

УДК 634.711.1:631.524

ОЦЕНКА МЕЖВИДОВОГО И МЕЖСОРТОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА
МАЛИНЫ И МАРКИРОВАНИЕ ПРИЗНАКА РЕМОНТАНТНОСТИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-ПЦР-АНАЛИЗА

В.В. СОБОЛЕВ*, АГ. СОБОЛЕВА* Г.Н. АНДРЕЕВА, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии)

Изучен уровень полиморфизма по межмикросателлитным последовательностям ДНК у 32 образцов малины. Впервые на основании ISSR-маркеров построены дендрограммы генетического родства, включающие 15 ремонтантных сортов, 12 сортов с обычным типом плодоношения и 5 видов малины. Получено четкое разделение исследуемых образцов по группам на ремонтантные и сорта с летним типом плодоношения. Впервые выявлен специфический межмикросателлитный маркерный фрагмент на признак ремонтантности у малины.

Ключевые слова: полиморфизм, малина, ПЦР.

Малина является важной плодовой культурой, относящейся к роду *Rubus* (Tourn.) L. Этот род состоит из крайне гетерозиготной серии видов и межвидовых гибридов. Сообщалось примерно о 500 видах, отнесенных к этому роду, главным образом из холодной и умеренной зон северного полушария; однако некоторые были найдены в тропических горных районах южного полушария, за Полярным кругом, а также на океанических островах [1]. Многие природные и культурные формы являются межвидовыми гибридами [2]. Использование в селекции малины межвидовой гибридизации обособлено большим генетическим разнообразием, которое позволяет получать новые формы малины, несущие хозяйственно ценные признаки — ремонтантность, высокая урожайность, транспортабельность, высокие вкусовые качества и др. Поэтому оценка генетического полиморфизма и филогенетических взаимоотношений между вида-

ми и сортами малины может помочь созданию ценных форм этой культуры.

Структура и организация генома малины мало изучена. Единичные работы посвящены оценке самоклональной вариабельности и возможности применения некоторых молекулярных маркеров для сортовой идентификации [3–8]. Одним из наиболее эффективных методов для работы с малоизученными геномами растений является ISSR-ПЦР. Этот метод обладает хорошей воспроизводимостью результатов и высокой информативностью при изучении межвидового и межсортového полиморфизма [9–10]. Показана также его высокая эффективность при маркировании хозяйственно ценных признаков растений [11 — 15].

В нашей работе проведено исследование межсортového и межвидового полиморфизма ISSR-маркеров малины. Оценивается возможность применения этого типа маркеров для филогенетических исследований, иденти-

* Брянская государственная сельскохозяйственная академия.

фикации сортов малины и маркирования признака ремонтантности.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 5 видов малины — *Rubus idaeus* L (Новость Кузьмина), *Rubus crataegifolius* Bunge, *Rubus odoratus* L, *Rubus occidentalis* L, *Rubus arcticus sfellarcticus* G. Larsson (Sofia из коллекции ВИРа); 15 сортов ремонтантной малины межвидового происхождения — Геракл, Бабье лето, Бабье лето-2, Абрикосовая, 40-241-1, Августина, Надежная, Элегантная, Снегирек, Autumn Bliss, Heritage, Брянская юбилейная, Золотые купола, Сентябрьская, Журавлик; 12 сортов малины с обычным типом плодоношения — Гусар, Беглянка, Спутница, Кокинская, Незнакомка, Бригантина, Ньюбург, Вольница, Бальзам, Брянская, Рубин брянский, Пересвет. Все сорта предоставлены Кокинским опорным пунктом ВСТИСП.

Экстракция ДНК и ПЦР. ДНК выделяли из 60 мг свежего растительного материала. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере «АМПЛИ-4» («Биоком», Москва) с ISSR-праймерами, синтезированными ЗАО «СИНТОЛ», Москва (табл. 1). Реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) содержала следующие компоненты: 1 ед. Таг-ДНК полимеразы («Силекс М», Москва), 2,5 mM MgCl₂-Таг-бу4Дер (поставляется вместе с ферментом), 0,25 mM каждого dNTP («Силекс М»); 30 пМ каждого из праймеров, 20 нг тотальной геномной ДНК. Приготовленную смесь покрывали минеральным маслом. Условия амплификации были следующими: начальная денатурация 5 мин при 94°C; 35 циклов денатурация — 1 мин при 94°C, отжиг — 1 мин при 55°C, элонгация — 2 мин при 72°C; конечная элонгация 7 мин при 72°C.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле с буфером TBE в присутствии бромистого этидия при напряжении 6 В/см. Визуализацию проводили в УФ свете. Учи-

Таблица 1

Характеристика используемых праймеров

№	Код праймера	Праймер	Число фрагментов	
			общее	полиморфных
1	K19	(AC) ₈ YA	32	31
2	K36	(AG) ₈ YG	14	10
3	K12	(AC) ₈ G	32	30
4	K18	(GA) ₈ C	31	28
5	K11	(GA) ₈ YC	30	26
6	K16	(CA) ₈ RC	27	23
7	K17	(CA) ₈ A	30	29
8	K13	(AG) ₈ YT	27	25
9	K37	(GT) ₈ T	2	2
10	K10	(AC) ₈ YG	3	0
11	K38	(GT) ₈ YT	0	0
12	K34	(CT) ₈ G		Шлейф
13	K27	(AG) ₈ C	0	0
14	K30	(TG) ₈ G	1	1
15	K22	(CA) ₈ GT		Шлейф

тывали только хорошо различимые ПЦР-фрагменты. Полиморфными считались фрагменты ДНК, присутствующие в спектре не всех сортов.

Электрофоретические профили продуктов ISSR-ПЦР анализировали с помощью программы KNE-Kscan 1.3, CSP Inc. Для определения генетических дистанций и кластерного распределения сортов использовали пакет программ STATISTICA 6.0® («Microsoft Co.», USA). Полученные результаты были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков: присутствие фрагмента принимали за 1, отсутствие — за 0. Генетические дистанции рассчитывали для пар сортообразцов как коэффициент различия — отношение полиморфных локусов к общему количеству локусов у двух сравниваемых образцов. Кластерный анализ проводили невзвешенным парногрупповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA).

Результаты и их обсуждение

ISSR-полиморфизм. Для изучения полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК видов и сортов малины (подрод *Idaeobatus* рода

Rubus) было использовано 15 ISSR-праймеров (см. табл. 1) Продукты амплификации были получены для 11 из 15 протестированных праймеров, 10 праймеров обеспечили амплификацию полиморфных фрагментов. Пример полученных профилей с использованием праймеров K-18 и K-11 представлен на рисунке 1. При сравнении ISSR-профилей генотипов малины был выявлен высокий полиморфизм межмикросателлитных последовательностей ДНК (см. табл. 1). При этом анализировали мажорные и минорные фрагмента, так как они обладали высокой воспроизводимостью.

При использовании праймеров K34, K22 получены профили с качеством, проявляющимся в образовании шлейфа, а использование праймеров K37, K10, K38, K27, K30 приводило к амплификации очень малого количества полос или амплификация вообще не была отмечена, что не позволяло использовать их для дальнейшего анализа. Изменение условий при проведении ПЦР не способствовало улучшению результатов амплификации при использовании данных праймеров. На-

большее количество ISSR-фрагментов получено при использовании праймеров K19, K12, основанных на динуклеотидном повторе [AC]. Для работы отобрали только 8 праймеров (табл. 2), обеспечивающих амплификацию большого количества бэндов (до 32 на образец). Было проанализировано 223 ампликона, из которых полиморфными оказались 202, что составило 90,6%. В целом наблюдалось широкое варьирование генетического полиморфизма в зависимости от праймера и группы анализируемых образцов. Всего учитывали 4 группы образцов: виды малины, ремонтантные сорта, обычные сорта, объединенная группа всех сортов и видов. Самый высокий уровень полиморфизма наблюдался в объединенной группе сортов и видов, где он варьировал от 71,4 до 96,8% и в среднем составил 89,2%, что вполне логично можно объяснить тем, что в данной группе наряду с сортами учитывались данные по отдельным видам, которые имеют большое количество уникальных фрагментов, специфичных только для данного вида, а внутри видовой группы полиморфизм колебался от

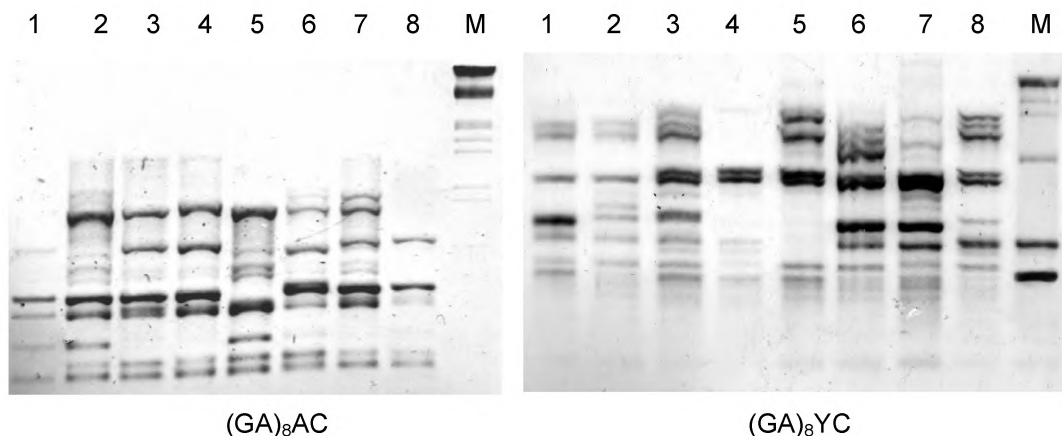


Рис. 1. ISSR профили видов и сортов малины, полученные путем разделения продуктов ПЦР в 2%-м агарозном геле. 1 — Брянская юбилейная (p)*, 2 — Золотые купола (p), 3 — Журавлик (p), 4 — Кокинская, 5 — Спутница, 6 — Снегирек (p), 7 — Беглянка, 8 — *Rubus idaeus* L. (Новость Кузьмина)

* — ремонтантные сорта.

Полиморфизм межмикросателлитных последовательностей видов и сортов малины

№	Праймер	Общее число бэндов				Число полиморфных бэндов				Процент полиморфизма			
		ремонтантных	обычных	видов	всех образцов	ремонтантных	обычных	видов	всех образцов	ремонтантных	обычных	видов	всех образцов
1	(AC) ₈ YA	20	20	26	32	13	15	24	31	65	75	92,3	96,8
2	(AG) ₈ YG	10	11	12	14	5	5	8	10	50	45,4	66,7	71,4
3	(AC) ₈ G	25	22	12	32	23	20	9	30	92	91	75	93,8
4	(GA) ₈ C	22	22	26	31	16	17	23	28	72,7	77,3	88,5	90,3
5	(GA) ₈ YC	18	21	17	30	14	17	13	26	77,8	81	76,5	86,7
6	(CA) ₈ RC	21	17	22	27	16	12	17	23	76,2	70,5	77,3	85,2
7	(CA) ₈ A	21	15	19	30	19	12	18	29	90,5	80	94,7	96,7
8	(AG) ₈ YT	16	17	22	27	11	13	20	25	68,7	76,5	91	92,6

66,7 до 94,7% и в среднем, по 8 праймерам составил 82,75%. В среднем процент полиморфизма у группы ремонтантных сортов и сортов с обычным типом плодоношения существенно не различался и составил 74,1 и 74,6% соответственно. В целом, как видно из данных, геном малины отличается высокой степенью полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК.

Генетические дистанции и ISSR-группы сортов. Полученные результаты нашли свое отражение в дендрограммах генетических взаимоотношений. На рисунке 2 представлена дендрограмма, построенная на основании использования данных, полученных со всех 8 праймеров и 32 генотипов. Как видно из дендрограммы, генотипы по степени генетической близости объединяются в шесть групп кластеров, из которых наиболее выделяются две группы кластеров: в первую входят сорта, несущие признак ремонтантности, а во вторую — сорта с обычным типом плодоношения. На большем генетическом расстоянии от всех сортов находятся четыре вида малины *Rubus crataegifolius* Bunge, *Rubus odoratus* L, *Rubus occidentalis* L, *Rubus arcticus*

sfellarcticus G. Larsson, выделенные на дендрограмме отдельными кластерами, что указывает на их генетическую обособленность, однако *Rubus idaeus* L. имеет довольно близкое генетическое расстояние с неремонтантными сортами, что объясняется тем, что данный вид представлен старинным сортом Новость Кузьмина, который давно используется в селекции.

Наиболее тесная связь внутри кластера ремонтантных сортов наблюдалась между сортами Августина — Снегирек и Оттом Блосс — Брянская юбилейная, к тому же эти две группы сортов тоже были тесно связаны между собой. Сорта Геракл и Золотые купола не образуют тесных групп сцепления с другими сортами и находятся на значительном удалении от других сортов внутри кластера. Исходя из вышеперечисленных фактов, сорта Геракл и Золотые купола можно рекомендовать в качестве родительских форм при составлении схем скрещиваний со всеми сортами, представленными внутри данного кластера.

Внутри кластера неремонтантных сортов наиболее близкие генетические расстояния установлены между сортами Гусар — Бригантина, Беглянка —

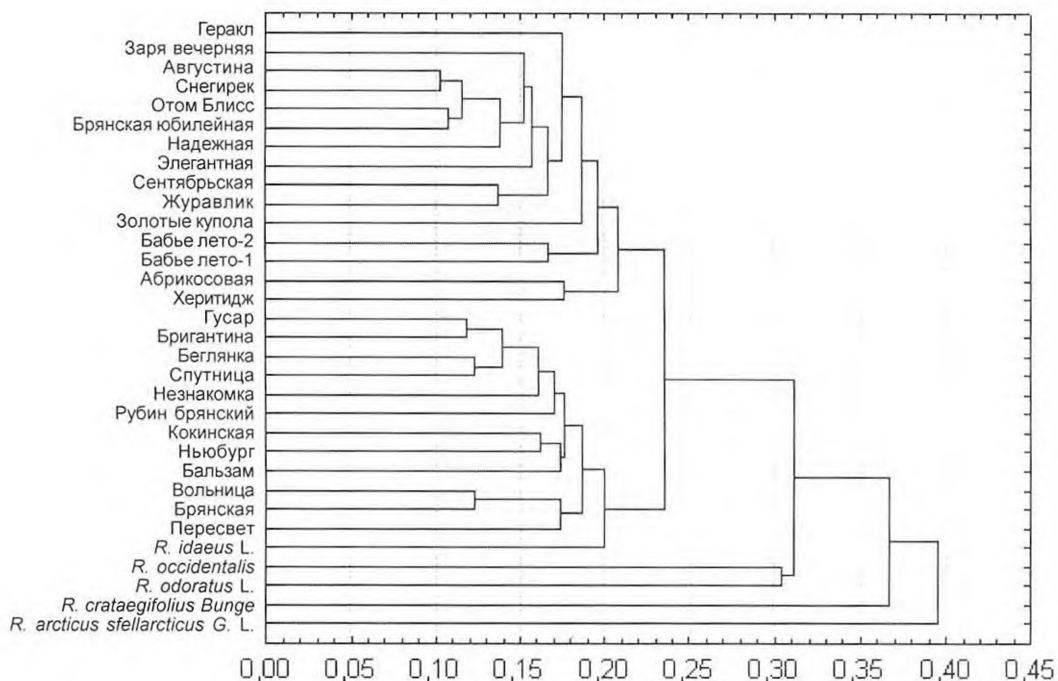


Рис. 2. Дендрограмма генетических взаимоотношений видов и сортов малины, построенная по результатам ISSR — анализа методом UPGMA

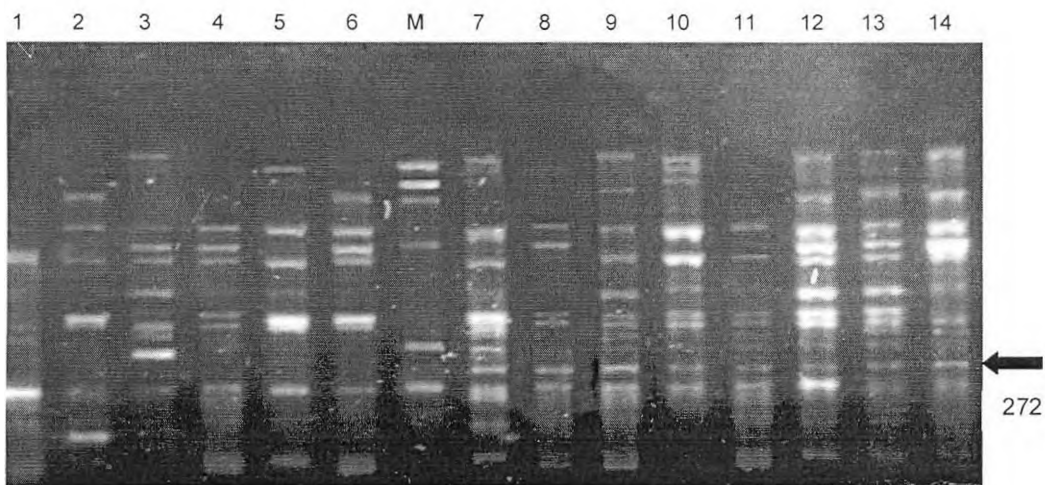


Рис. 3. Молекулярное маркирование ремонтантных сортов малины. Неремонтантные сорта: 1 — Новость Кузьмина, 2 — Пересвет, 3 — Рубин брянский, 4 — Брянская, 5 — Бальзам, 6 — Вольница; ремонтантные сорта: 7 — Элегантная, 8 — Надежная, 9 — Августина, 10 — Заря вечерняя, 11 — Абрикосовая, 12 — Бабье лето-1, 13 — Бабье лето-2, 14 — Геракл

Спутница и Вольница — Брянская, причем первые две группы были тесно связаны между собой. Наиболее удаленными от других сортов оказались сорта Пересвет — Новость Кузьмина, которые тоже выделялись в отдельную группу.

Маркирование признака ремонтантности. При использовании праймера K19 был обнаружен специфический маркерный фрагмент длиной около 272 п.н., присутствующий во всех 15 исследованных сортах ремонтантной малины. Можно предположить, что данный фрагмент является маркером ремонтантности, так как при проведении анализа сортов малины с обычным, неремонтантным, типом плодоношения он не был обнаружен (рис. 3)

Выводы

1. Выявлен высокий полиморфизм по межмикросателлитным последовательностям ДНК у тридцати двух образцов малины. Межвидовой полиморфизм в среднем составил 82,75%, полиморфизм между ремонтантными сортами — 74,1% и полиморфизм между неремонтантными сортами — 74,6%

2. На основании ISSR-маркеров впервые построены дендрограммы генетического родства, включающие пятнадцать ремонтантных сортов, двенадцать сортов с обычным типом плодоношения и пять видов малины. Получено четкое разделение исследуемых образцов на кластеры: ремонтантных сортов и сортов с летним типом плодоношения.

3. Выявлен специфический межмикросателлитный маркерный фрагмент на признак ремонтантности у малины, длиной около 270 п.н.

Библиографический список

1. Gruber F., Knight R.L., Keep E. Fruit-breeding: berries. *Rubus L.* Sub-genera *Idaeobatus* Focke and *Eubatus* Focke. 1. Systematics. 2. Floral biology and seed formation Handbuch der Pflanzenzuchtung, 1962. 6, 477-487.
2. Jennings K. L. Raspberries and Blackberries Their Breeding, Keseases and Growth. Academic Press., London, New York, 1988. 1-230.
3. Weeden N.F. and Lamb R.C. Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1985. 110, 509-515.
4. Weising K, Nybom H., Wolff K. and Meyer W. KNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press Inc., Boca Raton Florida. USA, 1995.
5. Nybom H., School B.A. and Rogstad S.H. KNA «fingerprints» can distinguish cultivars of blackberries and raspberries. Acta Horticulturiae, 1989. 262, 305-310.
6. Parent J.-G., Fortin. M.G. and Page K. Identification of raspberry cultivars by random amplified polymorphic KNA (RAPK) analysis. Canadian Journal of Plant Science, 1993. 73, 1115-1122.
7. Graham. J., Squire. B., Marshall. B. and Harrison. R.E. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPK markers. Molecular Ecology, 1997. 6. 1001-1008.
8. Parent J.-G. and Page K. Identification of raspberry cultivars by sequence characterized amplified region KNA analysis. HortScience, 1998. 33, 140-142.
9. Zietkiewicz E., Rafakld A., LaJbuda K. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 1994. 20. 176-183.
10. Tikunov Yu.M., Khrystaleva L.I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* // Euphytica 2003, 131: 71-80.
11. Levin, I., Gilboa N., Yeselson E., Shen S., Schaffer A.A. Fgr, a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. Theor. Appl. Genet, 2000. 100. 256-262.

12. *Kanilova, T.V., Karlov, G.I.* Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 2006. 151 (1). 15-21.

13. *Wolff, K, Zietkiewicz E., Hofstra H.* Identification of chrysanthemum cultivars and stability of fingerprint patterns. *Theor Appl Genet*, 1995. 91. 439-447.

14. *Ammiraju J.S.S., Kholakia B.B., Santra K.K., Singh H., Lagu M.K., Tamhankar S.A., Khaliwal H.S., Rao V.S., Gupta V.S., Ranjekar P.K.* Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor Appl Genet*, 2001. 102. 726-732.

15. *Gupta, P.K* and *Varshney RK.* The development and use of microsatellite markers for genetic analyses and plant breeding with emphasis on bread wheat *Euphytica*, 2000. 113. 163-185.

SUMMARY

The polymorphism level of the intermicrosatellite KNA sequences of 32 raspberry (*Rubus idaeus* L.) samples has been studied. The ISSR-based dendrograms of genetic relationships has been constructed for the first time, the former consisting of 15 everbearing, 12 non-everbearing cultivars and 5 different raspberry species. As the result, the distinct division of the studied samples into everbearing cultivars and the cultivars of the summer bearing type has been achieved. Additionally, the specific intermicrosatellite fragment marker for the everbearing trait has been revealed for the first time as well.

Key words: polymorphism, raspberry, PCR.