

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ *LINARIA VULGARIS* L.

О.А. Павлова¹, И.А. Владимиров¹, Д.Е. Полев³, Д.И. Богомаз^{1,2}.

¹ ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ ООО «Сербалаб»

Linaria vulgaris Mill. – широко известный вид растений из рода *Linaria*. сем *Plantaginaceae*. Большинство видов растений из рода *Linaria* являются эндемиками Средиземноморского региона, однако *L. vulgaris* вместе с рядом близкородственных видов демонстрирует необычный для представителей данного рода космополитизм. Она широко распространена на территории Евразии, в РФ её ареал охватывает всю Восточно-Европейскую равнину (кроме Прикаспийской низменности и крайнего Севера), большие районы Западно-Сибирской равнины, встречается льнянка обыкновенная и в других местах. На территории Северной Америки, куда *L. vulgaris* была завезена предположительно в 17 веке (Sing et.al, 2011), льнянка – инвазивное сорное растение, требующее мероприятий по контролю численности (Sing et.al, 2011) и инструмента для изучения динамики распространения и географических исследований. *L.vulgaris* и её близкие, также космополитные родственники, например *L.dalmatica*, обладают характерной особенностью, отличающей их от эндемичных видов из того же рода – наличием в геноме вертикально наследуемых последовательностей агробактериальной кЛТ-ДНК (от. «клеточная» Т-ДНК) (Matveeva et al. 2012). Это редкое явление, кроме *Linaria* известное только в двух родах растений – табак *Nicotiana* (White et. al., 1983) и батат *Ipomoea* (Kyndt et.al., 2015). Для выяснения точного количества копий кЛТ-ДНК у *Linaria vulgaris* необходимо иметь референсную однокопийную последовательность в геноме, примеров которой у *Linaria* не выяснено, так как геном данного объекта не аннотирован. В качестве такой последовательности могут выступать микросателлитные маркеры (в случае, если для них будет показано менделевское наследование). Нами было принято решение о разработке панели микросателлитных маркеров для *Linaria vulgaris*.

Для предварительного поиска последовательностей-кандидатов, содержащих повторы микросателлитного типа, выполнили геномное секвенирование препарата ДНК из *L.vulgaris* (Образец 1 – Петергоф, Россия) с низким покрытием с помощью секвенатора Ion Torrent (ThermoFisher Scientific). К консервативным частям 23 последовательностей-кандидатов подобрали комплекты Су5-меченых праймеров для проведения фрагментного анализа ПЦР-продуктов с помощью фрагментного анализатора / секвенатора AlExpress. Наборы праймеров тестировали на двух образцах ДНК географически удаленных друг от друга растений *L.vulgaris* (Образец 1 – Петергоф, Россия, Образец 2 – Хакассия, Россия). Пригодность последовательности и соответствующего ей комплекта праймеров для использования в качестве маркера оценивали по следующим критериям:

1) Набор праймеров должен давать на ДНК одного растения не более двух ПЦР-продуктов разной длины (обратное свидетельствует о наличии неспецифических продуктов амплификации или о возможной многокопийности маркера)

2) Длина хотя бы одного из продуктов ПЦР на ДНК растения из Петергофа (образец 1) должна с точностью до одного нуклеотида соответствовать расчетной (обратное свидетельствует о нецелевой амплификации).

В таблице 1 приведены сведения о последовательностях разработанных наборов микросателлитных праймеров, выявленных аллельных вариантах и подобранной температуре отжига для каждого конкретного маркера. С помощью маркера M009, показавшего наиболее высокую эффективность, оценили копийность Т-ДНК в *L.vulgaris*. Показано, что *L.vulgaris* содержит не одну, а как минимум две сложно устроенных вставки на гаплоидный геном (Vladimirov et.al. 2019).

Использование разработанного набора позволило проверить гипотезу о клональном характере популяций *L.vulgaris*. Характерной особенностью *L.vulgaris* является очень низкая всхожесть семян в совокупности с выраженной способностью вегетативного размножения с помощью корневищ, а также рост компактными группами, что наводит на мысли о том, что такие компактные группы являются клональными. Вопрос представляет большой интерес ввиду кажущейся несовместимости низкой всхожести семян с высокой инвазивностью и скоростью расселения вида, который за три столетия почти целиком освоил новый континент. Подробный микросателлитный анализ одной из изолированных групп растений, (10 растений, собранных на Заячьем острове Санкт-Петербурга с площади 2 м²), показал наличие различий по длинам аллелей некоторых маркеров. Это указывает на то, что половое размножение при образовании подобных групп также имеет место.

Таблица 1.

№	Расчетная длина (согласно сиквенсам одной из аллелей)	Мотив	Список всех обнаруженных аллельных вариантов (на всех изученных растениях, включая популяционное исследование)	Праймеры (первый из пары содержит краситель су5 на 5' – конце)	Tm	Номер последовательности в базе данных NCBI
M002	91	4 x GAA	91	GGCAACAACCCAGAGAATC CGATCGGGAGTCACATGAT	60	MH298301
M003	81	7 x CA	81, 85, 91	TTCATCCATCTCGCCCTAC TATAGCTGTAATATACTGACTAACG	60	MH298302
M005	156	6 x GGA	156, 165, 171, 180	СТААСАГАААТGGGTGGATGA TATAGGGACGAGTTGGTCAGAT	55	MH298303
M006	215	3 x CCAA, 3 x GGA, 12 x GT	210, 213, 215, 218	CGATGGAAATGTGATAGAACCA GCGTGTACTCCTTCCACTTTC	55	MH298304
M007	172	10 x AT	168, 170, 172, 176, 180, 186	СТААСТGCACACTTAGAAATAAGATG TTGTGAAAGTAAGTTGTGAAGATGAA	55	MH298305
M009	144	5 x GTT	141, 144, 147, 153	GCAGAAGATTTCATGTTTCACGA ATCTGCACCCTATGAGATTTTG	55	MH298306
M010	218	11xGT, 6xGA	194, 214, 218, 220,	CACTTATGGGGCACACTT CCAAGTCCACAGTGCTCAAT	60	MH298307
M012	191	4xGGA	167, 176, 182, 191	GCCTATCACTAGGAGCTACTTCA TTAGGGTCTCTTCCACAAATGA	60	MH298308
M013	86	7xCCT	83, 86	CTTTTACGGCGACCCACAT AAGAGAAGCGAAGCGAGCA	60	MH298309
M014	101	6xGA	101	GGGTTTAGGCAACTTGTTCAGT TTCTATGTGGGATAGTGAAGC	55	MH298310
M015	105	9xGA	105, 107, 109, 111	TTTAACTTCGCCATCGTGA GCTCAAAGTCTGGCTGTATTAC	60	MH298311
M016	179	9xTA	179	TGCCTTTGGTTTGATTTGCT TTGTATGGCACCACCATTATC	55	MH298312
M017	173	4xAAAT	152, 167, 173, 179	GGGTTTGCACAATAGTTGTATTAG GTGTTTGGAGAGTTTATGTGTCCA	55	MH298313
M018	268	11xATT	266, 268, 274, 280	TTGTACTGGCAGTAGGAAAT GAGGACTTCAAAAATAAATGCCTT	60	MH298314
M019	183	3xCA, 9xCT	181, 183, 185	CGTCTGTAGTGTCTGGTTACA GTAGAAATACTTGTGCTCAATAGAA	55	MH298315
M020	191	11xAT	191, 209	CACTTCTACAGAGCCTTCCAGA AGCTTAACAGCCCACAAACAT	60	MH298316
M021	202	10xAGT	200, 202	GTCGGCTCGTGAGATTCTAAT AGAGTCACAACCTGGTGTATCGTA	60	MH298317
M023	193	5xCTC, 5xAAG	193	AGACTATCATGGAGACGCTGAA TTACTACTCGAATGGCTCGTA	55	MH298318

Одним из перспективных направлений использования микросателлитных маркеров может стать изучение путей расселения *L. vulgaris*, что может быть весьма интересно, принимая во внимание необычные особенности биологии *L. vulgaris*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sing, S.E. and R.K. Peterson. (2011). Assessing environmental risks for established invasive weeds: Dalmatian (*Linaria dalmatica*) and yellow (*L. vulgaris*) toadflax in North America. // *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8(7) 2828–53.
2. White FF, Garfinkel DJ, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1983). Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* TDNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 301:348–350.
3. Matveeva TV, Bogomaz DI, Pavlova OA, Nester EW, Lutova LA (2012) Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Mol Plant Microbe Interact* 25(12) : 1542–1551. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0169-R>.
4. Kyndt T, Quispe D, Zhai H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G, Kreuzeb JF (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *PNAS* 112(18) : 5844–5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419685112>
5. Ivan A. Vladimirov, Olga A. Pavlova, Dmitrii E. Polev, Denis I. Bogomaz. cT-DNA in *Linaria vulgaris* L. is multicopy, inverted and homogenized. // 2019 <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/04/23/615328.full.pdf>