

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

Б.Р. Кулуев¹✉, А.В. Фатерыга², А.Р. Кулуев¹, Е.В. Михайлова¹, А.В. Чемерис¹

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

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

Одуванчик осенний (*Taraxacum hybernum* Steven) – растение-кау-
чуконос, одно из альтернативных гевее бразильской растений.
В России произрастает только на Крымском полуострове, поэтому
его часто называют крым-сагыз. Несмотря на свою потенциаль-
ную хозяйственную ценность, генетическая структура крымской
популяции одуванчика осеннего на сегодняшний день остается
неизученной. В связи с этим целью нашей работы была сравни-
тельная 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 полу-
острове. Из сухих листьев анализируемых растений при помощи
цетилтриметиламмоний бромида 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 использо-
вали гель-электрофорез в 8 % полиакриламидном геле. В резуль-
тате проведенной работы была показана гомогенность крымской
популяции одуванчика осеннего, что может быть связано с неболь-
шой областью распространения и апомиктичным способом раз-
множения 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 высокораз-
решающих 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. Kuluev¹✉, A.V. Fateryga², A.R. Kuluev¹,
E.V. Mikhaylova¹, A.V. Chemeris¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre
RAS, Ufa, Russia

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

Krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) is an alter-
native to *Hevea brasiliensis* as a source of natural rub-
ber. 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. Accord-
ing to the plan, we collected achenes, leaves and roots
of krim-saghyz in 10 spots all over the Crimean Penin-
sula. 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 com-
pare the length of SSR amplicons, we used gel-electro-
phoresis 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 (*Tara-
xacum 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 Selekc-
tsii = 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

Table 1. Sampling localities of *Taraxacum hybernum* seeds, leaves, and roots

Locality No.	Location	Cenosis	Coordinates (N, E) and elevation AMSL.
1	Eastern outskirts of Sevastopol, Verkhnesadovoe village, roadside	Lawn	44.688806, 33.693270, 83 m
2	Northern outskirts of Sevastopol, heap near a trench of the First Siege of Sevastopol	Ruderal vegetation	44.632801, 33.536325, 53 m
3	Sevastopol, Inkerman, right bank of the Chernaya River	Steppe slope	44.607195, 33.606330, 13 m
4	Sevastopol, right bank of Kazach'ya Bay	Feathergrass steppe	44.570643, 33.415666, 10 m
5	Sevastopol, Varnutka Valley, roadside between the Yalta motorway and Rezervnoe Village	Steppified slope inside an oak forest	44.479177, 33.692432, 244 m
6	Sevastopol, Baydar Valley, roadside between Orlineo Village and the Baydar Gate passage	Meadow-steppe slope in the fringe of an oak forest	44.430331, 33.790343, 354 m
7	Urban district Yalta, northern outskirts of Katsiveli Settlement, roadside	Underneath cypresses	44.401846, 33.968530, 203 m
8	Urban district Yalta, eastern outskirts of Gurzuf Settlement, Ayu-Dag piedmont	Oak forest fringe	44.566569, 34.319395, 224 m
9	Urban district Yalta, northeastern outskirts of Nikita Settlement, roadside	Underneath cypresses	44.517823, 34.245204, 258 m
10	Urban district Yalta, southern slope of Polikurovskiy Hill, roadside	»	44.500394, 34.184486, 39 m



Fig. 1. Geographical locations of the 10 sampling localities of *T. hybernum* seeds on the map of Crimea.

The map was prepared with 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 семечки 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, MgCl₂ (2.5 мМ для SSR, 5 мМ для RAPD и ISSR), 0.25 мМ каждого dNTP, 90 пМ праймера (для RAPD- или ISSR-анализа) или каждого 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).

Table 2. SSR primers (McAssey et al., 2016)

Locus	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (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

Table 3. RAPD and ISSR primers

Primer name	Sequence 5'–3'
AFK1	ACGGTGGACG
AFK3	GCGTCCATTC
LMBD	GGGCGCTG
IS1	AGAGAGAGAGAGAGAGY
IS3	GAGAGAGAGAGAGAGAC
DAC1	CACACACACACAT

Table 4. Lengths of the amplified DNA fragments in the SSR analysis of *T. hybernum* in 8% polyacrylamide gel and the optimum annealing temperatures of TKS primers

Locus	Amplicon size, bp	Optimum annealing temperature, °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

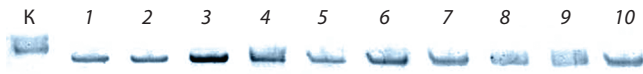


Fig. 2. PAGE analysis of amplification products of *Taraxacum kok-saghyz* (K) and *T. hybernum* from 10 localities (1-10) after SSR-PCR of the TKS_0091 locus.

The size of the TKS_0091 amplicon of *Taraxacum kok-saghyz* (K) is 180 bp.

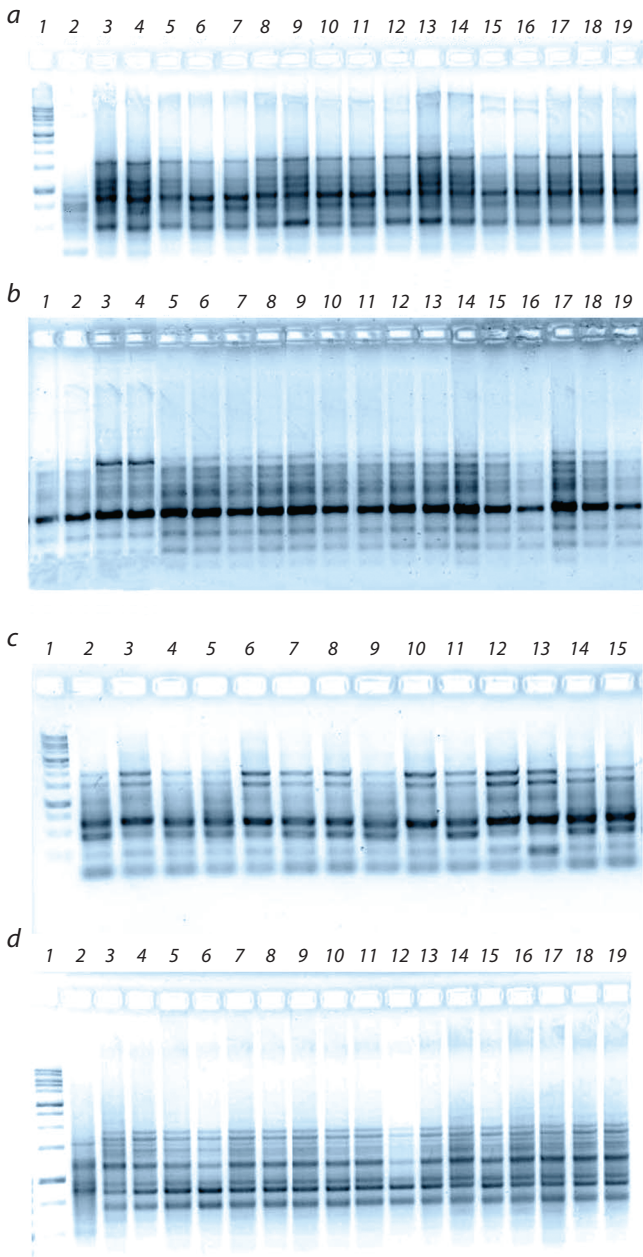


Fig. 3. Results of RAPD and ISSR analyzes.

(a) RAPD analysis with AFK1 primer (Lanes: 1, molecular weight ladder; 2, kok-saghyz, 3-19, *T. hybernum* from ten different habitats). (b) RAPD analysis with AFK3 primer (1-19, *T. hybernum* from ten different habitats). (c) ISSR analysis with DAC1 primer (1, molecular weight ladder; 2-15 *T. hybernum* from 10 different habitats). (d) ISSR analysis with IS3 primer (1, molecular weight ladder; 2, kok-saghyz; 3-19 *T. hybernum* from ten different habitats). The sizes of the molecular weight ladder fragments from bottom to top are: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.

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 биоценоза 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 высокоразрешающих 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 буросемянковой 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.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project Povolzh'e 17-44-020120 r_a. Use was made of equipment of the Agidel Shared Access Center and the KODINK unique research facility.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akselrod D.M. Agrotehnika krym-sagyz na polivnykh zemlyakh [Agrotechnology of krym-sagyz on meliorated lands]. Moscow, 1944. (in Russian)
- 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/S002621711010036.
- Bondarenko P.V. Krym-sagyz. Priemy vyrashchivaniya v Sredney Azii [Krym-sagyz. Methods of growing in Central Asia]. Tashkent: Uzfan Publ., 1941. (in Russian)
- Ena A.V. Annotated check-list of endemics of the Crimean flora. *Ukrainskiy botanicheskiy zhurnal = Ukrainian Botanical Journal.* 2001;58(6):667-676. (in Russian)
- Efimov P.G. The study of ISSR polymorphism of *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii* and *D. incarnata* (Orchidaceae) from the northwest European Russia. *Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal.* 2012; 97(6):751-761. (in Russian)
- Filippov D.I., Nichiporovich A.A., Akselrod D.M. Kultura kauchukonosov v SSSR [Culture of Rubber Plants in the USSR]. Moscow: OGIZ; Selkhozgiz Publ., 1948. (in Russian)
- Ilyin M.M., Yakimov P.A. Kauchukonosy i guttaperchenosy SSSR [Rubber plants and gutta-percha plants of the USSR]. Ilyin M.M. (Ed.). *Rastitel' noe syr'e SSSR. Tekhnicheskie rasteniya* [Raw plant materials in the USSR: Industrial crops. V. 1.]. Moscow, Leningrad: AS of USSR Publ., 1950;61-141. (in Russian)
- 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.
- Kostyukova E.E., Zayakin V.V., Nam I.Ya. The molecular-genetic identification of rare orchid species of the Bryansk region. *Byulleten Bryanskogo otdeleniya Rossiyskogo botanicheskogo obshchestva = Bulletin of Bryansk department of Russian botanical society.* 2013; 1(1):51-55. (in Russian)
- 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.
- Plantarium: an online plant indicator. *Taraxacum hybernum* Steven. Available at: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/37597.html>. (in Russian)
- 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.
- Tsvelev N.N. Genus *Taraxacum* Wigg. N.N. Tsvelev (Ed). *Flora evropeiskoi chasti SSSR* [Flora of the European USSR. V. 8]. Leningrad: Nauka Publ., 1989;61-114. (in Russian)
- 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.