

УДК 635.21:631.526.32:578.52

Т.М. ОЛІЙНИК, кандидат сільськогосподарських наук
С.О. СЛОБОДЯН, завідувач сектору ДНК-технологій
Р.В. ГРИЦАЙ, науковий співробітник

Інститут картоплярства НААН

ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ КАРТОПЛІ ДЛЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ СОРТІВ ВІТЧИЗНЯНОЇ ТА ЗАРУБІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

За допомогою 9 мікросателітних маркерів досліджували 12 сортів картоплі. Два праймери дали змогу виявити міжсорттовий поліморфізм та встановити філогенетичні зв'язки досліджуваних сортів. За результатами полімеразної ланцюгової реакції з використанням відібраних мікросателітів було отримано 22 поліморфних фрагменти. На основі отриманої інформації складено матрицю вихідних даних.

Ключові слова: картопля, ISSR, добір праймерів, міжсорттовий поліморфізм, ДНК

Збереження біологічного та частково генетичного різноманіття є одним з важливих завдань сучасної біотехнології. Оцінка генетичних відмінностей між окремими особами в популяції необхідна для виявлення найбільш унікальних форм. Вона є актуальною для збереження та підтримання ботанічних колекцій цінних видів і таксонів, а також досить важлива за спрямованої селекції як при підборі вихідного матеріалу, так і при оцінці результатів селекційного процесу [1].

На сьогодні використання молекулярних маркерів є одним із головних методологічних підходів у вивченні генетичного поліморфізму. Такі маркери дають можливість розрізняти різні види та підвиди рослин, а також давати кількісну характеристику їхнього генетичного та алельного складу. При введенні молекулярних маркерів у прак-

© Т.М. Олійник, С.О. Слободян,
Р.В. Грицай, 2012

Картоплярство. 2012. Вип. 41

тику біологічних досліджень з'явилися нові можливості детального вивчення структури та організації геному рослин і кількісної оцінки ступеня схожості/відмінності на видовому та міжвидовому рівнях. Використання молекулярних маркерів у селекції особливо значення набуває як ідентифікація сортів культурних рослин, а також контроль за переносом генетичного матеріалу від дикорослих видів при віддаленій гібридизації [2].

Створення молекулярних маркерних систем, основаних на профілюванні ДНК, відкрило широкі перспективи для ідентифікації та реєстрації генотипів, встановлення генетичної чистоти ліній, визначення рівня гібридності [3]. Молекулярні маркери використовують для точної та швидкої паспортизації різних видів і сортів рослин, а також для вивчення філогенетичної спорідненості [4–7].

У молекулярній генетиці розроблено низку підходів, які дають змогу з високою точністю виявляти поліморфізм рослин [8–14]. Найперспективнішим вважається ПЛР-аналіз, за допомогою якого можна отримувати високополіморфні та специфічні спектри. Генотипування ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції дає змогу на будь-якій стадії розвитку рослини дати характеристику генотипу [15] і скласти детальні генетичні карти різних видів рослин [16–18].

Одним із методів ПЛР є ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Порівняно з іншими існуючими методами ISSR-ПЛР удосконалий завдяки збільшенню довжини праймера та зменшення його анонімності. У даній методиці використовується один або декілька праймерів. Оскільки в геномах рослин міститься значна кількість мікросателітних повторів, цей метод придатний для генетичного аналізу [10].

У ISSR-аналізі молекулярно-генетичний поліморфізм визначається за наявністю або відсутністю ампліфікованих фрагментів ДНК певного розміру. Для виявлення відмінностей між двома близькими сортами часто застосовують декілька праймерів. Добір праймерів, які дають змогу виявляти поліморфізм у досліджуваній добірці сортів і дають відтворювані результати, – важливий етап досліджень з ДНК-маркерами [19].

Мета досліджень. Оптимізувати методику проведення ISSR-аналізу для виявлення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів картоплі та встановити їхні філогенетичні зв'язки.

Матеріали та методика досліджень. Матеріалом для наших досліджень слугували рослини *in vitro* сортів картоплі зарубіжної селекції (Alpha, Bintje, Sante, Desiree, Aeered, польський гібрид 6665 д,

Bellarosa) та сорти картоплі селекції Інституту картоплярства НААН (Слов'янка, Щедрик, Серпанок, Ольвія, Подолянка, Повінь). Для виділення тотальної ДНК користувались методикою [20] з деякими власними модифікаціями [22]. Поліморфізм ДНК досліджували за допомогою динуклеотидних праймерів (AG)₈TG, (AG)₈, (AC)₈ і тринуклеотидних праймерів GAG(CAA)₅, CTG(AG)₈, (ATG)₅, (CCA)₅, (CAC)₅, (GCC)₅ [21]. Для проведення реакції ампліфікації використовували ампліфікатор «Erppendorf» (Німеччина).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка містила ПЛР-буфер з 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дНТФ, 50 пкМ праймера, 1,25 U Taq-полімерази та 1 мкл виділеної ДНК, у концентрації 40–50 нг.; 10–20 нг.; 0,5–5 нг., з наступним температурним режимом: температура плавлення ДНК 94°C, відпалу 58°C, синтезу 72°C, кількість циклів ампліфікації 25–35.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 2%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл), протягом 2 год, при напрузі 3 В/см довжини гелю. Для фотографування використовували цифрову фотосистему. Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярної маси GeneRuller 100 bp («Fermentas») та комп'ютерної програми BioTest Color (Росія).

При обчисленні результатів гель-електрофорезу враховували лише ті смуги, інтенсивність яких сягала не менше 2,5% максимальної. Кластерний аналіз, використовуючи незаважений парногруповий метод із арифметичним усередненням (UPGMA), і побудову дендрограми проводили за допомогою програми MEGA₄.

Результати досліджень. Для відпрацювання та оптимізації умов реакції ампліфікації з ISSR-праймерами використовували рослини *in vitro* сорту Слов'янка. З метою економії реактивів у роботі брали три лінії сорту Слов'янка тривалого культивування в пробірковій культурі. Дослідження проводили з використанням ISSR-праймера (CAC)₅. Згідно з літературними даними авторів Bernet V., Goraguer F., Joly G., Branchard M. [21] оптимальні результати було отримано при додаванні в реакційну суміш 50–100 пкМ/реакцію праймерів та 5–15 нг./реакцію ДНК. Тому роботу з відпрацювання методики ISSR-ПЛР ми розпочали, виходячи з представлених авторами даних.

За результатами реакції ампліфікації отримано спектри фрагментів геному ДНК картоплі (рис. 1, а). Проте на електрофореграмі не

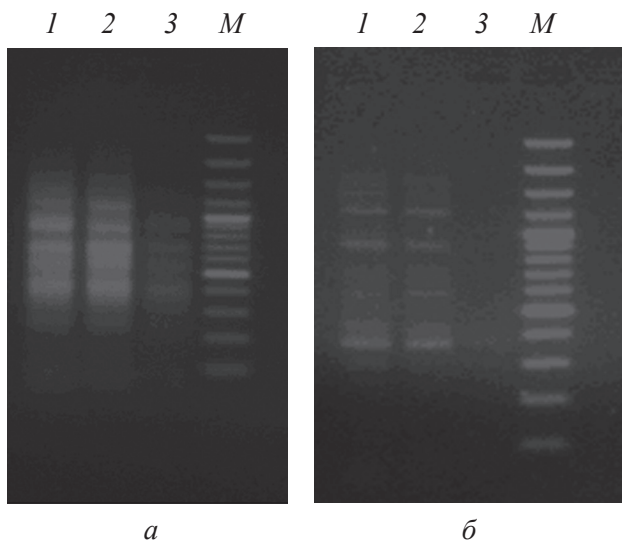


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ISSR-ПЛР:

a – праймер (CAC)₅ 50 pmol/реакцію; *б* – праймер (CAC)₅ 10 pmol/реакцію; 1 – ДНК – 40–50 нг; 2 – ДНК – 10–20 нг; 3 – ДНК – 0,5–5 нг; *M* – маркер молекулярної маси O'GeneRuller™ 100 bp («Fermentas»)

спостерігається прояву чітких фрагментів, які б можна було враховувати при інтерпретації результатів, при вивченні молекулярно-генетичного поліморфізму оздоровлених ліній чи генотипуванні сортів картоплі.

Для оптимізації та підвищення специфічності умов реакції ампліфікації в реакційну суміш ми додали лише 10 пкМ праймера при вище вказаній концентрації ДНК (рис. 1, б). Відтак ми отримали чіткі фрагменти ДНК геному картоплі сорту Слов'янка при концентрації ДНК в реакційній суміші – 10–50 нг.

Таким чином, нами відпрацьовано методику проведення ISSR-ПЛР та оптимізовано умови реакції ампліфікації: об'єм суміші становить 25 мкл, в якій міститься ПЛР-буфер з 2,5 мМ MgCl₂; 0,5 мМ дНТФ; 10 пкМ праймер; 1,25 U Taq-полімераза та 1 мкл виділеної ДНК у концентрації 40–50 нг. з наступним температурним режимом: температура плавлення ДНК 95°C, відпалу 58°C, синтезу 72°C, кількість циклів ампліфікації 30.

Для оцінки молекулярно-генетичного поліморфізму сортів картоплі вітчизняної та зарубіжної селекції використовували 9 ISSR-

праймерів (див. таблицю). Із них 7 праймерів було виключено із аналізу відібраних нами сортів, оскільки дані праймери ініціювали синтез тільки неполіморфних фрагментів або ж давали досить багато слабких компонентів, які важко використовувати для порівняння та ідентифікації зразків.

Послідовності й температури відпалу досліджуваних ISSR-праймерів

№ з/п	Послідовність	Температура відпалу, T _A (°C)
1	GAG(CAA) ₅	55
2	CTG(AG) ₈	55
3	(AG) ₈ TG	54
4	(ATG) ₅	45
5	(AG) ₈	49
6	(CCA) ₅	57
7	(AC) ₈	57
8	(CAC) ₅	57
9	(GCC) ₅	64

Отже, із 9 ISSR-праймерів нами було відібрано тільки два (№ 1, 2 – таблиця), які дають чіткі поліморфні компоненти, що достатньо добре відтворювались у різних умовах, у тому числі і при використанні Taq-полімераза від різних фірм виробників: «Fermentas», «Сиб-Єнзим» (рис. 2).

Відібрані праймери виявили різний рівень поліморфізму між сортами, в результаті чого було отримано 9 поліморфних фрагментів при використанні праймера GAG(CAA)₅ та 13 поліморфних фрагментів при використанні праймера CTG(AG)₈. На основі отриманої інформації про наявність чи відсутність фрагментів було складено матрицю вихідних даних (рис. 3).

На дендрограмі, побудованій на основі даних ISSR-аналізу, чітко виділяються субкластери. До першого субкластера (A) увійшли: сорти селекції Інституту картоплярства НААН – Щедрик, Серпанок та Ольвія; польський гібрид 6665д; один сорт селекції Нідерландів – Bintje; один сорт селекції Німеччини – Bellarosa та сорт Aeered. У межах даного субкластера окремими гілками відзначено сорт Bintje – походження якого не встановлено, сорт Ольвія – соматоклон 87.17.005 сорту Гатчинська та польський гібрид 6665 д. До

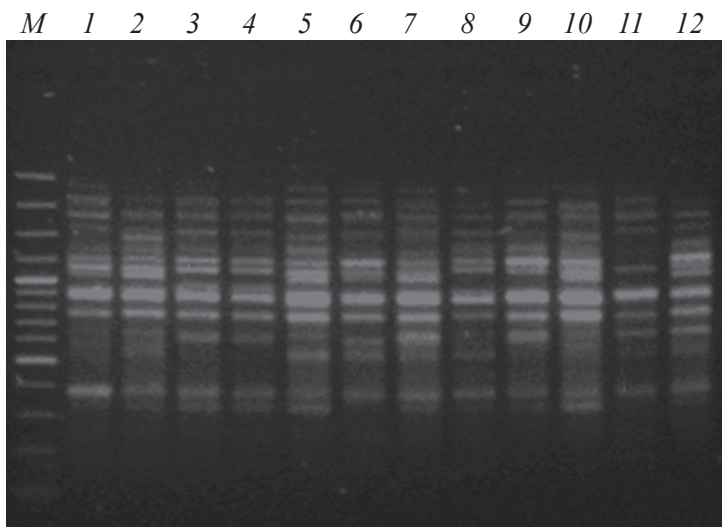


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ISSR-ПЛР сортів картоплі зарубіжної та вітчизняної селекції:

1 – Alpha, 2 – Bintje, 3 – Sante, 4 – Desiree, 5 – Aeered, 6 – польський гібрид 6665д, 7 – Bellarosa, 8 – Щедрик, 9 – Серпанок, 10 – Ольвія, 11 – Подолянка, 12 – Повінь; М – маркер молекулярної маси O'GeneRuller™ 100 bp («Fermentas»)

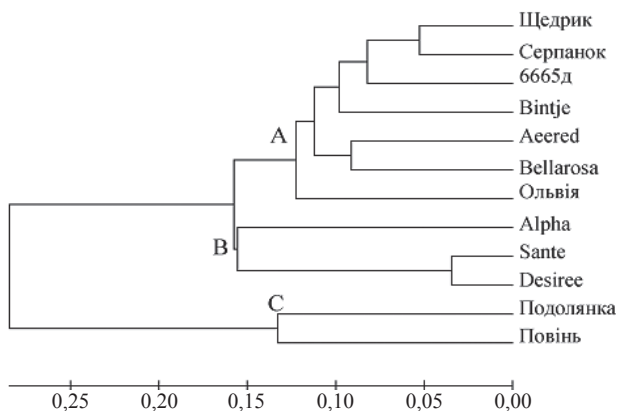


Рис. 3. Дендрограма сортів картоплі вітчизняної та зарубіжної селекції

другого субкластера (В) увійшли сорти селекції Нідерландів: Alpha, Sante та Desiree. Причому сорт Alpha на дендрограмі представлений окремою гілкою. До третього субкластера (С) увійшли сорти селекції Інституту картоплярства НААН Подільянка та Повінь.

Висновки. Результатами досліджень встановлено, що з дев'яти використовуваних мікросателітних маркерів лише два чітко виявляли міжсортовий поліморфізм досліджуваних сортів картоплі. Відібрані мікросателіти проявили різний рівень поліморфізму між сортами, в результаті чого було отримано 9 поліморфних фрагментів при використанні праймера GAG(CAA)₅ та 13 поліморфних фрагментів при використанні праймера CTG(AG)₈. На основі отриманої інформації складено матрицю вихідних даних.

Перспективи подальших досліджень. Перспективою подальших досліджень передбачено розробку системи паспортизації та ідентифікації сортів картоплі з метою їхнього подальшого прикладного використання в насінництві та селекції, для захисту авторських прав.

1. *RAPD* и *ISSR*-генотипирование перспективных форм курильского чая (*Potentilla fruticosa* L.) коллекции центрального ботанического сада НАН Беларуси / А.Б. Власова, В.С. Панкратов, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников // Труды Никитского ботанического сада. – 2009. – Т. 131. – С. 59–63.

2. *Велишаева Н.С.* Использование технологии микросателлитного анализа для различения сортов картофеля и его дикорастущих сородичей / Н.С. Велишаева, И.А. Шилов, Э.Е. Хавкин // Вопросы картофелеводства. Актуальные проблемы науки и практики: науч. тр. – М., 2006. – С. 228–235.

3. *Kiewicz J.P.* The use of *RAPD* end semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. / J.P. Kiewicz, A. Nadolska-Orczyk, W. Orczyk // Cellular and Molecular Biology Letters. – 2002. – V. 7. – P. 671–676.

4. *Kochieva E.Z.* Molecular markers of potato and tomato species and cultivars genome / E. Z. Kochieva // Molecular Biology. – 2005. – V. 39. – P. 173–176.

5. *Кочиева Е.З.* Идентификация меж- и внутривидового полиморфизма у томатов / Е.З. Кочиева, Т.П. Супрунова // Генетика. – 1999. – Т. 35, № 10. – С. 1386–1389.

6. *Антонов А.С.* Геносистематика растений / А.С. Антонов. – М.: Академкнига, 2006. – 294 с.

7. *Гостимский С.А.* Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений / С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, В.К. Боброва // Генетика. – 1999. – Т. 35, № 11. – С. 1538–1549.

8. *Балашова И.А.* Маркирование гена *Ppd-D1a* методом *ISSR-ПЛП* / И.А. Балашова, В.И. Файт, Ю.М. Сиволап // Вісн. нац. ун-ту. – 2002. – 7. – С. 69–73.

9. Галаев А.В. Детекция интрогрессии элементов генома *Aegilops cylindrica* host, в геном *triticum aestivum* l. с помощью ISSR- и SSR-анализа / А.В. Галаев, Л.Т. Бабаянц, Ю.М. Сиволап // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 12. – С. 1654–1661.

10. Глазко В.И. Введение в генетику / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – К.: КВЦ, 2003. – 640 с.

11. Лісневич Л.О. Молекулярно-генетичні маркери пшениці, принципи і застосування / Л.О. Лісневич, О.М. Радченко, В.І. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – Т. 38, № 1. – С. 3–18.

12. Молекулярно-генетичний поліморфізм *Triticum aestivum* L., визначений шляхом inter-SSR ПЛР / О.О. Куц, С.В. Чеботар, Ю.М. Сиволап, В.М. Троцький // Вісн. Одес. держ. ун-ту. – 2000. – Т. 5, вип. 1. – С. 97–101.

13. Jones C.J. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR, ISSR markers in plants by a network of European laboratories / C.J. Jones, K.J. Edwards, S. Castaglione // Mol. Breed. – 1997. – V. 3, N 3. – P. 381–390.

14. Weisner I. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns / I. Weisner, D. Weisnerova // Cell. Mol. Lett. – 2003. – V. 8, N 5. – P. 743–748.

15. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction / K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf [et al.] // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1986. – V. 51. – P. 263–273.

16. Genetic mapping in pea. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture / C. Rameau, D. Denoue, F. Fraval [et. al.] // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V. 97. – P. 916–928.

17. Saliba-Colombani V. Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genomes / V. Saliba-Colombani, M. Causse, L. Gervais, J. Philouze // Genome. – 2000. – V. 43. – P. 29–40.

18. Давлетшина Э.Ф. Использование метода RAPD в определении ДНК-полиморфизма и филогенетических связей сортов *Solanum Tuberosum* / Э.Ф. Давлетшина // Картофелеводство: сб. науч. тр. – М., 2009. – С. 83–88.

19. Радченко О.М. Добір ефективних праймерів для аналізу поліморфізму ДНК у сортів м'якої озимої пшениці із застосуванням ПЛР / О.М. Радченко, Л.О. Лісневич // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – Т. 38, № 5. – С. 432–435.

20. Дрейпер Дж. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений / Дж. Дрейпер, Р. Скотт // Генная инженерия растений: лаб. рук. – М.: Мир, 1991. – С. 236–276.

21. Bornet B. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs) / B. Bornet, F. Goraguer, G. Joly and M. Branchard // Genome. – 2002. – V. 45. – P. 481–484.

22. Слободян С.О. Визначення концентрації ДНК у пробіркових рослинах картоплі / С.О. Слободян, Т.М. Олійник, В.А. Малієнко // Картоплярство: міжвід. темат. наук. зб. – К., 2008. – Вип. 37. – С. 63–67.