

В.Н. Кавцевич, кандидат биологических наук,
доцент кафедры ботаники и основ с.-х. БГПУ;
М.Н. Шаптуренко, кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
С.В. Кубрак, научный сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
Л.А.Тарутина, кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РАЗНОРОДНОСТИ ЛИНИЙ ТОМАТА НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ISSR-PCR

Введение. Успешная селекционная работа по созданию гетерозисных гибридов томата кистевого морфотипа, обладающих повышенной дружностью созревания плодов в пределах одной кисти, высокой товарностью плодов, отсутствием залома плодоножки, устойчивостью плодов к перезреванию, повышенным содержанием свободных органических кислот и витамина С возможна не только при использовании традиционных методов селекции, но также предполагает привлечение новых методов, позволяющих совершенствовать и ускорять селекционный процесс.

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, что способствовало появлению нового направления – маркер-сопутствующей селекции. Это методы, при которых отбор нужных признаков и индивидуумов ведется не по морфотипу растений, а непосредственно по генотипу. Эффективность молекулярно-генетического анализа основана на высокой чувствительности и возможности использования на различных организмах, в том числе и на видах с мало изученными геномами. Технологии ДНК-фингерпринтинга могут быть особенно полезными для анализа овощных культур с узкой генетической базой, подобно как у томата. В ряде исследований были изучены генетические различия форм томата с использованием молекулярных методов, и полученная информация свидетельствует о сравнительно невысоком варьировании признаков, что объясняется самоопыляющейся природой культуры томата, сочетающейся с ее узкой генетической базой [1, 2]. Работы, выполненные Smulders et al. (1997) [3], He et al. (2003) [4], Frary et al. (2005) [5], Garcia-Martinez et al. (2006) [6] и Song et al. (2006) [7] подтвердили полезность маркерных технологий в селекционных программах культуры томата для исследования генетической дивергенции и вариабельности в геноме *Solanum*. Использование молекулярных маркеров может облегчить селекцию томата при улучшении таких признаков, как урожайность, качество плодов, устойчивость к болезням.

В селекции на гетерозис у томата, как культуры с автогамным типом опыления, особое значение имеет стратегия отбора исходного материала, который должен обладать достаточным уровнем дивергенции, чтобы обеспечить успех при создании высокопродуктивных гибридов. Поскольку, согласно генетической концепции гетерозиса, значительный вклад в формирование гетерозисного эффекта вносят гетерозиготные локусы [8]. Генетическое расстояние определяет не только продуктивность F_1 , но и уровень дивергенции, на основании которого делают прогноз в возможности дальнейшего использования гибридного материала для получения насыщающих скрещиваний, двойных гибридов и т.д.

Идентификация образцов растений является одной из основных областей применения молекулярно-генетических маркеров. Предполагается, что в пределах растительных семейств фрагменты ДНК с одинаковой молекулярной массой и интенсивностью представляют те же самые геномные фрагменты. Генетические дистанции внутри группы анализируемых форм определяют по числу электрофоретических полос на профиле: наличие их у одних образцов и отсутствие у других свидетельствует об отличиях данных образцов, т.е. полиморфности генетического материала. Разделяющиеся полосы – это инструмент, который используется для оценки уровня подобия между многополосными профилями ДНК [9]. Яркие полосы образуются в результате амплификации фрагментов, фланги которых полностью комплементарны последовательностям праймера, тусклые же полосы появляются в результате ошибок отжига праймера. Чем больше таких ошибок, тем хуже амплифицируются RAPD-продукты, тем хуже их воспроизводить при изменении условий реакции. Обычно праймеры, использование которых позволяет выявить межсортовую дифференциацию у одного вида растений, оказываются эффективными у сортов близкородственных и даже дальних видов [6].

В настоящее время в селекционный процесс привлекаются сорта томата, а также промышленные гибриды старого и нового поколения, так как они представляют собой широкий диапазон доступной для использования зародышевой плазмы. Селекционная ценность этих форм как компонентов гибридизации определяется оценкой их генетического потенциала, поскольку подбор компонентов скрещивания возможен только в популяции, обладающей достаточно разнородной структурой исходных родительских компонентов, которая может обеспечить максимальный гетерозисный эффект у гибридов первого поколения.

Объекты и методы исследования

В данные исследования были включены районированные сорта и современные перспективные образцы культивируемых сортов и гибридов томата ближнего и дальнего зарубежья, включая кистевидные формы с соответствующими фенотипическими признаками.

В качестве исходного материала были использованы 24 линии, отобранные из сортов/гибридов отечественной и зарубежной селекции: Л-50 – Сибирское чудо (рос.), Л-51 – Голдкроун, Л-52 – Педро F1 (чешск.), Л-53 – Харцфойер F1 (нем.), Л-54 – Искушение (Pokusa – пол.), Л-55 – Шарада (нем.), Л-56 – Кмициц (пол.), Л-57 – Maskotka, Л-58 – Галера (чеш.), Л-59 – Благовест F1, Л-60 – Инфинити F1, Л-61 – Кмичич (пол.), Л-62 – Kmicic (пол.), Л-63 – Romus (V7753), Л-64 – Koralik (пол.), Л-65 – Lovett № 859367, Л-67 – Moneymaker, Л-68 – Citrina (чеш.), Л-69 – Adam F1 (пол.), Л-70 – Moneymaker (амер.), четыре последних белорусской селекции 2, Л-71 – Утро раннее, Л-72 – Райское наслаждение, Л-73 – 3521 и Л-74 – 1008.

Агротехника возделывания растений томата применялась в соответствии с общепринятыми рекомендациями для тепличных хозяйств [10]. Способ посадки ленточный: расстояние между растениями в ряду 40 см, между рядами – 60 см, между лентами – 80 см, повторность опыта трехкратная.

Полиморфизм между образцами томата оценивали при помощи ISSR-PCR метода, который обладает высокой разрешающей способностью для оценки отношений между сортами и гибридами культуры томата. 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.

Для исследований на основании литературных данных [L.Xinjuan et. al., 2009; A.Wolfe, 1998] были отобраны высокоэффективные праймеры (таблица 1), которые использовались нами для анализа геномов растений.

Выделение тотальной ДНК из листьев растений проводили с использованием DNA Purification Kit (Fermentas). Критерием чистоты и нативности выделенного препарата ДНК служил типичный спектр поглощения в диапазоне 200-300 н.м. с соотношением ОП230/ОП260 = 0.42; ОП280/ОП260 = 0.52.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Biometra», используя реактивы производства «Диалад» (Россия) для приготовления реакционной смеси, нуклеотиды «Fermentas» (Германия), праймеры – производства «Праймтех» (Беларусь). Реакционная смесь объемом 20 µl содержала: 0.2 mM каждого dNTP, 10 pM праймера, 2.5 mM MgCl₂, 20 ng ДНК, 0.2ед. Taq-полимеразы в 1× буфере.

ISSR PCR (Inter Simple Sequence Repeat)

Температурный профиль реакции:

иницирующая денатурация - 940С, 4 мин;

30 циклов - 940С 1 мин; 48-550С (в зависимости T_{пл} праймера) 1 мин; 720С, 1 мин;

заключительная элонгация - 720С, 7 мин.

Продукты амплификации разделяли в 1.6-1.8% агарозном геле, окрашивали интеркалирующим в ДНК красителем - бромидом этидия и фотодокументировали в УФ-свете.

Таблица 1 – Нуклеотидный состав праймеров, использованных для ISSR PCR

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
ISSR-4	(AC)8AG
ISSR-8	(ATG)6
ISSR-9	(CTC)6
ISSR-9a	(CTC)6AA
ISSR-10	(GAA)6
ISSR-17	(GACA)4
ISSR-23	(AC)8TA
ISSR-22	(AC)8AA
ISSR-24	(AC)8TC

Для определения генетических дистанций между изучаемыми образцами проводили подсчет полиморфных (несовпадающих) полос по результатам нескольких праймеров, и на основании многомерной матрицы строили график – дендрограмму, которая демонстрирует уровень генетического сходства или различия между испытываемыми генотипами, а также группирует схожие между собой генотипы в отдельные кластеры. Генетические дистанции рассчитывали по Nei M. [11]. Кластеризацию экспериментального материала осуществляли методом UPGMA с помощью программного пакета Treecorw (version 1.3b). Достоверность проведенной кластеризации оценивали на основе Bootstrap-анализа.

Результаты и обсуждение. Характер и степень изменчивости анализировали в отношении праймера и образца томата.

Генетические взаимоотношения между 24 образцами оценивали на основании анализа полиморфизма меж микросателлитных локусов исследуемых геномов. Каждый ISSR-фрагмент рассматривали как генетический локус. В каждом локусе определяли количество четких, ярких воспроизводимых полос, которые рассматривали как доминантные аллели, а отсутствие полос, как рецессивные. В работе использовали 9 ISSR праймеров: ISSR-4, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-9a, ISSR-10, ISSR-17, ISSR-22, ISSR-23, ISSR-24, из которых 6 ISSR-4, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-10, ISSR-22, ISSR-24 давали мономорфные спектры, которые не позволяли дифференцировать генотипы. Наибольшей информативностью обладали 3 праймера: ISSR-9a, ISSR-17, ISSR-23, которые при исследовании ДНК 24 образцов томата дали 72 ампликона, полученных в результате ПЦР, полиморфными оказались 17 локусов. Полученные ISSR-фингерпринтинги, генерируемые праймерами ISSR-9a, ISSR-17, ISSR-23 представлены на рисунках 1.2 и 3.

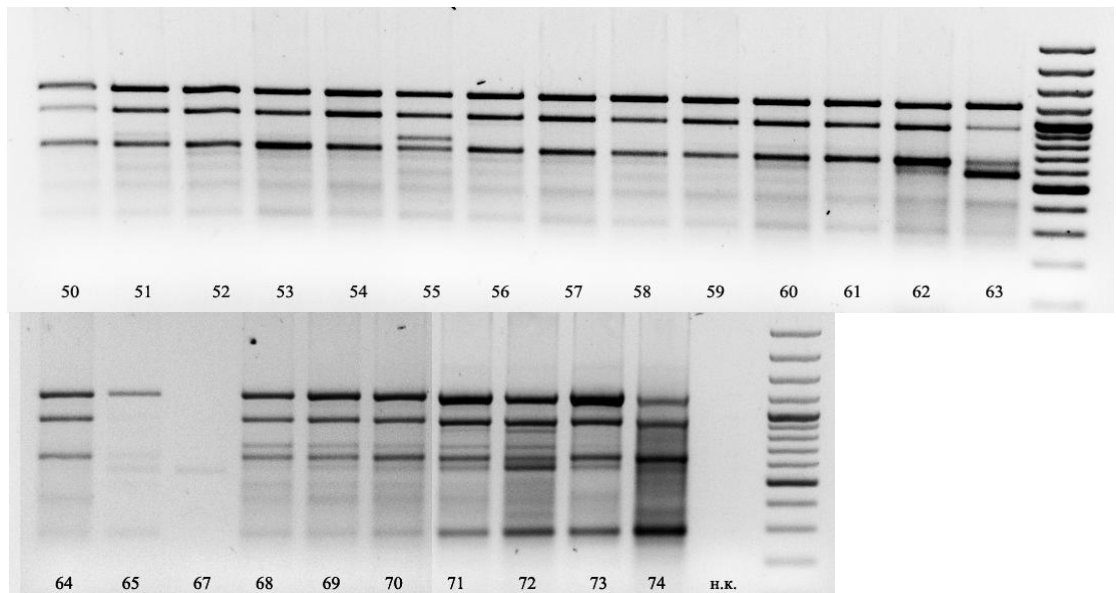


Рисунок 1 – Фингерпринтинг амплификации с праймером ISSR-23

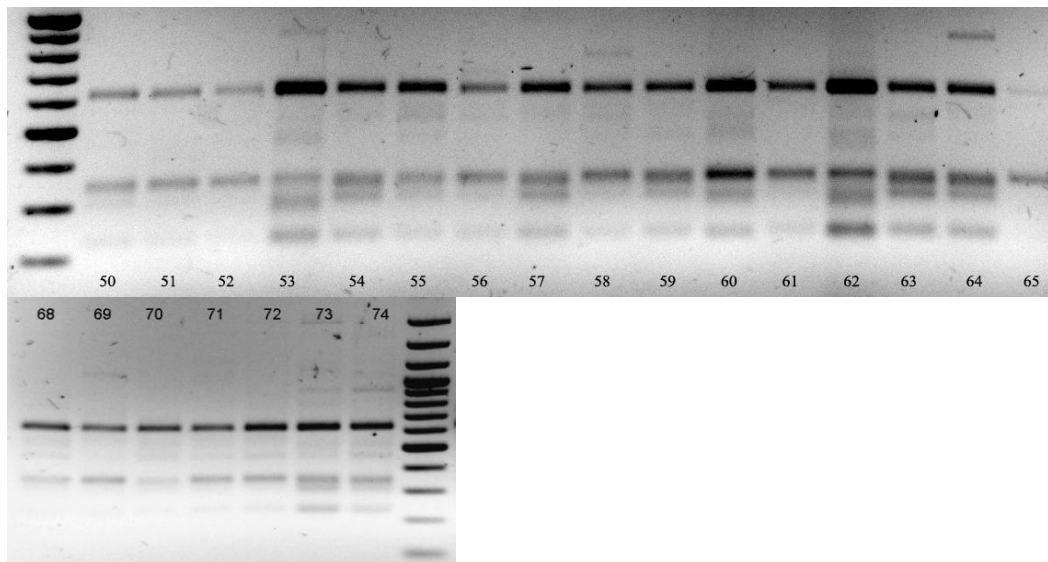


Рисунок 2 – Фингерпринтинг амплификации с праймером ISSR-9a

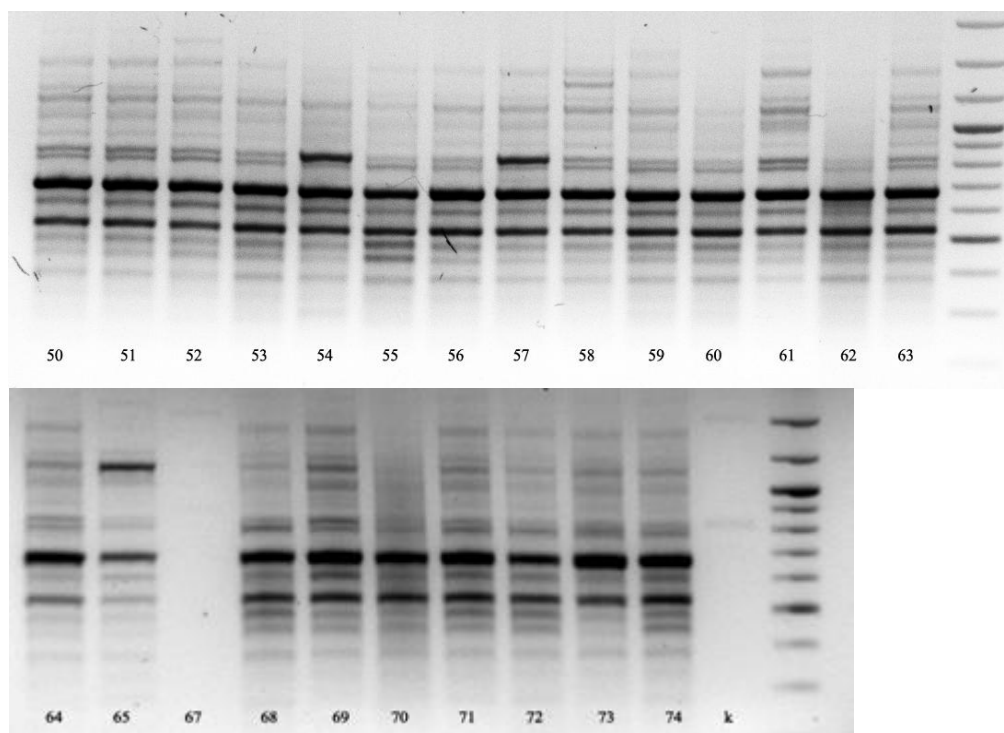


Рисунок 3 – Фингерпринтинг амплификации с праймером ISSR-17

Основная зона разделения фрагментов расположена в диапазоне от 250 до 1400 п.н. Число полос на праймер колебалось от 10 до 14, со средним значением 11,67. Число полиморфных полос, полученных при амплификации ДНК с каждым из использованных праймеров колебалось от 3 (ISSR-17) до 8 (ISSR-9a), со средним значением 5,67. Хотя процент полиморфизма, рассчитанный как отношение числа полиморфных полос к общему числу ампликонов, колебался от 21,4 до 72,7 средний уровень полиморфизма составлял 51,2 (таблица 2).

Таблица 2 – Анализ полиморфизма ампликонов, полученных на линиях томата методом ISSR-анализа

Название праймера	Общее число детектируемых полос	Число полиморфных полос	Уровень полиморфизма, %
ISSR-9a	11	8	72,7
ISSR-17	14	3	21,4
ISSR-23	10	6	60,0
Среднее значение	11,67	5,67	51,2

Наибольшее число полиморфных локусов наблюдалось у линий Л-62 (Kmicic) и Л-73 (№3521) и составляло 35% от общего количества фрагментов, детектируемых у данных образцов. Минимальное количество полиморфных фракций отмечено у линий Л-51 (Голдкроун), Л-52 (Педро), Л-55 (Шарада) и Л-57 (Maskotka), отобранных из современных гибридов немецкой, чешской и польской селекции. У линии Л-59 (Благовест) не выявлено полиморфных фракций при используемом наборе праймеров. Варьирование межлинейного полиморфизма по праймерам составило от 0% до 67,0%, со средним значением 32,7%.

Результаты анализа фиксированных рецессивных локусов у исследуемых образцов также указывали на низкую генетическую вариабельность. Если рассматривать отсутствие полосы в локусе как фиксацию рецессивной аллели в образце, то можно оценить долю рецессивных ISSR-локусов в общем количестве полиморфных фракций. Количество фиксированных рецессивных локусов по отношению к общему количеству полиморфных локусов, в зависимости от линии, изменяясь от 23,5-29,4% у линий Л-74 (1008) и Л-73 (3521) до 64,7-70,6% у линий Л-61 (Кмичич), Л-67 (Moneymaker) и Л-65 (Lovett), со средним значением по коллекции 49,0%.

UPGMA-дендрограмма является хорошим индикатором генетических отличий, существующих между образцами томата. Чтобы лучше понять генетические отношения среди анализируемых образцов томата был выполнен кластерный анализ на основе коэффициентов подобия генотипированных 72 ISSR-полос с помощью программы TREECONW.

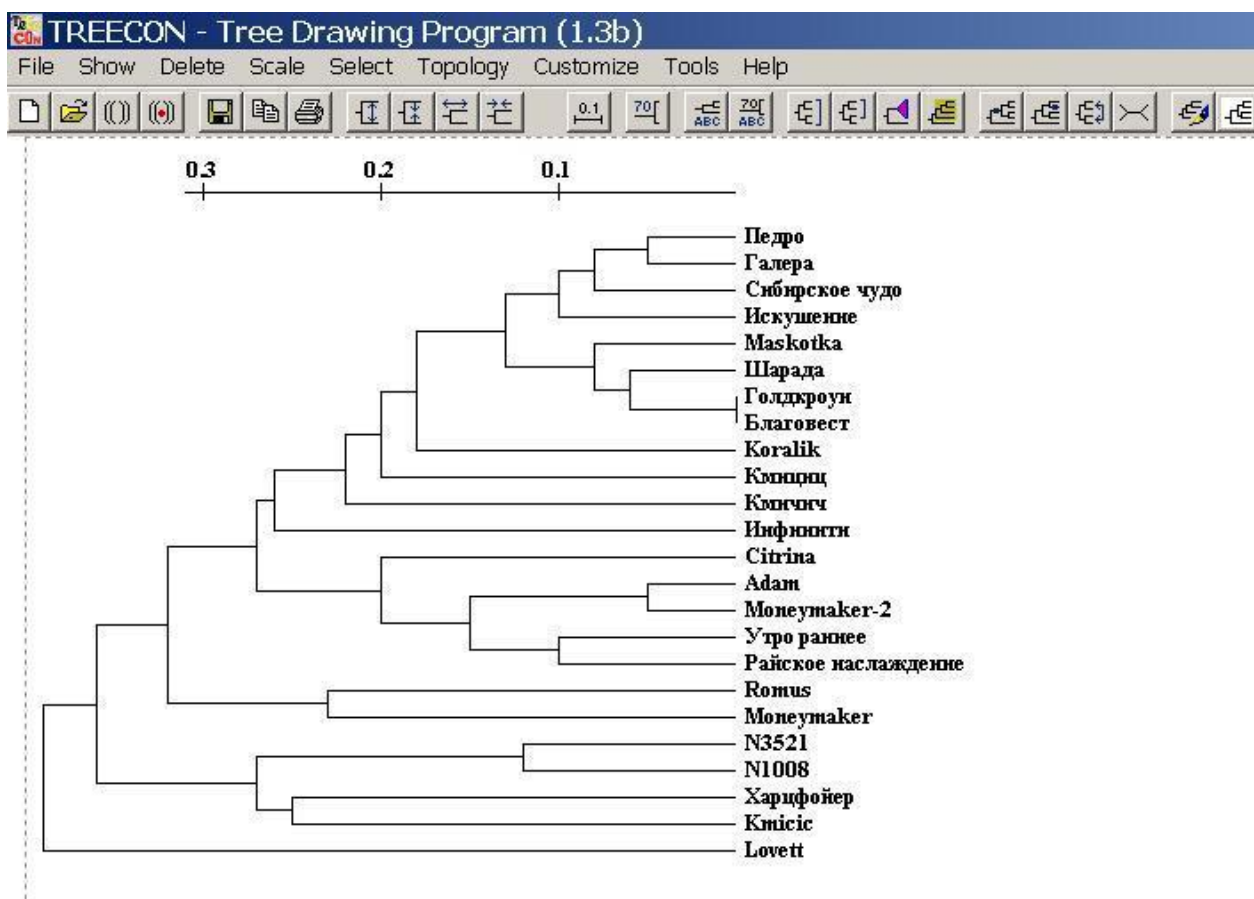


Рисунок 4 – Дендрограмма распределения 24 линий томата, построенная по данным ISSR-анализа

Дендрограмма, построенная на основе матрицы сходства с применением невзвешенного парногруппового метода средних значений (UPGMA), позволила оценить генетическое подобие изучаемых генотипов. Согласно результатам, представленным на дендрограмме (рисунок 4), сорта представляют собой достаточно однородную группу, так как не сформировали четко отделяющихся кластеров. Исследуемые линии

образовали обширную группу, от которой в виде отдельной ветви отделилась линия Lovett. Линии 3521 и 1008, имеющие умеренно низкое количество рецессивных локусов, образовали относительно обособленный субкластер. Линии Romus и Maneumaker, Утро раннее и Райское наслаждение, Adam и Maneumaker-2, обладающие уникальными ISSR-локусами, также образовали отдельные ветви дендрограммы. Сорта Голдкроун и Благовест составили гомогенную группу, в пределах которой используемые праймеры не выявили полиморфных локусов. Внутри общего кластера разделение линий на подкластеры сопровождалось невысокими значениями бутстрепов – показателей достоверности предсказанной ветви, что свидетельствует о сравнительно не высоком уровне полиморфизма.

Минимальное генетическое расстояние у исследуемой коллекции линий 5,3 ев.ед., максимальное – 73,3 ев.ед. Наиболее удаленными оказались линии Харцфойер и Maneumaker (генетическая дистанция составляет 73,3 ев.ед.), Харцфойер и Кмичич (60,0 ев.ед.), Харцфойер и Утро раннее (57,9 ев.ед.), Благовест и Maneumaker (57,14 ев.ед.).

Заключение. Полученные результаты проведенных молекулярно-генетических исследований позволили заключить, что анализируемые генотипы имеют в основном узкий генетический пул и соответственно генетическое разнообразие. Это вызвано как особенностью биологии томата, как самоопыляющейся культуры, так и селекционным прессом, а также отношением экспериментальных генотипов к ограниченному числу предковых форм при создании данных линий, включая и кистевидные формы томата. На общем относительно не высоком уровне полиморфизма выделились отдельные линии и дивергентные пары, которые можно рекомендовать в качестве родительских пар, при гибридизации с целью получения гетерозисных гибридов в F_1 , которыми являются Шарада, Romus, Lovett N8593, Maneumaker, Adam, Райское наслаждение, Утро раннее и Педро. Отобраны наиболее информативные ДНК-маркеры ISSR-9a, ISSR-17, ISSR-23, которые могут быть успешно применены для генотипирования и сопровождения селекционного материала кистевидных форм томата. В целях же повышения эффективности генетических исследований, данную коллекцию необходимо расширить за счет включения новых линий, обладающих иными аллелями, которые могут быть полезными для разработки селекционных программ.

Литература

- 1 Büscher N, Zyprian E, Blaiх R. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10 mer primers // *Vitis*. 1993. – V. 32 – P. 187–188.
- 2 Yu K, Pauls KP. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res* // – 2606. – P. 20.
- 3 Smulders, M.J.M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., and Vosman, B. Use of short microsatellites from database sequences to generate

polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species // *Theor. Appl. Genet.* 1997. – P.264–272.

4 Pritesh Parmar¹, Vishal P. Oza¹, Vaishnavi Chauhan, A.D. Patel, K.B. Kathiria, R.B. Subramanian Genetic Diversity and DNA Fingerprint Study of Tomato Discerned by SSR Markers // *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* ISSN 0973-2691. 2010. –V. 6 № 5 – P. 657–666.

5 Frary, A., Xu, Y., Liu, J., Mitschell, S., Tedeschi, E., and Tanksley, S. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111 – P. 291–312.

6 Garcia-Martinez, S., Andreani, L., Gracia-Gusano, M., and Geuna, F. Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat for tomato germplasm fingerprinting: Utility for grouping closely related traditional cultivars // *Genome.* 2006. V. 49 – P. 648–656.

7 Song, J., Chen, J., Chen, H.Y., Liu, Y., and Zhuang, T.M. Research of genetic diversity of tomato using SSR markers // *Journal of Shanghai Jiaotong University.* 2006. V. 24 – P. 524–528.

8 Rai N. Heterosis for certain quality in tomato/ N. Rai, M.M. Syamal, A.K. Joshi // *The Mysore J. of Agr. Science.* 1996. – V.30., №3 – P. 240-243.

9 Smulders MJM, Bredemeijer G, RusKortekaas W, Arens P, Vosman B Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species // *Theor. Appl. Genet.* 1997. V. 97– P. 264–272.

10 Возделывание томатов в открытом грунте и необогреваемых пленочных теплицах. Отраслевой регламент. – Мн.: Минсельхозпрод респ. Беларусь, 1996. – 20с.

11 Nei, M., and Li ,W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76– P. 5269–5273.