УДК 575.22+577.21:582.912.46

Н. В. ВОДЧИЦ

ПРИМЕНЕНИЕ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ РАСТЕНИЙ РОДА *VACCINIUM*

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
e-mail: vodna76@mail.ru

Генотип четырех сортов голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum*), двух сортов-гибридов *V. angustifolium* × *V. corymbosum* и черники обыкновенной анализировали с помощью пяти ISSR-праймеров (UBC 808, 818, 824, 845, 867), с помощью которых было выявлено 128 маркерных фрагмента. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики 22,7 % были общими для всех сортов. При одинаковом наборе праймеров у черники с голубикой совпало 68,0 % мономорфных фрагментов. Полученные маркеры можно использовать для паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium*.

Ключевые слова: заякоренные праймеры, межтандемные сегменты, микросателлиты, маркеры.

N. V. VODCHITS

THE ASSESSMENT OF ISSR MARKERS APPLICATION TO GENETIC TYPING AND CERTIFICATION OF *VACCINIUM* PLANTS

Paleski State University, Pinsk, Belarus, e-mail: vodna76@mail.ru

Genotypes of four *Vaccinium corymbosum* cultivars and two cultivars of *V. angustifolium* × *V. corymbosum*, along with wild individuals of *V. myrtillus,* were analyzed using five inter-simple sequence repeat (ISSR) primers (UBC 808, 818, 824, 845, 867). The primers produced 128 bands on the whole; 22.7 % of the bands were common to all blueberry cultivars. In the case of *V. myrtillus*, 68.0 % of its bands were identical with monomorphic bands in cultivated blueberries. The obtained sets of consistent bands can be considered as cultivar passports and they can be used for *Vaccinium* cultivars certification. Cluster analysis of genetic similarity between cultivars, based on ISSR profiles, is provided.

Keywords: anchored primers, microsatellites, markers.

Введение. Активное развитие голубиководства в Республике Беларусь началось в начале XXI в., после того как вступили в стадию полного плодоношения первые промышленные насаждения данной культуры. Этому предшествовала исследовательская работа по определению наиболее пригодных и хозяйственно ценных сортов с определенным экологическим потенциалом [1]. С увеличением числа новых сортов все более важным становится процесс регистрации культурного сорта, его сертификации и защиты авторских прав селекционеров. Генетическая паспортизация представляет собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью морфологических или молекулярных маркеров [2]. В настоящее время разработано большое количество типов молекулярно-генетических маркеров [3]. Метод ISSR основан на анализе участков ДНК, расположенных между микросателлитными повторами, диспергированными по всему растительному геному, и обеспечивает воспроизводимый результат при детекции большого числа локусов [4].

Цель данного исследования − ДНК-паспортизация и сертификация ряда сортов голубики и черники обыкновенной на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов с целью идентификации сортов, проверки чистосортности маточных насаждений и посадочного материала.

Материалы и методы исследований. Исследования 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 голубики щитковой – *Vaccinium corymbosum* L. (сорта Bluecrop, Northland, Reka, Denis blue, Northblue и Bluejay), произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ. Кроме того, для сравнения в исследование был включен дикорастущий вид брусничных − черника обыкновенная (*V. myrtillus* L.), произрастающая в лесах Пинского района.

Выделение ДНК проводили CTAB-методом, с небольшими модификациями применительно к объекту исследования [5, 6]. ДНК изолировали из 0,03 г молодых тонких стеблей каждого сорта, без очистки РНКазой. Препарат ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Растворы нуклеиновых кислот хранили при −20 °C.

Реакционная смесь для проведения ПЦР (объем 25 мкл) включала следующие компоненты: 10 × ПЦР-буфер «А», 50 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 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 проводили в термоциклере Biometra. Для праймеров UBC 818, UBC 824 и UBC 845 устанавливали следующую программу: 94 °C – 30 с; 94 °C – 1 мин, 50 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин (40 циклов); 72 °C – 5 мин. Для праймеров UBC 808 и UBC 867 устанавливали следующие режимы: 94 °C – 10 мин; 94 °C – 1 мин, 46,5 °C – 1 мин, 72 °C – 2 мин (35 циклов); 72 °C – 10 мин.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 %-ном агарозном геле [7]. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 100 bp Plus DNA Ladder (производства Thermo Scientific, Литва), 766 bp и 1 Kb DNA Ladder (производства PrimeTech, Беларусь).

Для анализа геномов растений применяли пять 3′-заякоренных ISSR-праймеров (табл. 1), последовательности которых были взяты из работ [8−10].

Т а б л и ц а 1. **Характеристики микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования сортов голубики**

Праймер	Последовательность 5′→3′	Температура отжига T_m, °C	GC, %
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	46,5	53
UBC 818	CACACACACACACACAG	50	53
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	50	53
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	50	50
UBC 867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	46,5	100

П р и м е ч а н и е. R равен A или G.

Для визуализации результатов электрофореза использовали прибор гель-документирования Quantum ST4 [7]. Уровень полиморфизма определяли как отношение числа полиморфных локусов к общему числу выявленных локусов у сортов голубики, детектируемых с помощью каждого праймера, и выражали в процентах.

Для количественной оценки полиморфизма полученные данные представляли в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в электрофоретических спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривали как состояние 1 или 0 соответственно. Статистическую обработку результатов и построение дендрограмм осуществляли с помощью кластерного анализа методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), в программе STATISTICA 6.0. В данном методе расстояние между двумя различными кластерами вычисляется как среднее расстояние между всеми парами объектов в них [11].

Результаты и их обсуждение. Использованные ISSR-праймеры содержали последовательности ди- и тринуклеотидных микросателлитных мотивов с добавлением якорного нуклеотида на 3′-конце (табл. 1). Они выявили для каждого исследуемого образца воспроизводимые специфичные электрофоретические спектры ISSR-фрагментов.

Во избежание ошибочных заключений о полиморфизме проведено 6-кратное повторение процедуры амплификации ДНК, выделенной из одного и того же источника. В исследованных нами профилях учитывались только стабильные при амплификации фрагменты. Данные о спектрах ампликонов, полученных с помощью ISSR-праймеров, приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. **Характеристика ISSR-спектров ампликонов растений рода *Vaccinium***

Праймер	Число маркеров		К-во полиморфных маркеров	Уровень полиморфизма, %	Число уникальных маркеров		Границы длин локусов в спектре, п. н.
	Голубика	Черника	Голубика	Голубика	Голубика	Черника	
UBC 808	17	10	13	76.5	4	4	260–1065
UBC 818	24	16	18	75.0	9	7	240–2000
UBC 824	24	14	17	70.8	6	1	440–1890
UBC 845	24	10	19	79.2	5	3	230–1600
UBC 867	21	8	18	85.7	8	3	350–1875

При электрофорезе основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 230–2000 п. н. В целом учитывалось 128 амплифицированных фрагмента – 110 для голубики (в среднем 22,0 маркера на праймер) и 58 – для черники (в среднем 11,6 маркера на праймер). Число маркеров для голубики варьировалось от 17 с праймером UBC 808 до 24 с праймерами UBC 818, 824 и 845, для черники – от 8 с праймером UBC 867 до 16 с праймером UBC 818. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики 85 (77,3 %) были полиморфны у изученных генотипов, а 25 (22,7 %) были общими для всех сортов; 17 (68,0 %) локусов, детектируемых у черники, совпадали с мономорфными фрагментами голубики. Самый высокий процент полиморфных ISSR-фрагментов – 85,7 % (у 18 из 21) − получен при амплификации ДНК с праймером UBC 867 (рис. 1). Самый низкий процент выявлен в случае праймера UBC 824 – 70,8 % (17 из 24) фрагментов были полиморфны (рис. 2). Средний уровень полиморфизма между исследуемыми сортами составлял 77,4 %.

Определенная часть (32 (25,0 %)) выявленных маркеров у голубики относится к редким, т. е. они встречались только один раз среди анализируемых генотипов. Отношение числа генотип-специфических маркеров к общему числу ампликонов у 14,1 % *V. myrtillus* составило 18. С помощью

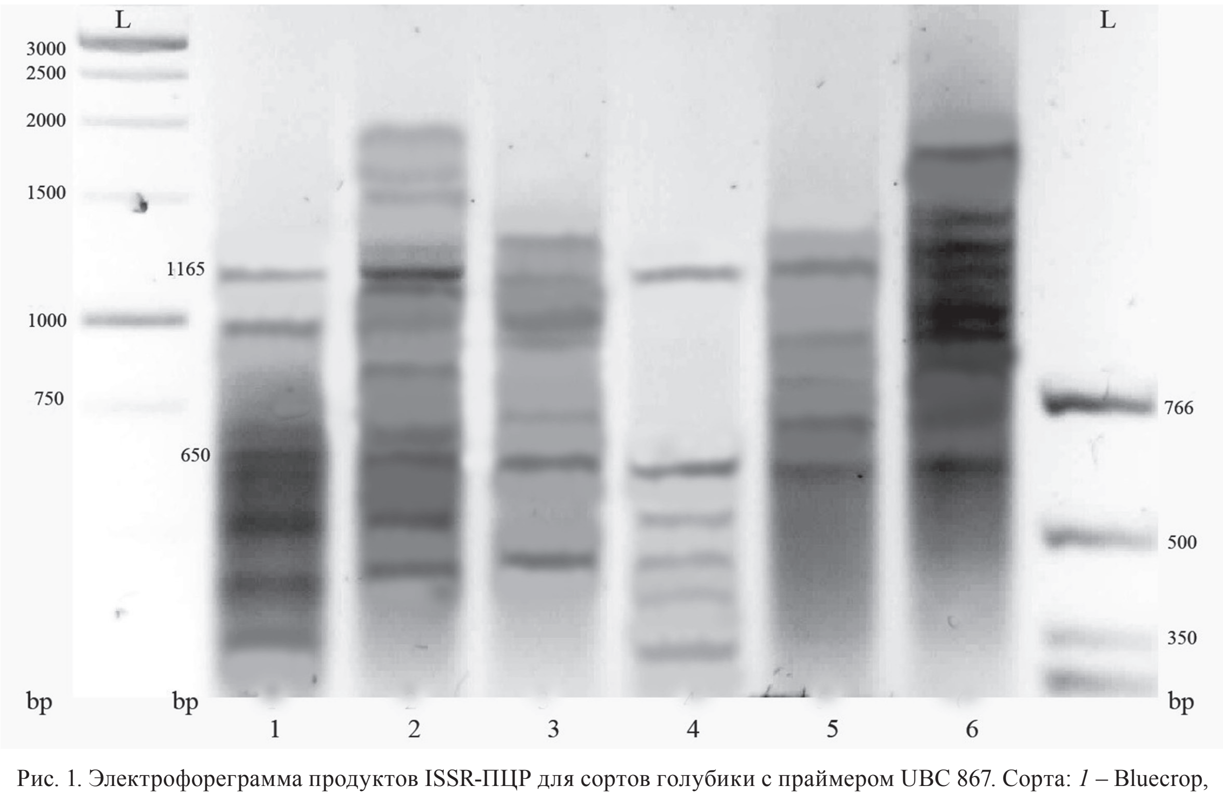

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 867. Сорта: *1* – Bluecrop, *2* – Northland, *3* – Reka, *4* – Denis blue, *5* – Northblue, *6* – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

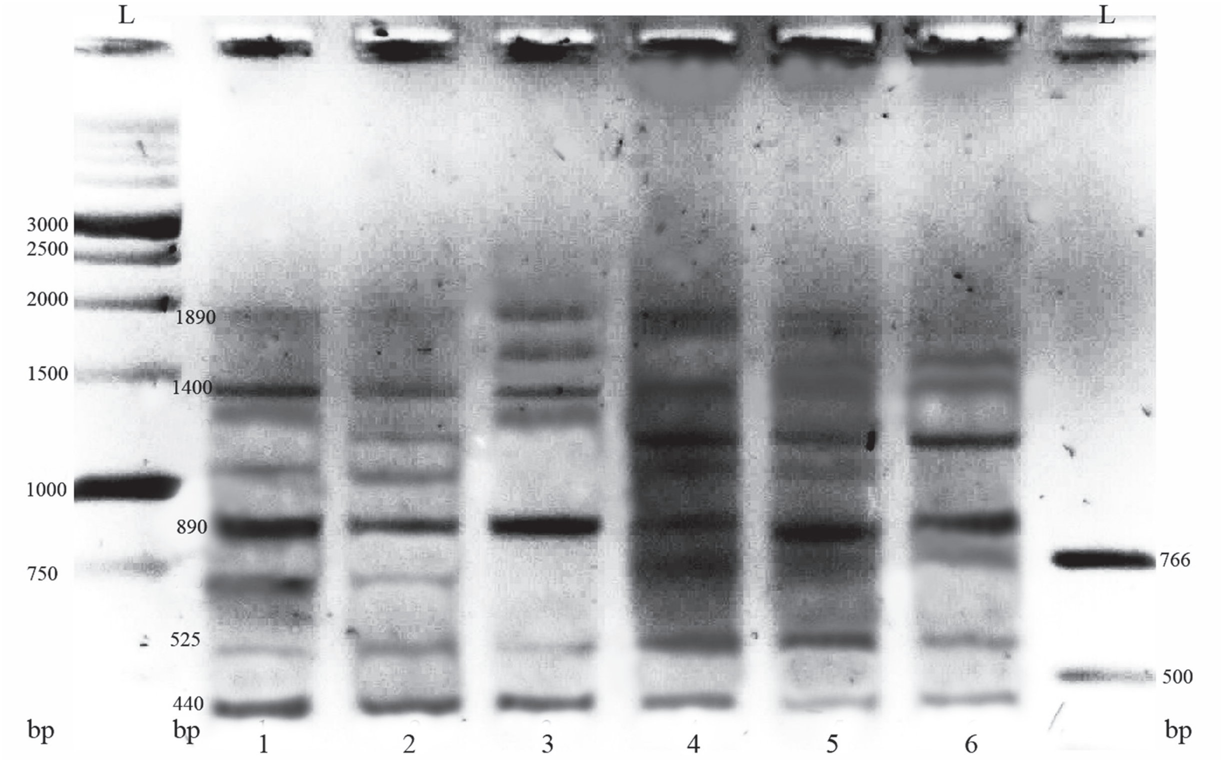

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 824. Сорта: *1* – Bluecrop, *2* – Northland, *3* – Reka, *4* – Denis blue, *5* – Northblue, *6* – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

исследуемых праймеров выявлены уникальные фрагменты, которые в дальнейшем можно использовать для создания SCAR-маркеров.

У всех праймеров обнаружен 100 %-ный полиморфизм между проанализированными сортами, что и позволило их различить (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. **Аллельный полиморфизм ISSR-маркеров растений рода *Vaccinium***

Сорт	Праймер/локусы				
	UBC 818	UBC 824	UBC 808	UBC 845	UBC 867
Bluecrop	*300*, *450*, *500*, 550, 580, *615*, 660, *790*, 880, 930, 1000 *1060*, **1180, 1290**	*440*, *525*, 630, *670*, *715*, **810**, 830, *890*, 990, 1050, *1400*, **1430**, 1500, 1655, 1790, *1890*	335, 390, 405, *445*, **475**, *510, 685, 760*, **840**	*325, 410, 505*, 530, *705*, 730, *895*, **1005**, 1250	350, 430, **455**, **540**, 610, *650*, **710**, 800, *1165*
Northland	*300*, 330, **400**, *450*, 500, 550, 580, *615*, 660, 750, *790*, 880, 930, *1060*, 1260, ***1590***, 2000	*440*, *525*, *670*, *715*, *890*, 1050, 1110, 1150, 1210, *1400*, 1655, *1890*	**260**, 335, 405, *445*, *510*, 560, *685*, *760*, 820	230, *325*, 360, *410*, *505*, 530, 600, *705*, 730, *895*, 1080, 1250, 1600	470, *650*, 745, 800, 855, 965, 1070, *1165*, 1265, **1510, 1630, 1820**
Reka	*300*, 330, *450, 500*, *550*, *615*, 660, 750, *790*,880, 930, 1000, *1060*, 1260, ***1330***	*440, 525, 670, 715*, 830, *890*, 1050, 1150, 1280, *1400*, 1500, 1750, 1790, *1890*	290, 335, 390, 405, *445, 510*, 560, 605, *685, 760*, 820, 870, 940	310, *325, 410*, 460, *505*, 640, *705*, 815, *895*, 935, 1080, 1200, 1600	470, 610, *650*, 800, 855, 965, 1070, *1165*, 1265, 1420
Denis blue	*300*, 330, *450*, *500*, 550, 580, *615*, 660, *790*, 880, *1060*, 1260, **1440**, **1690**, 2000	*440, 525, 670, 715*, *890*, 1050, 1110, 1210, *1400*, 1655, 1750, *1890*	290, 335, 405, *445*, *510*, 560, 605, *685*, *760*, 820, **1065**	230, 310, *325*, 360, *410*, 460, 505, 530, **570**, 640, *705, 895*, 935, **1155**, 1200	350, 430, 470, **555**, *650*, 745, 1070, *1165*

Сорт	Праймер/локусы				
	UBC 818	UBC 824	UBC 808	UBC 845	UBC 867
Northblue	*300, 450, 500*, 550, *615*, 660, *790, 1060*	*440, 525*, 585, *670, 715, 890*, **945, 1090**, 1210, 1280, *1400, 1890*	290, 390, *445*, **510**, 560, 605, *685, 760*, 820, 870, 940	*325, 410*, 460, *505*, 600, 640, *705*, 730, *895*, 1080, 1200, 1250	**650**, 745, 800, 965, 1070, *1165*
Bluejay	**240**, *300*, 330, *375, 450, 500*, 580, *615, 790*, 930, *1060*	*440, 525*, 585, *670, 715*, 830, *890*, 1110, 1210, *1400*, 1790, *1890*	290, *445, 510, 685, 760*, 870, 940	230, **250**, *325*, 360, *410, 505*, 640, *705*, 815, *895*, **1040**, 1250	*650*, 745, 800, 1070, *1165*, 1265, 1420, **1720**
Черника	*300*, 330, **380**, *450*, **465, 530**, 660, **680**, 790, 880, **960**, 1060, **1210, 1330**, 1440, **1490**	*440, 525*, 670, **740**, 830, *890*, 1050, 1110, 1210, *1400*, 1655, 1750, *1890*	260, 335, 390, 475, 560, **620, 720**, *760*, **795, 900**	310, **380**, *410, 505*, 600, *705*, 935, **1055, 1115**, 1250	350, 555, *650*, 710, **835, 925**, *1165*, **1875**

П р и м е ч а н и е. Жирным шрифтом обозначены уникальные фрагменты; курсивом – мономорфные фрагменты; локусы, совпавшие с таковыми в других работах, опубликованных ранее, подчеркнуты.

Наши результаты частично согласуются с полученными ранее в другой лаборатории данными по ISSR-анализу сортов голубики высокой с праймерами UBC 818 и UBC 824 [8].

На основании комплекса данных о частоте встречаемости аллелей и о размере амплифицированных последовательностей для каждой аллели проведена оценка степени генетического сходства изученных генотипов.

Согласно результатам, представленным на дендрограмме, как и следовало ожидать, наиболее удаленной от сортов голубики оказалась черника обыкновенная из естественных популяций (рис. 3), для которой дистанции, выраженные величиной, обратной коэффициенту Пирсона, находились в диапазоне от 0,88 (по отношению к сорту Denis blue) до 1 (по отношению к сорту Reka).

Генотипы сортов голубики, за исключением сорта Bluecrop, сформировали два кластера, т. е. группы с меньшей внутригрупповой изменчивостью признаков по сравнению с изменчивостью в совокупности. В первый вошли сорта Nortland и Denis blue, во второй – сорта Reka, Northblue и Bluejay. Сорт Bluecrop отличался от геномов исследуемых сортов голубики,

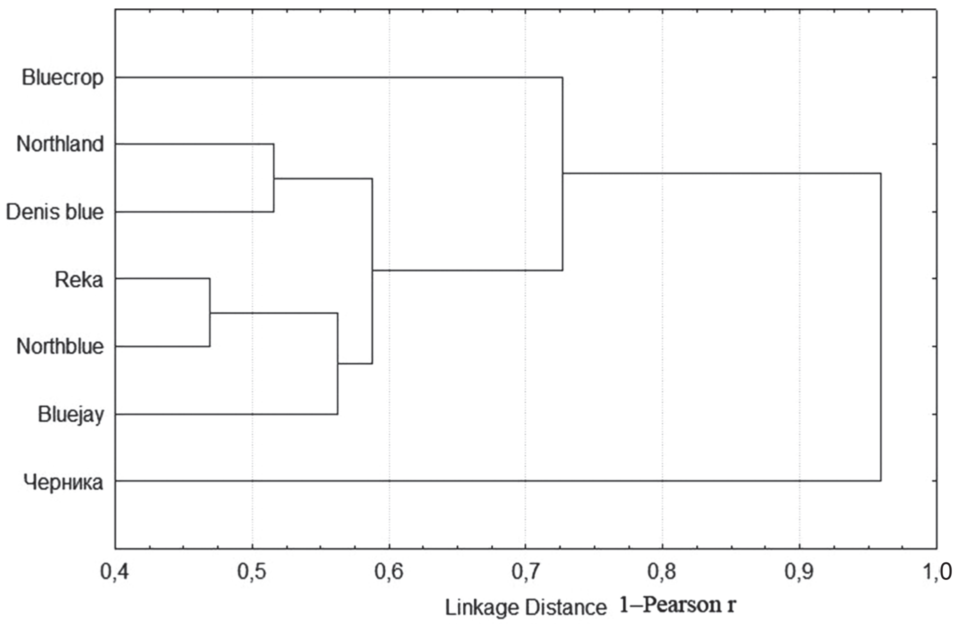

Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства, основанная на данных ISSR-анализа сортов голубики и черники обыкновенной

и коэффициент генетической дистанции его от других сортов составил от 0,70 до 0,75. Сорт голубики Bluecrop и черника обыкновенная, обладающие наибольшим количеством уникальных ISSR-локусов, образовали отдельные ветви дендрограммы. Генетическое расстояние между изученными представителями голубики варьировалось от 0,47 (между сортами Reka и Northblue) до 0,75 (между сортами Bluecrop и Denis blue; Bluecrop и Bluejay). Следует отметить, что межвидовые гибриды *V. corymbosum* и *V. angustifolium* L. – Northblue, Northland распределились в разные группы, а генетическое расстояние между ними составило 0,55.

Можно предположить, что вошедшие в отдельные кластеры сорта – {Northland, Denis blue}, а также {Reka, Northblue, Bluejay} – имеют генотипически сходные родительские формы.

Заключение. Впервые в Беларуси проведен молекулярно-генетический сравнительный анализ сортов голубики с применением только ISSR-подхода. Исследование растений четырех сортов *V. corymbosum*, двух сортов от гибридизации – *V. angustifolium* × *V. corymbosum* (Northland и Northblue) и *V. myrtillus* – показало наличие мономорфных для всех ISSR-фрагментов. Следовательно, можно сделать вывод, что ISSR-маркеры применимы при исследовании как внутривидового, так и межвидового генетического полиморфизма растений. При одинаковом наборе праймеров у черники с голубикой совпало 68,0 % мономорфных фрагментов, а число уникальных маркеров для черники составило 14,1 % относительно всех выделенных фрагментов. Это доказывает, что голубика и черника являются отдаленными видами одного рода и семейства.

На основании полученных данных ISSR-спектров и проведенного кластерного анализа получены данные о генетическом родстве исследованных генотипов растений рода *Vaccinium*.

В целях повышения эффективности генетических исследований полученные ранее результаты необходимо расширить за счет включения новых маркеров, обладающих иными аллелями, которые могут быть полезны для разработки селекционных программ.

Список использованной литературы

1. *Титок, В. В.* Голубика высокорослая – инновационная культура премиум-класса / В. В. Титок, А. А. Веевник, Н. Б. Павловский // Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск, 17 авг. 2012 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В. В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С. 5–8.

2. *Бобошина, И. В.* Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК / И. В. Бобошина, С. В. Боронникова // Фунд. исслед. – 2013. – № 6 (1). – С. 92–97.

3. *Карлов, Г. И.* Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.00.23 / Г. И. Карлов; Рос. гос. аграр. ун-т. – М., 2009. – 50 с.

4. Оценка генетической разнородности линий томата на основе технологии ISSR-PCR / В. Н. Кавцевич [и др.] // Вес. БДПУ. Сер. 3. – 2013. – № 3. – С. 18–23.

5. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц [и др.] // Весн. Палеск. дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўч. навук. – 2014. – № 2. – С. 25–30.

6. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // Biotechnique. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 66–68.

7. *Водчиц, Н. В.* Выявление генетической разнородности сортов голубики методом ISSR-маркирования / Н. В. Водчиц, Е. О. Юрченко, А. А. Волотович // Инновационные технологии в науке и образовании: материалы IV Междунар. науч.-практ. конф., Чебоксары, 18 дек. 2015 г. / редкол.: О. Н. Широков (отв. ред.) [и др.]. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2015. – № 4 (4). – С. 15–19.

8. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров / А. Б. Власова [и др.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 203–210.

9. *Debnath, S. C.* Development of ISSR markers for genetic diversity studies in *Vaccinium angustifolium* / S. C. Debnath // Nordic J. Bot. – 2009. – Vol. 27, N 2. – P. 141–148.

10. Application of inter-simple sequence repeats relative to simple sequence repeats as a molecular marker system for indexing blueberry cultivars / M. Garriga [et al.] // Can. J. Plant Sci. – 2013. – Vol. 93, N 5. – P. 913–921.

11. *Леончик, Е. Ю.* Кластерный анализ: терминология, методы, задачи / Е. Ю. Леончик; ОНУ им. И. И. Мечникова, ИМЭМ . – 2-е изд., испр. и доп. – Одесса, 2011. – 67 с.

Поступила в редакцию 23.05.2016