеннего, в том числе с использованием высокоразрешающих методов анализа.

Ключевые слова: *Taraxacum hybernum*; *Taraxacum kok-saghyz*; одуванчик осенний; крым-сагыз; кок-сагыз; SSR; RAPD; ISSR.

## The molecular genetic study of krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) using SSR, RAPD and ISSR markers

B.R. Kuluev<sup>1</sup>✉, A.V. Fateryga<sup>2</sup>, A.R. Kuluev<sup>1</sup>, E.V. Mikhaylova<sup>1</sup>, A.V. Chemeris<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, Ufa, Russia

<sup>2</sup> T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS, Feodosiya, Russia

Krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) is an alternative to *Hevea brasiliensis* as a source of natural rubber. In Russia, krim-saghyz is common only in the Crimean Peninsula and is traditionally named after it. In spite of its potential for economical use, the genetic structure of the Crimean population of this plant is still unexplored. In this regard, the purpose of our work was a comparative molecular-genetic characterization of *T. hybernum* from various habitats of the Crimean Peninsula using SSR, RAPD and ISSR markers. According to the plan, we collected achenes, leaves and roots of krim-saghyz in 10 spots all over the Crimean Peninsula. We found the plants in the western part of the southern Crimean coast and the western part of the Crimean foothills, which are two general regions of the area of this species. Total DNA was extracted from dry leaves of krim-saghyz with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). For the first time 12 SSR, 3 RAPD and 3 ISSR markers were tested on krim-saghyz. To observe polymorphism of RAPD- and ISSR-fragments, we used analytical electrophoresis in 1.7 % agarose gel. To compare the length of SSR amplicons, we used gel-electrophoresis in 8 % polyacrylamide gel. We found that the Crimean population of krim-saghyz appears to be genetically homogeneous. This could be due to a small geographic range and apomictic reproduction of this species. However, the phenotypical diversity within the population of *T. hybernum* is well known from the literature. Consequently, the study of the DNA polymorphism of this species should be continued, in particular, with the help of high-resolution techniques.

Key words: *Taraxacum hybernum*; *Taraxacum kok-saghyz*; krim-saghyz; kok-saghyz; SSR; RAPD; ISSR.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кулуев Б.Р., Фатерыга А.В., Кулуев А.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):102-107. DOI 10.18699/VJ18.337

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kuluev B.R., Fateryga A.V., Kuluev A.R., Mikhaylova E.V., Chemeris A.V. The molecular genetic study of krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) using SSR, RAPD and ISSR markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):102-107. DOI 10.18699/VJ18.337 (in Russian)

В связи с нарастающим мировым спросом на натуральный каучук и уязвимостью его основного источника – тропического дерева гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.) становится актуальным поиск растений-каучуконосов, относящихся к другим видам. В нашей стране впервые важность этого вопроса была осознана на государственном уровне еще в 20-е годы прошлого века. В 1929–1932 гг. были организованы специальные экспедиции с целью отбора среди растений флоры СССР каучуконосных видов, пригодных для хозяйственного использования. В ходе поисковых экспедиций пересмотрено и оценено по содержанию каучука более тысячи видов растений и среди них обнаружено множество каучуконосов, из которых наиболее перспективными признаны кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* E.L. Rodin), тау-сагыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. & G.G. Bosse) и одуванчик осенний (*Taraxacum hybernum* Steven) (Ильин, Якимов, 1950), известный также под названием крым-сагыз (Аксельрод, 1944). В советское время были разработаны основные агротехнические приемы возделывания кок-сагыза и промышленного производства из его корней натурального каучука, тогда как тау-сагыз и одуванчик осенний оказались задействованы в меньшей степени. В нашей стране последний произрастает только по южному побережью Крыма и в западной части Крымских предгорий (по данным сайта Плантариум), однако этот же вид одуванчиков распространен в Болгарии и Турции (Kirschner et al., 2017). Одуванчик осенний как отдельный вид был выделен российским ботаником шведского происхождения Х.Х. Стевенем в 1856 г., а его каучуконосность открыта советскими ботаниками в 1931 г., причем показано, что качество каучука у него лучше, чем у кок-сагыза (Бондаренко, 1941).

Несмотря на свою потенциальную хозяйственную ценность, одуванчик осенний остается весьма малоизученным видом как в нашей стране, так и за рубежом. Более того, сейчас это растение почти забыто, по крайней мере последние 50 лет в литературе оно упоминается лишь вскользь, а каких-либо серьезных исследований вида не проводилось уже более 70 лет (Ильин, Якимов, 1950). В то же время в мире наблюдается большой рост исследований кок-сагыза, связанных в том числе с изучением генетической гетерогенности его отдельных популяций (McAssey et al., 2016). Данное направление исследований совместно с изучением каучуконосности имеет важное значение для отбора лучших генотипов из природы и дальнейшей их селекции с целью получения новых высокопродуктивных сортов кок-сагыза. Поскольку для одуванчика осеннего подобные исследования никогда не проводились, представляет большой интерес генетический анализ его крымской популяции для оценки генетической гетерогенности и разграничения возможных отдельных популяций.

На сегодняшний день геном одуванчика осеннего не секвенирован, поэтому для выявления полиморфизма его ДНК прежде всего могут применяться методы, основанные на ПЦР для одновременного выявления мультилокусного полиморфизма ДНК, не требующие изначального знания нуклеотидных последовательностей всего генома или его частей. Из этих методов наиболее известен и широко распространен RAPD-анализ (от Random Amplified

Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990). Отрицательной чертой метода RAPD является относительно плохая воспроизводимость, что может быть связано, в частности, с низкой температурой отжига RAPD-праймеров. В другом методе выявления полиморфизма ДНК, также основанном на ПЦР, который называется ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), используются относительно высокие температуры отжига (около 52 °С), что существенно увеличивает воспроизводимость анализа. ISSR-анализ тоже базируется на использовании в ПЦР только одного праймера, представляющего собой тандемный повтор 2–6 нуклеотидов микросателлитов и 2–4 специфических вырожденных нуклеотидов (Zietkiewicz et al., 1994).

В настоящее время одуванчик осенний нигде в мире не культивируется, его семена можно собрать только в природных популяциях. В связи с этим представляет большой интерес поиск и сбор его семян в естественных местообитаниях Крымского полуострова и оценка ареала данного вида. Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы была сравнительная молекулярно-генетическая характеристика одуванчика осеннего из различных местообитаний Крымского полуострова. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: сбор растительного материала одуванчика осеннего из десяти пунктов естественного местообитания; выделение из них тотальной ДНК различными методами; испытание ряда RAPD- и ISSR-праймеров для определения мультилокусного полиморфизма ДНК крымской популяции одуванчика осеннего. Планировалось также провести SSR-анализ (Simple Sequence Repeat), поскольку ранее была показана возможность применения этого метода для оценки генетического разнообразия популяций кок-сагыза (McAssey et al., 2016).

## Материалы и методы

Поиск растений одуванчика осеннего проводили в Крыму в конце октября 2016 г. Состояние популяции вида за последние 70 лет оставалось неисследованным, поэтому представляли большой интерес поиск и сбор семян по всей области его распространения в Крыму. В целом одуванчик осенний обнаружен нами в пределах западной части Южного берега Крыма и западной части Крымских предгорий – двух основных регионов его произрастания на полуострове. Семянки одуванчика осеннего были собраны из десяти разных пунктов (табл. 1, рис. 1), в каждом пункте для этого использовано по пять разных растений. Собирали также корни и листья одуванчиков. Через два месяца после сбора материала проводили опыты по проращиванию семян и получению проростков. Морфологических различий между одуванчиками осенними из разных местообитаний не выявлено.

Тотальную ДНК из молодых проростков одуванчика осеннего выделяли методом солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997). При этом для каждого местообитания выборка растений составила 3 ( $n = 3$ ). Из сухих листьев, собранных из естественных местообитаний, ДНК выделяли с использованием цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ) (Rogers, Bendich, 1985). Выборка образцов ДНК составила 3. Качество выделенной тотальной ДНК определяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Для SSR-анализа использовали праймеры для амплификации

**Таблица 1.** Пункты сбора семян, листьев и корневищ одуванчика осеннего

Номер пункта сбора	Географическое расположение	Фитоценоз	Геогр. координаты (с.ш., в.д.), высота над ур. моря
1	Севастополь, восточная окраина, с. Верхнесадовое, обочина шоссе	Газон	44.688806, 33.693270, 83 м
2	Севастополь, Северная сторона, отвалы рва Первой обороны Севастополя	Среди рудеральной растительности	44.632801, 33.536325, 53 м
3	Севастополь, г. Инкерман, правый берег р. Черная	Степной склон	44.607195, 33.606330, 13 м
4	Севастополь, правый берег бухты Казачьей	Ковыльная степь	44.570643, 33.415666, 10 м
5	Севастополь, Варнаутская долина, обочина дороги от Ялтинского шоссе к с. Резервное	Остепненный склон среди дубового леса	44.479177, 33.692432, 244 м
6	Севастополь, Байдарская долина, обочина дороги от с. Орлиное к пер. Байдарские ворота	Лугово-степной склон на опушке дубового леса	44.430331, 33.790343, 354 м
7	Городской округ Ялта, северная окраина пгт Качивели, обочина шоссе	Под кипарисами	44.401846, 33.968530, 203 м
8	Городской округ Ялта, восточная окраина пгт Гурзуф, подножие горы Аю-Даг	Опушка дубового леса	44.566569, 34.319395, 224 м
9	Городской округ Ялта, северо-восточная окраина пгт Никита, обочина шоссе	Под кипарисами	44.517823, 34.245204, 258 м
10	Городской округ Ялта, южный склон Поликуровского холма, обочина шоссе	»	44.500394, 34.184486, 39 м



**Рис. 1.** Пункты сбора семян одуванчика осеннего на карте Крыма. Карта подготовлена при помощи ресурса OpenStreetMap (<http://www.openstreetmap.org/>).

12 различных локусов, обозначенных TKS\_003–TKS\_0177 (табл. 2). RAPD-анализ проводили с применением универсальных праймеров AFK1, AFK3 и LMBD (табл. 3) (Baumiev et al., 2011), которые были синтезированы в ООО «Евроген» (Россия). В работе были использованы три ISSR-праймера, синтезированные ООО «Биоскрин» (Россия), последовательности которых приведены в табл. 3 (Ефимов, 2012; Костюкова и др., 2013). Во всех экспериментах в качестве контроля использовали тотальную ДНК кок-сагыза, выделенную из сухих листьев СТАВ-методом. Зрелые семянки кок-сагыза были получены из коллекции Ботанического сада Университета г. Бонн (Германия) и затем выращены на опытном участке Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.

Реакционная смесь для SSR-, RAPD- и ISSR-анализов объемом 30 мкл содержала следующие компоненты: 1 ед.

Тaq-полимеразы («Евроген», Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Тaq-полимеразы, MgCl<sub>2</sub> (2.5 мМ для SSR, 5 мМ для RAPD и ISSR), 0.25 мМ каждого dNTP, 90 пМ праймера из пары (в случае SSR-анализа), 0.2–0.5 мкг тотальной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл минерального масла и оставляли для проведения реакции в амплификаторе производства компании «ДНК-технология» (Россия) с использованием следующих протоколов. SSR-анализ: начальная денатурация – 3 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С – 40 с, отжиг праймеров при температурах 50–55 °С (табл. 4) – 40 с, элонгация при 72 °С – 40 с; финальная элонгация при 72 °С – 5 мин. RAPD-анализ: начальная денатурация – 3 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С – 50 с, температура отжига 30 °С – 50 с и элонгация при 72 °С – 1 мин 40 с; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °С. ISSR-анализ: начальная денатурация – 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С – 50 с, температура отжига 52 °С – 50 с и элонгация при 72 °С – 1 мин 40 с; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °С (Костюкова и др., 2013).

Полиморфизм RAPD- и ISSR-фрагментов определяли аналитическим электрофорезом в 1.7 % агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали 1 kb DNA Ladder и 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия). Для сравнительного анализа размеров SSR-маркеров использовали гель-электрофорез в 8 % полиакриламидном геле. Все гели фотографировали с помощью фотодокументационной системы Gel Camera System (UVP Inc., США). Длину ДНК-фрагментов оценивали при помощи программы для документирования и анализа изображений Labworks (версия 4.0).

**Таблица 2.** Список SSR-праймеров (McAssey et al., 2016)

Локус	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')
TKS_003	TCACCGAGTTGTAGAGAGAGA	CAGCAATTAAGGCTCTGTAAA
TKS_0025	GCTCTCATAATAAGAACCCAGA	ATACCGTGGTGAGCATAAATA
TKS_0085	AGTTTCTCTAGAGCTCGATCC	TGTAAGAATCAAACGAATGG
TKS_0091	GCAAGTTTGCACCAGTTT	GTTATTTGTTAACCCATTCCA
TKS_0097	AAGATGTAATGCTTGGAAAGA	AACACAAGCCAAACAAATAAC
TKS_0105	ACCTTGAGACGAAAGTAAAT	CAACTTAACAGAGCGACAC
TKS_0107	GAACCGTGATACAAGCATAAA	CATCTCCATTGTTGTCCATAC
TKS_0110	GGCTGATCAAGAGTACTGTCC	TTATATGGGAATATACCGGAAG
TKS_0111	ATCTACAACAAGTTCGTGAGG	AATCAACTGGATTTCTTAGGG
TKS_0112	ACAGGAGTTGATGTCTTGATG	ATTGAATCATTAACCGTCAGA
TKS_0113	CCAAGACCTCTACAATCGTTA	ATCTTCGGAGTAGTGGATTGA
TKS_0177	CCGATAACCGTAGTCAGATAA	CTTCTTCTCGTCTCTTCAT

## Результаты

В результате проведенного агарозного гель-электрофореза из проростков одуванчика осеннего методом солевой экстракции и из сухих листьев СТАВ-методом выделена высокомолекулярная и нефрагментированная ДНК, пригодная для SSR-анализа. Однако тотальная ДНК, выделенная методом солевой экстракции, оказалась малоприспособной для RAPD- и ISSR-анализов, так как при использовании этой ДНК в каждом случае амплифицировалось не более трех ее фрагментов. Возможно, это связано с повышенным содержанием солей в препаратах ДНК, полученных методом солевой экстракции. Поэтому в дальнейшей работе была использована только ДНК, экстрагированная СТАВ-методом.

Для работы по SSR-анализу были отобраны пары праймеров, которые ранее показали свою эффективность при анализе не только кок-сагыза, но и одуванчика лекарственного (*Taraxacum sect. Taraxacum* F.H. Wigg.) (McAssey et al., 2016). В результате проведенного SSR-анализа доказано, что все использованные 12 пар SSR-праймеров подходят для амплификации соответствующих локусов как кок-сагыза, так и одуванчика осеннего. При электрофорезе в полиакриламидном геле четких различий в размерах SSR-маркеров между одуванчиком осенним из разных местообитаний обнаружить не удалось. В то же время во многих случаях выявлялась существенная разница в размерах анализируемых SSR-локусов данного вида с кок-сагызом (рис. 2). Приблизительные размеры полученных в ходе работы SSR-ампликонов одуванчика осеннего и оптимальные температуры отжига праймеров представлены в табл. 4.

При RAPD-анализе с праймером AFK1 в серии экспериментов выявлялось не менее пяти четко различимых ампликонов, которые по размеру были схожи во всей анализируемой группе одуванчика осеннего (рис. 3, а). У кок-сагыза при этом амплифицировались тоже пять ампликонов, но все они по размеру отличались от AFK1-фрагментов одуванчика осеннего. RAPD-анализ с праймером AFK3 тотальной ДНК одуванчика осеннего приводил к амплификации семи локусов разного размера (см. рис. 3, б). При этом среди образцов из десяти разных

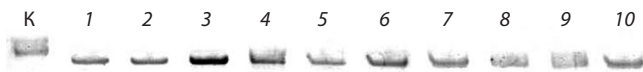
**Таблица 3.** Список использованных RAPD- и ISSR-праймеров

Праймер	Последовательность 5'–3'
AFK1	ACGGTGGACG
AFK3	GCGTCCATTC
LMBD	GGGCGCTG
IS1	AGAGAGAGAGAGAGAGYG
IS3	GAGAGAGAGAGAGAGAC
DAC1	CACACACACAT

**Таблица 4.** Длина амплифицированных фрагментов ДНК при SSR-анализе одуванчика осеннего в 8 % ПААГ и оптимальные температуры отжига праймеров TKS

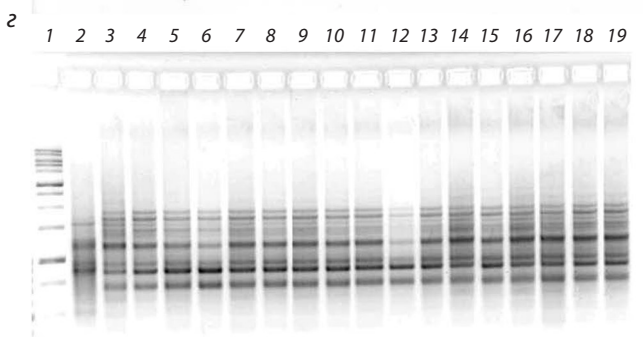
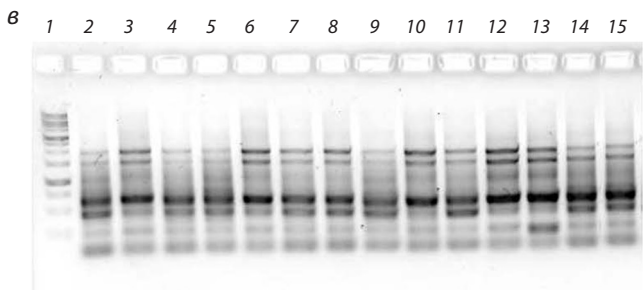
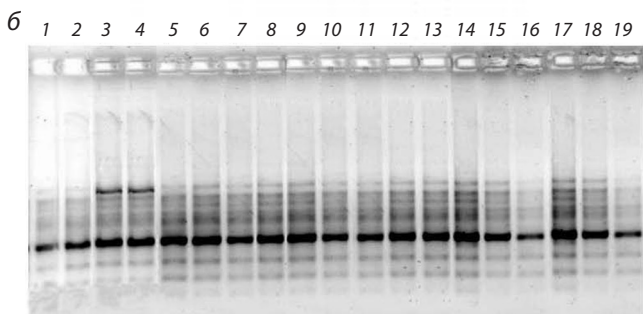
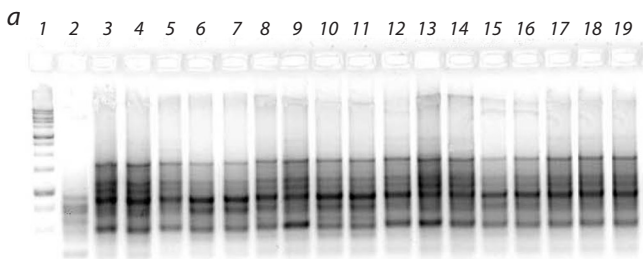
Локус	Размер ампликона, п. н.	Оптимальная температура отжига, °C
TKS_003	200	55
TKS_0025	280	55
TKS_0085	160	55
TKS_0091	170	55
TKS_0097	160	50
TKS_0105	170	50
TKS_0107	250	55
TKS_0110	170	50
TKS_0111	180	50
TKS_0112	150	55
TKS_0113	150	55
TKS_0177	200	55

местообитаний не удалось выявить ни одного полиморфного локуса. В случае использования праймера LMBD амплифицировалось пять фрагментов ДНК, и также среди всей анализируемой группы крымской популяции одуванчика осеннего полиморфные локусы не обнаруживались. При сравнении одуванчика осеннего с кок-сагызом такие полиморфные локусы выявлялись при использовании всех



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле ампликонов кок-сагыза (К) и одуванчика осеннего из десяти местообитаний (1–10) после SSR-ПЦР локуса TKS\_0091.

Размер ампликона кок-сагыза соответствует 180 п. н.



**Рис. 3.** Результаты RAPD- (а, б) и ISSR-анализов (в, г).

а – RAPD-анализ с праймером AFK1 (1 – маркер молекулярного веса 1 kb, 2 – кок-сагыз, 3–19 – одуванчик осенний из десяти различных местообитаний); б – RAPD-анализ с праймером AFK3 (1–19 – одуванчик осенний из десяти различных местообитаний); в – ISSR-анализ с праймером DAC1 (1 – маркер молекулярного веса 1 kb, 2–15 – одуванчик осенний из десяти различных местообитаний); г – ISSR-анализ с праймером IS3 (1 – маркер молекулярного веса 1 kb, 2 – кок-сагыз, 3–19 – одуванчик осенний из десяти различных местообитаний). Размеры фрагментов 1 kb маркера снизу вверх: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п. н.

трех RAPD-праймеров: обнаруживались совпадающие между двумя видами одуванчиков ампликоны, однако их никогда не было больше двух в одном RAPD-анализе.

При ISSR-анализе одуванчика осеннего во всех экспериментах выявлялись четко различимые ампликоны: шесть – в случае с праймером IS1, семь – IS3, шесть – DAC1 (см. рис. 3, в, г). В то же время при использовании этих трех ISSR-праймеров не было выявлено ни одного полиморфного локуса, который позволил бы оценить возможную генетическую гетерогенность крымской популяции исследуемого вида. При ISSR-анализе кок-сагыза выявлялось примерно столько же отдельных ампликонов, однако многие из них отличались по размеру от аналогичных ISSR-фрагментов одуванчика осеннего, хотя общие для этих двух видов одуванчика фрагменты также амплифицировались (см. рис. 3, г).

### Обсуждение

Впервые после почти 70-летнего перерыва в изучении отечественных каучуконосов нами проведен поиск растений одуванчика осеннего на территории Крымского полуострова. Показано, что крымская популяция данного вида произрастает на сравнительно небольшом участке и поэтому может считаться уязвимой. С целью дальнейшего изучения генетической гетерогенности популяции одуванчика осеннего были собраны его семена, листья и корни из десяти разных географических точек (см. рис. 1), различающихся особенностями биотопов и высотой над уровнем моря (см. табл. 1).

В ходе дальнейшей работы была создана коллекция тотальной ДНК одуванчика осеннего из сухих листьев и молодых проростков. Установлено, что для выделения качественной тотальной ДНК из образцов исследуемого вида больше всего подходит СТАВ-метод, причем листья до процедуры выделения должны быть высушены.

Показано, что все 12 использованных в ходе работы праймеров TKS могут быть применены для SSR-анализа не только кок-сагыза и одуванчика лекарственного (McAssey et al., 2016), но и одуванчика осеннего. При этом методом SSR-анализа нам не удалось выявить генетический полиморфизм внутри крымской популяции одуванчика осеннего. Необходимо отметить, что в оригинальной работе (McAssey et al., 2016) для сравнения размеров SSR-маркеров разных популяций кок-сагыза проводился капиллярный электрофорез в автоматическом секвенаторе, который позволяет детектировать минимальные изменения в размере ампликонов. Проведенный нами для разделения SSR-ампликонов электрофорез в небольшом полиакриламидном геле, к сожалению, не позволял увидеть изменения в размерах фрагментов ДНК менее 10 п. н. Поэтому в дальнейшем представляет определенный интерес использование высоко разрешающих методов анализа длины фрагментов ДНК, полученных с помощью SSR-маркеров.

Впервые для генетического анализа одуванчиков нами были применены RAPD-праймеры AFK1, AFK3 и LMBD, которые ранее использовались при исследовании микроорганизмов (Baumiev et al., 2011). Показана высокая эффективность данных праймеров для изучения одуванчиков осеннего и кок-сагыза. Также впервые на одуванчиках

были испытаны ISSR-праймеры IS1, IS3 и DAC1, которые ранее показали свою эффективность при генетическом анализе однодольных растений семейства орхидных (Ефимов, 2012; Костюкова и др., 2013). Количество и качество выявляемых ISSR-маркеров при этом было достаточным, по крайней мере для четкого разделения двух видов рода. Несмотря на относительно большое количество амплифицируемых при RAPD- и ISSR-анализах фрагментов ДНК, нам не удалось выявить ни одного полиморфного локуса, позволяющего говорить о генетической гетерогенности крымской популяции одуванчика осеннего. Исходя из этих данных следует, что работы по поиску эффективных праймеров для генетического анализа популяций данного вида методами RAPD и ISSR должны быть продолжены.

Таким образом, растущий в Крыму одуванчик осенний, вероятнее всего, представлен одним видом растений (*T. hybernum*) и, возможно, одной относительно гомогенной популяцией. Можно предполагать, что это связано с относительно небольшой областью распространения этого вида на Крымском полуострове, а также с тем, что он размножается в основном апомиктично, образуя семена без оплодотворения. Стерильность пыльцы одуванчика осеннего при этом достигает 95 %. Поэтому возможности образования гибридных форм данного вида в результате перекрестного опыления и последующего расщепления очень ограничены (Филиппов и др., 1948). Среди исследованных образцов одуванчика осеннего были растения из типовой местности *T. hybernum*, описанного из окрестностей пгт Никита (пункт 9), а также из типовой местности *T. pobedimovae* Schischk., описанного из окрестностей Севастополя (бухта Камышевая, расположенная в непосредственной близости к бухте Казачьей, пункт 4) (Цвелев, 1989).

Полученные нами результаты могут служить одним из подтверждений выводов об отсутствии таксономической обособленности *T. pobedimovae* и его синонимии с *T. hybernum*, высказанных на основе исследования морфологической изменчивости этих растений (Ена, 2001). Однако по данным литературы известно, что, несмотря на апомиктический способ размножения одуванчика осеннего, внутри этого вида, возможно, имеется определенное морфологическое разнообразие, которое, однако, может и не быть связано с генетической гетерогенностью. Так, в работе (Филиппов и др., 1948) выделены розовосемянковые и белосемянковые формы одуванчика осеннего, которые отличались от типовой бурсемянковой формы не только окраской семян, но и рядом других признаков. Тем не менее сведения, приведенные авторами указанной работы, не позволяют с уверенностью заключить, относились ли исследованные ими формы действительно к *T. hybernum*, или же принадлежали к другим видам одуванчиков секции *Scariosa* Hand.-Mazz. Среди представителей этой секции имеются виды с красноватой окраской семян, например *Taraxacum hyberniforme* Soest, описанный в 1968 г. из Турции, а затем найденный и в Крыму (Van Soest, 1975). Кроме того, среди образцов, рассмотренных Д.И. Филипповым с соавторами, могли быть и иные таксоны, возможно, еще не описанные. Исходя из этого следует, что изучение генетического разнообразия одуванчика осеннего (и близких к нему видов) в Крыму должно быть продолжено

с привязкой к морфологическим особенностям растений, а также содержанию и качеству каучука.

## Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ-Поволжье № 17-44-020120 р\_а и выполнена с использованием оборудования РЦКП «Агидель» и УНУ «КОДИНК».

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Аксельрод Д.М. Агротехника крым-сагыза на поливных землях. М., 1944.
- Бондаренко П.В. Крым-сагыз. Приемы выращивания в Средней Азии. Ташкент: Узфан, 1941.
- Ена А.В. Аннотированный чеклист эндемиков флоры Крыма. Укр. ботан. журн. 2001;58(6):667-676.
- Ефимов П.Г. Исследование генетического полиморфизма *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchii* и *D. incarnata* (Orchidaceae) из северо-европейской части России методом ISSR. Ботан. журн. 2012; 97(6):751-761.
- Ильин М.М., Якимов П.А. Каучуконосы и гуттаперченосы СССР. Под ред. М.М. Ильина. Растительное сырье СССР. Т. 1. Технические растения. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950;61-141.
- Костюкова Е.Е., Заякин В.В., Нам И.Я. Молекулярно-генетический анализ редких видов орхидных Брянской области. Бюл. Брянского отд-ния РБО. 2013;1(1):51-55.
- Плантариум: Определитель растений on-line. *Taraxacum hybernum* Steven. (Электрон. доступ). <http://www.plantarium.ru/page/view/item/37597.html>.
- Филиппов Д.И., Ничипорович А.А., Аксельрод Д.М. Культура каучуконосов в СССР. М.: ОГИЗ; Сельхозгиз, 1948.
- Цвелев Н.Н. Род 19. Одуванчик – *Taraxacum* Wigg. Под ред. Н.Н. Цвелева. Флора европейской части СССР. Т. 8. Л.: Наука, 1989;61-114.
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(22):4692-4693. DOI 10.1093/nar/25.22.4692.
- Baymiev An.K., Ptitsyn K.G., Blagova D.K., Muldashev A.A., Baymiev A.I.K. Genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria entering into symbiosis with bitter peavine *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. *Microbiology.* 2011;80(1):96-100. DOI 10.1134/S0026261711010036.
- Kirschner J., Štěpánek J., Greuter W. *Taraxacum*. In: Greuter W., von Raab-Straube E. (Eds.). *Compositae. Euro+Med Plantbase – the Information Resource for Euro-Mediterranean Plant Diversity*. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, 2017. Available at: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed>. Accessed May 5, 2017.
- McAssey E.V., Gudger E.G., Zuellig M.P., Burke J.M. Population genetics of the rubber-producing Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*). *PLoS ONE.* 2016;11(1):e0146417. DOI 10.1371/journal.pone.0146417.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985;5(2):69-76. DOI 10.1007/BF00020088.
- Van Soest J.L. 127. *Taraxacum* Wiggers. In: Davis P.H. (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press, 1975;788-812.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(22):6531-6535. DOI 10.1093/nar/18.22.6531.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 1994;20(2):176-183. DOI 10.1006/geno.1994.1151.