(cc) BY

Водчиц Наталья Васильевна
аспирант
Юрченко Евгений Олегович
канд. биол. наук, доцент
Волотович Антон Анатольевич
канд. биол. наук, доцент, декан
УО «Полесский государственный университет»
г. Пинск, Республика Беларусь

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РАЗНОРОДНОСТИ СОРТОВ ГОЛУБИКИ МЕТОДОМ ISSR-МАРКИРОВАНИЯ

Аннотация*: генотип четырех сортов голубики щитковой (Vaccinium corymbosum) и двух сортов-гибридов V. angustifolium × corymbosum анализировался авторами с помощью пяти ISSR-праймеров. Четыре праймера (UBC 808, 818, 824, 867) позволили выявить 82 маркерных фрагмента, из которых общие для всех сортов составляли 19.5%. Три праймера (UBC 808, 809, 867) не использовались ранее в Беларуси для дифференциации генотипов голубики. Полученные маркеры можно использовать для паспортизации и сертификации растений рода Vaccinium.*

Ключевые слова*: заякоренные праймеры, межтандемные сегменты, микросателлиты, ПЦР.*

Введение. Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используемых для изучения многих видов организмов [5]. Развитие методов молекулярной генетики привело к появлению нового класса генетических маркеров – ДНК-маркеров, основанных на полиморфизме первичной структуры ДНК [8]. Основные задачи в исследованиях полигенной основы хозяйственно ценных признаков сельскохозяйственных растений связаны с необходимостью подбора оптимальных типов молекулярно-генетических маркеров: для идентификации сортов растений, для оценки их генеалогических

связей, для поиска маркеров, ассоциированных с желательными признаками, которые подвергаются воздействию факторов искусственного и естественного отбора [6].

Применение нейтральных молекулярных маркеров, таких как ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), сравнительно равномерно распределенных по растительному геному, позволяет одновременно определить изменчивость по группе не связанных между собой локусов, что особенно ценно для сохранения и использования генетических ресурсов [4].

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – это высокопродуктивная ягодная культура, ценность которой определяется прекрасными вкусовыми качествами плодов и содержанием в них широкого спектра биологически активных веществ, нетребовательностью к обогащению почвы, возможностью длительного пользования плантациями. В Беларуси производство ягод голубики начато в 1980 году. В последнее десятилетие активно развивается новое для республики направление промышленного плодоводства – голубиководство, так как имеются все предпосылки для высокорентабельного выращивания этой культуры на промышленной основе [9].

Целью данного исследования являлось молекулярно-генетическое маркирование и идентификация шести сортов голубики с использованием ISSR-анализа.

Материал и методы исследований. Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ).

Объектом исследования явились полугодичные растения сортов «Bluecrop’, «Northland’, «Reka’, «Denis blue’, «Northblue’ и «Bluejay’ голубики, произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

Выделение ДНК проводились CTAB-методом [11], с небольшими модификациями применительно к объекту исследования. ДНК изолировали из 0.03 г мо-

лодых тонких стеблей каждого сорта, без очистки РНК-азой. Препарат ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Растворы нуклеиновых кислот хранили при – 20°С.

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 10× ПЦР-буфер «А», 50 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP-mix, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*-ДНК полимеразы (все производства PrimeTech, Беларусь, за исключением dNTP-mix производства Carl Roth, Германия). Полимеразные цепные реакции поводились на термоциклере Biometra. Для праймеров UBC 818 и UBC 824 устанавливали следующую программу: 94°С – 30 с; 40 циклов: 94°С – 1 мин, 50°С – 1 мин, 72°С – 1 мин; 72°С – 5 мин. Для праймеров UBC 808, UBC 809 и UBC 867 устанавливали следующие режимы: 94°С – 10 мин; 35 циклов: 94°С – 1 мин, 46,5°С – 1 мин, 72°С – 2 мин; 72°С – 10 мин.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, в трис-боратном (TBE) и трис-ацетатном (TAE) буферах, при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза 50 В, в течение 160 мин. В гель наносили 6 мкл ампликона и 2 мкл загрузочного красителя состава бромфеноловый синий + глицерин. Окраска ДНК осуществлялась бромистым этидием, вносимым в гель в концентрации 5 мкг/мл, до застывания геля. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 766 bp и 1 Kb DNA Ladder (производства PrimeTech, Беларусь). Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4. Для окончательной обработки ISSR-профилей применялась программа Adobe Photoshop PS v.12, по необходимости с применением редактирования оттенков серого, инверсии изображения, выравнивания линии старта по горизонтали. Для сопоставления профилей применялся инструмент «горизонтальные направляющие».

Результаты и их обсуждение. Для анализа геномов растений применялись пять 3'-заякоренных ISSR-праймеров (табл. 1), последовательности которых были взяты из публикаций [1; 10].

Таблица 1

Характеристики микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования сортов голубики

№	*Праймер*	*Последовательность, 5'→3'*	*Температура отжига T_m, °C*	*% GC*
1.	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	46.5	53
2.	UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	46.5	53
3.	UBC 818	CACACACACACACACAG	50	53
4.	UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	50	53
5.	UBC 867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	46.5	100

Во избежание ошибочных заключений о полиморфизме было проведено 6-кратное повторение процедуры амплификации ДНК, выделенной из одного и того же источника. В полученных нами профилях учитывались только стабильные при амплификации фрагменты.

Четыре использованных праймера позволили получить для каждого исследуемого образца голубики воспроизводимые электрофоретические профили ISSR-фрагментов. Праймер UBC 809 оказался малоинформативным, т. к. в его профилях наблюдались только 1–3 полосы.

При электрофорезе основные фрагменты находилась в размерном интервале 260–2000 п.н. В целом учитывалось 82 амплифицированных фрагмента, в среднем 20.5 маркеров на праймер. Число маркеров варьировало от 14 с праймером UBC 808 до 26 с праймером UBC 818. Из общего числа ISSR-фрагментов 66 (80.5%) были полиморфны у изученных генотипов, а 16 (19.5%) – были общие для всех сортов. Самый высокий процент полиморфных ISSR-фрагментов – 19 из 21 (90.5%) был получен при амплификации ДНК с праймером UBC 867 (рис. 1). Самый низкий процент был выявлен в случае ISSR-праймера UBC 824 – 17 из 23 (73.9%) фрагментов были полиморфны (рис.2). Средний уровень полиморфизма между проанализированными сортами составлял 81.8%.

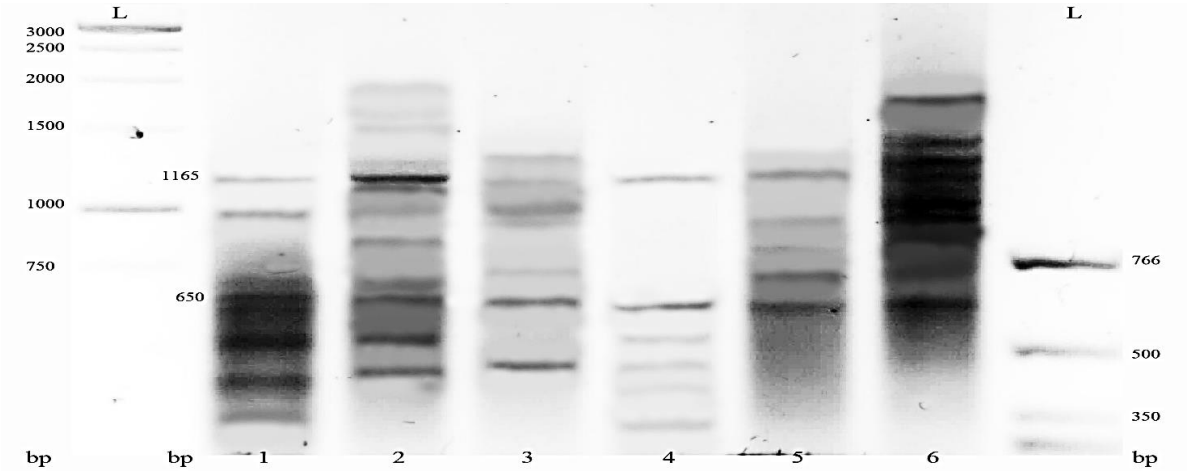

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 867. Сорта: 1 – Bluecrop; 2 – Northland; 3 – Reka; 4 – Denis blue;5 – Northblue; 6 – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

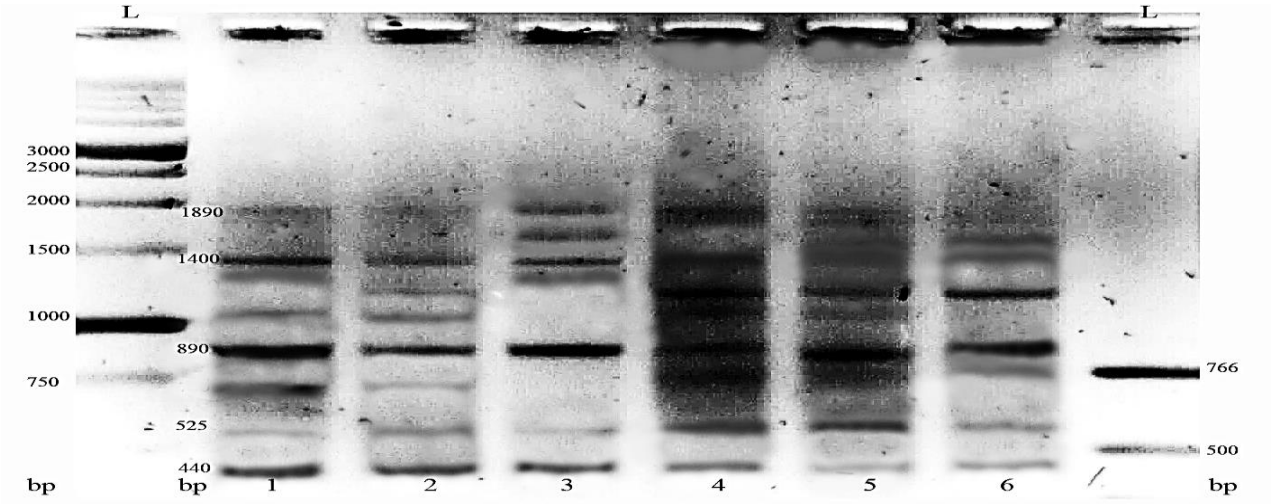

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 824. Сорта: *1 – Bluecrop*; *2 – Northland*; *3 – Reka*; *4 – Denis blue*; *5 – Northblue*; *6 – Bluejay*. *L – стандарт длин фрагментов* (*bp*)

Определенная часть (29.3%) выявленных маркеров относится к редким, то есть они встречались только один раз среди анализируемых генотипов. Все используемые праймеры смогли выявить уникальные фрагменты.

Можно отметить различия по количеству фрагментов между исследуемыми сортами «Northblue’ – 34 фрагмента (41.5% от общего числа), «Bluecrop’ и «Reka’ – 47 фрагментов (57%). Праймеры UBC 808, 818, 867 обнаружили 100%

полиморфизм между проанализированными сортами, что и позволило их различить.

Выводы. Впервые в Беларуси проведен молекулярно-генетический сравнительный анализ сортов голубики с применением только ISSR-подхода. Так как в исследования были включены растения сортов голубики высокой («Bluecrop’, «Reka’, «Denis blue’ и «Bluejay’) и два сорта от гибридизации *Vaccinium angustifolium* × *corymbosum* («Northland’ и «Northblue’), можно сделать вывод, что ISSR-маркеры применимы при исследовании как внутривидового, так и межвидового генетического полиморфизма растений.

Четыре праймера (UBC 808, UBC 818, UBC 824, UBC 867) можно использовать для паспортизации растений рода *Vaccinium*. Они показали воспроизводимые электрофоретические профили с количеством фрагментов от 14 до 26. Уровень полиморфизма варьировал от 73.9% (UBC 824) до 90.5% (UBC 867). Наибольшее число полиморфных фрагментов было обнаружено при использовании праймера UBC 867. Праймер UBC 809 оказался малорезультативным.

Полученные нами результаты частично согласуются с уже опубликованными ранее данными по ISSR-анализу сортов голубики высокой с праймерами UBC 818 и UBC 824. В целях повышения эффективности генетических исследований, полученные ранее результаты необходимо расширить за счет включения новых маркеров, обладающих иными аллелями, которые могут быть полезными для разработки селекционных программ.

Список литературы

1. Власова А.Б. Сертификация сортов голубики высокой (Vaccinium corymbosum L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров / А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8. – №2. – С. 203–210.

2. Гончарова Л.В. Молекулярно-генетические аспекты анализа сортов голубики высокой / Л.В. Гончарова, Е.В. Спиридович, О.Ю. Баранов, И.В. Маховик // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы междунар. науч.-практ. конф., посв. 80-летию Центр.

бот. сада Нац. академии наук Беларуси. Минск, 19–22 июня 2012 / Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В.В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С. 283–287.

3. Грибок Н.А. Оптимизация условий культивирования голубики высокой Vaccinium corymbosum L. in vitro / Н.А. Грибок, А.В. Зубарев, В.Н. Решетников // Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: материалы Респ. науч.-практ. конф. Минск, 17 августа 2012 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В.В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С. 23–26.

4. Грушецкая З.Е. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений / З.Е. Грушецкая [и др.] // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2013. – №3. – С. 50–56.

5. Кавцевич В.Н. Оценка генетической разнородности линий томата на основе технологии ISSR-PCR / В.Н. Кавцевич, М.Н. Шаптуренко, С.В. Кубрак, Л.А. Тарутина // Весці БДПУ. Сер. 3. – 2013. – №3. – С. 18–23.

6. Календарь Р.Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2012. – Т. 34. – №4. – С. 279–296.

7. Кильчевский А.В. Исследования по геномике растений в Беларуси / А.В. Кильчевский, Е.А. Сычева // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7, ч. 1–2. – С. 10–21.

8. Супрун И.И. Апробация микросателитных ДНК-маркеров для идентификации клоновых форм сортовой яблони / И.И. Супрун, С.Н. Артюх, С.В. Токмаков, И.В. Степанов // КубГАУ. – 2012. – №84. – С. 48–57.

9. Чижик О.В Использование репортерного GUS гена для оптимизации условий генетической трансформации Vaccinium corymbosum L. / О.В. Чижик, В.Л. Филипеня // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы междунар. науч. конф. Минск, 18–20 августа 2014 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В.В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2014. – С. 253–257.

10. Debnath S.C. Development of ISSR markers for genetic diversity studies in Vaccinium angustifolium / S.C. Debnath // Nordic J. Bot. – 2009. – Vol. 27, No. 2. – P. 141–148.

11. Dempster E.L., Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E.L. Dempster, K.V. Pryor, D. Francis, J.E. Young, H.J. Rogers // Biotechnique. – 1999. – Vol. 27, No. 1. – P. 66–68.