

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМА ОГУРЦА ПОСЕВНОГО
(*CUCUMIS SATIVUS* L.) С ПОМОЩЬЮ ISSR-МАРКЕРОВ

А.Н. БАЙНАЗАРОВА, Г.И. КАРЛОВ, Л.И. ХРУСТАЛЕВА

(Центр молекулярной биотехнологии)

Уровень полиморфизма в геноме огурца был изучен с помощью ISSR-PCR. Исследования были проведены на двух сортах — «Малыш» и «Белый ангел», двух гибридах первого поколения — «Nasy Fashinary» и «Феникс» и 14 селекционных линиях. Для проведения ISSR-PCR было использовано 19 праймеров. 14 из этих 19 праймеров выявили различный уровень полиморфизма, который варьировал от 10 до 83,3%. Самый высокий уровень полиморфизма был получен с использованием праймера K28 [GT]₈A. Пять бэндов из шести, полученных на этом праймере, были полиморфными. Можно предположить, что данный тип повтора подвергался наибольшей изменчивости в процессе эволюции генома огурца. В работе обсуждаются преимущества использования ISSR-PCR метода для анализа организации генома и применения этого метода в селекции огурца.

Огурец посевной (*Cucumis sativus* L.), представитель семейства Тыквенных (*Cucurbitaceae*), является одним из самых древних и наиболее популярных возделываемых видов овощных культур. За последние 10 лет геном огурца довольно интенсивно изучался с использованием различных молекулярных маркеров. Однако не все известные системы маркирования подходят для выявления полиморфизма в геноме огурца. Возможно, это связано с тем, что генофонд дикорастущих видов *Cucurbitaceae* не подвергался значительным изменениям в процессе эволюции, что подтверждается данными о вариабельности изоферментного состава, толерантности инбридинга и эволюции генетического разнообразия [21]. Так например, с помощью RAPD- и RFLP-маркеров удалось выявить низкий уровень внутри- и межвидового полиморфизма (3-8%; около 2 аллелей/локус), что затрудняет использование этих маркеров в селекции и сортовой дифференциации огурца [10, 16, 28]. В 2001 г. Дахин-Полег с соавторами [6] сообщили об успешном применении у огурца маркеров, связанных с микросателлитными последовательно-

стями (Simple Sequence Repeats - SSRs). SSR-анализ огурца посевного выявил относительно высокую степень полиморфизма (около 30%, т.е. больше 2 аллелей/локус). Сейчас по SSR-маркерам для огурца существует достаточно большая база данных. Однако количество полиморфных локусов, найденных в этой культуре, все же недостаточно для применения в селекционно-генетических программах по идентификации и оценке сортов, молекулярному маркированию хозяйственно ценных признаков. Поэтому поиск новых полиморфных молекулярных маркеров для огурца является на сегодня актуальной задачей.

В нашей работе мы использовали ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, межмикросателлитные повторы) маркеры, которые еще не применялись для изучения полиморфизма генома огурца. Преимуществом данного метода по сравнению с SSR-анализом является то, что для подбора ISSR-праймеров не нужна информация о последовательности ДНК. ISSR-праймеры состоят из корового мотива, комплементарного какому-либо типу микросателлитного повтора и нескольких

(1~3) якорных нуклеотидов на 3'-конце, которые определяют место отжига праймера [34]. ISSR-маркеры к настоящему времени получили широкое распространение благодаря таким свойствам, как высокая точность, воспроизводимость и высокий уровень полиморфизма. Недавно было показано, что на основе полиморфизма микросателлитных последовательностей, находящихся в кодирующих регионах генома, могут быть созданы ISSR-маркеры к генам устойчивости [32]. ISSR-маркеры нашли широкое применение для оценки генетического разнообразия растений (пшеница, рис, земляника, плодовые культуры), определения соматической вариабельности (капустные), мечения генов (пшеница, картофель, рис, томат), филогенетического анализа (персик, сортовой идентификации (персик, цитрусовые) [23].

В данной работе представлены результаты оценки 19 ISSR-праймеров на их способность выявлять полиморфизм в геноме огурца. Проведенный нами ISSR-анализ показал достаточно высокий уровень полиморфизма (31%) межмикросателлитных последовательностей, что позволяет рекомендовать этот метод для разработки молекулярных маркеров ценных генов/признаков, имеющих важное экономическое значение в селекции огурца.

Материалы и методы

В работе было использовано 18 образцов огурца посевного: сорт «Малыш», сорт «Белый ангел», гибрид F1 «Феникс», гибрид F1 «Nasy Fashinary», остальные образцы представляют собой линии из селекционной популяции семеноводческой фирмы и в нашей работе следуют под номерами (образцы любезно предоставлены селекционно-семеноводческой фирмой «Гавриш»),

ДНК выделяли из свежесобранных семядольных листьев по методу, описанному Бернатцки и Тансклей [2] с небольшими нашими модификациями.

300-400 мг растительного материала (семядоли) растирали в 0,5 мл охлажденного на льду экстрагирующего буфера (DEB) pH 7,5 (0,75 М сорбитол, 100 мМ Трис-HCl, 5 мМ ЭДТА) с $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (из расчета 0,019 г на 5 мл буфера), центрифугировали 10 мин со скоростью 14 тыс. об/мин при 4°C. Сливали надосадочную жидкость, к осадку добавляли 125 мкл охлажденного DEB. К смеси добавляли 175 мкл лизирующего буфера (1М Трис-HCl; 0,5М ЭДТА; 5М NaCl; 2%СТАВ, pH 7,5) и 50 мкл 5%-го саркозила. Инкубировали 45 мин при 65°C в водяной бане с качалкой. Добавляли 750 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), перемешивали 15 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об/мин. К супернатанту добавляли 1 объем изопропанола, охлажденного на льду. Перемешивали и центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об/мин. Осадок ДНК высушивали вакуумной инфльтрацией и растворяли в 100 мкл бидистиллированной H_2O .

В работе было использовано 19 межмикросателлитных праймеров. Праймеры, использованные для проведения ПЦР, представлены в таблице.

Реакционная смесь для проведения ISSR-ПЦР объемом 25 мкл содержала: 0,2 мМ dNTP (Силекс М), 1 ед. Taq-полимеразы (Силекс М), буфер для Taq-полимеразы (Силекс М) 0,5 мкМ каждого праймера (Синтол), 100-150 нг ДНК. В пробирки поверх реакционного раствора добавляли 25 мкл минерального масла. Условия ПЦР: 94°C, 5 мин — начальная денатурация; 30 циклов: 94°C — 1 мин, 55°C — 2 мин, 72°C — 30 с; конечный синтез — 72°C, 5 мин. Для проведения реакции использовали амплификатор Терцик (АО «ДНК-технология», Москва).

Продукты ПЦР разделяли в 2%-м агарозном геле с буфером TBE при напряжении 6В/см. После окрашивания бромистым этидием гели фотографировали под УФ светом фотокамерой «Nikon».

Полиморфизм межмикросателлитных последовательностей образцов огурца, полученный при проведении ISSR-ПЦР

Праймер	Тип повтора	Общее количество бэндов	Количество полиморфных бэндов
K13	[AG] ₈ YT	12	7
K15	[GT] ₈ YC	12	3
K16	[CA] ₈ RC	10	1
K17	[CA] ₈ A	10	0
K18	[GA] ₈ A	0	0
K19	[AC] ₈ YA	10	3
K20	[CT] ₈ T	0	0
K21	[GATA] ₄	6	2
K24a	[GA] ₈ A	12	3
K24в	[CA] ₈ T	9	3
K25	[AG] ₈ G	0	0
K26	[AG] ₈ T	10	3
K27	[AG] ₈ C	16	9
K28	[GT] ₈ A	6	5
K30	[TG] ₈ G	10	3
K31	[TG] ₈ A	5	4
K32	[GAA] ₈	17	0
K33	[CT] ₈ A	7	2
K34	[CT] ₈ G	16	4
Итого		168	52

Результаты и их обсуждение

Анализ образцов огурца посевого показал, что 16 из 19 использованных ISSR-праймеров дали хорошо воспроизводимые электрофоретические профили с общим количеством бэндов, колеблющимся от 5 до 17 (см. табл.). Наибольшее число бэндов было получено при использовании праймера K32 (GAA)₈. Однако использование этого праймера не выявило полиморфизма. Подобная картина наблюдалась при использовании праймера K17, где было получено 10 четких бэндов, но не было обнаружено полиморфизма.

14 ISSR-праймеров выявили полиморфизм. Уровень полиморфизма варьировал от низкого — 10% (K16: 1 полиморфный бэнд из 10 выявленных) до высокого — 83,3% (K28: 5 полиморфных бэндов из 6 выявленных). На рис.1 представлен ISSR-профиль, полученный с праймером K26, на котором выявлено 3 полиморфных бэнда из 10 по-

лученных, а на рис.2 — с праймером K28, на котором выявлен самый высокий полиморфизм.

С помощью 14 ISSR-праймеров был получен в общей сумме 141 бэнд (ПЦР-продукт) на всех изучаемых образцах огурца, из них 52 были полиморфными. Средний уровень полиморфизма, полученный с использованием указанных праймеров, составил 31%.

В данной работе мы изучили возможность использования ISSR-праймеров для выявления полиморфизма в геноме огурца посевого. Нами было проанализировано 19 ISSR-праймеров. Не все используемые праймеры оказались пригодными для выявления полиморфизма. На 3 праймерах (K18, K20 и K25) не было получено ПЦР-продуктов и на 2 праймерах (K17 и K32) не было выявлено полиморфных бэндов. Отсутствие ПЦР-продуктов при использовании праймеров K18, K20 и K25, возможно, могло быть результатом того, что расстояние между сайтами отжига этих праймеров находилось вне пределов амплификации ДНК Taq-полимеразой, т. е. размер межмикросателлитных последовательностей ДНК составил более 1-2 т. п. н.

Самый высокий полиморфизм нами был выявлен на динуклеотидном праймере K28 [C₈T]₈A. Можно предположить, что данный тип повтора подвергался наибольшей изменчивости в процессе эволюции генома огурца. Проведенные исследования по эволюции микросателлитных последовательностей на различных видах растений показали наибольшую изменчивость в динуклеотидных повторах [24]. В работе с использованием ISSR-анализа у картофеля с помощью праймеров K11 [GA]₈YC и K13 [AG]₈YT были идентифицированы 34 сорта *Solanum tuberosum* L. [33]. Использование этих же праймеров обеспечило высокий уровень полиморфизма сортов и видов риса [22]. Исследования на шелковице с помощью ISSR-праймеров выявили, что наиболее продуктивными являются

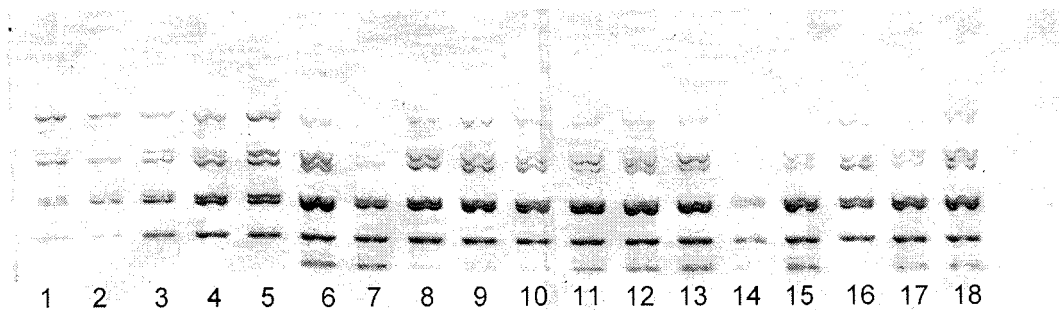


Рис. 1. Полиморфизм межмикросателлитных последовательностей образцов огурца, полученный при проведении ISSR-ПЦП с использованием праймера K26; элетрофоретические профили с1 по 6 — селекционные линии, 7 — гибрид 1-го поколения — «Nacy Fashinary», с 8 по 10 — селекционные линии, 11 — сорт «Малыш», 12 — селекционная линия, 13 — гибрид 1-го поколения «Феникс», 14 — сорт «Белый ангел» и с15 по 18 — селекционные линии

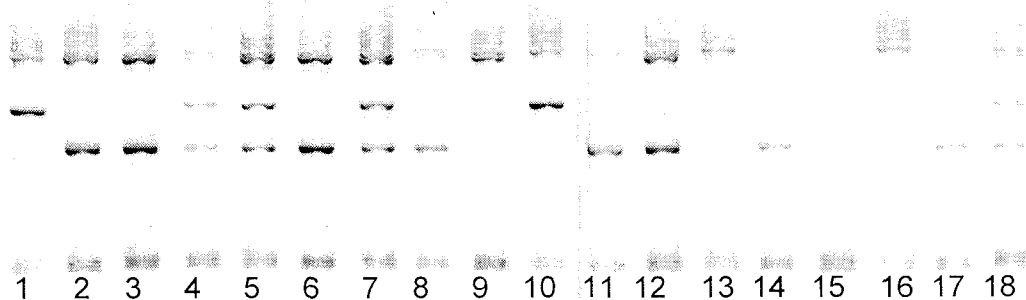


Рис. 2. Полиморфизм межмикросателлитных последовательностей образцов огурца, полученный при проведении ISSR-ПЦП с использованием праймера K28; элетрофоретические профили с1 по 6 — селекционные линии, 7 — гибрид 1-го поколения — «Nacy Fashinary», с8 по 10 — селекционные линии, 11 — сорт «Малыш», 12 — селекционная линия, 13 — гибрид 1-го поколения «Феникс», 14 — сорт «Белый ангел» и с15 по 18 — селекционные линии.

праймеры, содержащие повторы $(TG)_7$ и $(CA)_7Y$ [13]. При картировании хромосом пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) ISSR-праймеры с динуклеотидным повтором $[AC]_8$ также обеспечили высокий уровень полиморфизма [1]. Тринуклеонидный праймер K32 $[GAA]_8$ в нашей работе не выявил полиморфизма, но продуцировал наибольшее число бэндов. Аналогичные результаты с ISSR-праймерами получены на *Citrus*, где на этом же праймере K32 выявлено наибольшее число

бэндов [24]. Единого мнения об эволюции различных типов микросателлитных повторов пока нет. Так, некоторые авторы [18, 20] сообщают о высокой изменчивости в тетрануклеотидных повторах.

Наши результаты согласуются с данными, полученными ранее на огурце с использованием SSR-анализа, где авторы сообщают о высоком уровне полиморфизма микросателлитных повторов [8]. Также высокий уровень SSR-полиморфизма был показан на дыне —

ближайшем родственном виде и видах *Cucurbita* и *Citrullus*, принадлежащих к тому же семейству тыквенных [6, 12, 14, 15, 19, 30, 31, 35]. На основании наших данных и данных литературы можно сделать вывод о том, что в геноме огурца наблюдается высокий полиморфизм как длины самих микросателлитов, так и последовательностей ДНК, находящихся между ними.

Итак, результаты наших исследований показали, что ISSR-ПЦР является хорошо воспроизводимым методом и позволяет выявлять достаточно высокий уровень полиморфизма. Поэтому данный метод может быть рекомендован для использования в селекции огурца. Самый высокий уровень полиморфизма нами был найден на динуклеотидном праймере K28 [GT]₈A, что позволяет предположить, что наиболее подверженными изменениям в процессе эволюции огурца оказались динуклеотидные микросателлитные повторы. Полученные данные дополнили наши знания об организации генома огурца посевного (*Cucumis sativus* L.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Awasthi K. et al. // BMC Genetics, 2004, 5: 1. — 2. Bernatzky R., Tanksley S.D. // Theor. Appl. Genet., 1986, 72: 314-324. — 3. Chakraborty R., Kimmel M., Stivers D.N., Deka R. // Proc Natl Acad. Sci. USA, 1997, 94: 1041-1046. — 4. Chen J.-F. & Aclberg. // Hort Science, 2000, 35(1): 11-15. — 5. Dahin-Poleg Y., Reis S., Baudracco Arnas et al. // Genome, 2000, 43: 963-974. — 6. Dahin-Poleg Y., Reis N., Tsurii G., Katsir N. // TAG Theor. Appl. Genet., 2001, 102: 61-72. — 7. Dijkhuisen A., Kennard W.C., Havery M.J., Staub J.E. // Euphytica, 1996, 90: 79-87. — 8. Fazio G., Staub J.E. // Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2000, 23: 4-7. — 9. Fazio G., Staub J.E., Sang Min Chung. // J. Amer. Soc. Sci., 2002, 127(4): 545-557. — 10. Horejsi T., Staub J.E. // Genet. Res. Crop Evol., 1999, 46: 337-350. — 11. Horejsi T., Staub J.E., Thomas. // Euphytica, 2000, 115: 105-113. — 12. Jarret R.L., Merrick L.C., Holms T. et al. // Genome, 1997, 40: 433-441. — 13. Joshi S.P. // Theor. Appl. Genet., 2000, 100: 1311-1320. — 14. Katzir N., Danin-Poleg Y., Karehi Z. et al. // Theor. Appl. Genet., 1996, 93: 1282-1290. — 15. Katzir N., Portnoy V., Yonash N. et al. // Plant, Animal & Microbe Genome Conf., 2002, 10: 121 (abst.). Scherago International, New York. — 16. Kennard W.C., Poetter K., Dijkhuisen A. et al. // Theor. Appl. Genet., 1994, 89: 42-48. — 17. Knerr L.D., Staub J.E. // Theor. Appl. Genet., 1992, 89: 42-48. — 18. Lee J.S., Hanford M.G., Genova J.L., Farber R.A. // Hum. Mol. Genet., 1999, 8: 2567-2572. — 19. Lopez-Sese A., Staub J.E., Katzir N., Gomez-Guillamon M.L. // Euphytica, 2002, 127: 41-51. — 20. Nagaoka T., Oginata Y. // Theor. Appl. Genet., 1997, 97: 597-602. — 21. Pzbybeeki Z., Filipecki M.K. // Genet. Pol., 1996, 37A: 58-68. — 22. Prevost A., Wilkinson M.J. // Theor. Appl. Genet., 1999, 98: 107-112. — 23. Rakoczy-Trojanowska M., Bolibok H. // Cellular & Molecular Biology Letters, 2004, 9: 221-238. — 24. Sankar A.A. // Theor. Appl. Genet., 2002: 206-214. — 25. Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. // Prot Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 8761-8765. — 26. Serquen F.C., Bacher J., Staub J.E. // Mol. Breed, 1997, 3: 257-268. — 27. Staub J.E. // New Seeds, 1999, 1: 39-65. — 28. Staub J.E., Box J., Meglic V. et al. // Genet. Res. Crop. Evol., 1997, 44: 257-269. — 29. Staub J.E., Chung S.-M., Fazio G. // Plant Breeding, 2005, 124: 44-53. — 30. Staub E.J., Danin-Poleg Y., Fazio G. et al. // Euphytica 115: 225-241. — 31. Staub J.E., Fazio G., Horejsi T. 2000. — 32. Tikunov Yu.M., Khrustaleva L.I., Karlov G.I. // Euphytica, 2003, 131: 71-80. — 33. Weber J.L., Wong C. // Hum. Mol. Genet. 2: 1123-1128. — 34. Zeitkewicz E., Rafalski A., Labuda D. // Genomics, 1994, 20: 176-183. — 35. Zhuang F.Y., Chen J.E., Staub J.E. // Qian C.T. // Plant Breeding, 2004, 123: 167. Euphytica, 2003, 131: 71-80. — 33. Weber J.L., Wong C. Mutation of human short tandem repeat. Hum. Mol. Genet. 2: 1123 — 1128. — 34. Zeitkewicz E., Rafalski A., Labuda D. // Genomics, 1994, 20: 176-183, — 35. Zhuang F.Y., Chen J.E., Staub J.E. // Qian C.T. // Plant Breeding, 2004, 123: 167.

SUMMARY

The level of polymorphism in cucumber was studied using ISSR-PCR. Two varieties — “Malysh” and “Beliy angel”, two FI hybrids — “Nacy Fashinary” and “Feniks”, and 14 breeding lines were analyzed. ISSR-PCR was performed with 19 primers. 14 of these 19 primers showed different level of polymorphism that ranged from 10 up to 83,3%. The highest polymorphism was obtained with primer K28 [GT]₈A (five of the six bands were polymorphic). The data suggests that this type of two-nucleotide repeat has undergone most changes during the cucumber evolution. Exploitation of ISSR-PCR for analysis of genome organization and its use for the accompaniment of breeding process are discussed.