

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК [631.526.32:633.32]: 581.526

ISSR-АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКИХ СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

© 2012 г. Ю. Н. Дугарь

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)*

Проведен анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов клевера лугового украинской селекции с помощью ISSR-маркеров. Описано 59 полиморфных ампликонов. По ISSR-локусам выявили высокий уровень полиморфизма среди генотипов клевера лугового. Уровень полиморфизма составил 78,7 %. Исследованные образцы растений клевера на основе матрицы генетических расстояний Nei и Li были объединены в три кластера. Обсуждаются возможные причины их группирования в кластеры.

Ключевые слова: *Trifolium pratense* L., ISSR-анализ, полиморфизм, генетические дистанции

Для анализа структуры генома сельскохозяйственных растений широкое применение получили ДНК маркеры, основанные на полимеразной цепной реакции. Они позволяют идентифицировать скрытую изменчивость и могут использоваться для решения разных генетико-селекционных задач (Календарь, Сиволап, 2002; Сиволап и др., 2011). Одним из направлений, в котором достигнуты значительные успехи благодаря применению разных типов ДНК-маркеров, является изучение генетической структуры культурных видов растений, среди которых детально проанализированы пшеница (Чеботарь и др., 2001), ячмень (Брик и др., 2006), кукуруза (Кожухова, Сиволап, 2004), нут (Акинина, Попов, 2012), подсолнечник (Попов и др., 2002; Саналатий и др., 2006). В последнее время у исследователей возник интерес также к малоизученным сельскохозяйственным растениям, к которым относится клевер луговой.

Геномный анализ клевера лугового в основном проведен с применением мультилокусной системы – RAPD-маркеры. Помимо этих маркеров используют другие молекулярные

маркеры, например, AFLP. С помощью RAPD и AFLP маркеров изучен полиморфизм европейских сортов, а также сортов, созданных в Северной и Южной Америке (Kongkiatngam et al., 1995; Kongkiatngam et al., 1996; Campos-de-Quiroz et al., 2001; Herrmann et al., 2005; Дугарь и Попов, 2011). В меньшей степени для изучения межсортового полиморфизма клевера лугового задействованы SSR-маркеры (Dias et al., 2008; Kolliker et al., 2006), хотя именно они успешно использованы для геномного картирования этой культуры (Sato et al., 2005; Klimenko et al., 2010).

ISSR-маркеры (inter-simple sequence repeat), которые по сравнению с RAPD-маркерами являются лучше воспроизводимыми, при геномном анализе клевера лугового до сих пор не применялись.

Целью настоящей работы было исследование молекулярно-генетического полиморфизма сортов клевера лугового украинской селекции с помощью ISSR-маркеров.

МЕТОДИКА

В качестве растительного материала использовали 15 украинских образцов клевера лугового разного эколого-географического происхождения (табл. 1).

Адрес для корреспонденции: Дугарь Юлия Николаевна, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;
e-mail: julijadugar@rambler.ru

ДУГАРЬ

Таблица 1. Сорты клевера лугового и их происхождение

№ п/п	Название сорта	Происхождение
1	Тернопольская 3	Тернопольская обл.
2	Тернопольская 4	
3	Дарунок	Киевская обл.
4	Кумач	
5	Маруся	
6	Мироновская 45	
7	Полис	
8	Полянка	
9	Агрос 12	Черниговская обл.
10	Фалкон	
11	Анитра	Винницкая обл.
12	Политанка	
13	Спарта	
14	Полтавская 75	Полтавская обл.
15	UDS 00131	Карпаты

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе для выявления молекулярно-генетического полиморфизма между украинскими сортами клевера лугового

Праймер	5'→3' последовательность	Общее число локусов, шт.	Полиморфные локусы, шт.	Полиморфизм, %	Размер фрагментов, пн.
ISSR 5	(ЦА) ₈ АЦ	4	1	25,0	200-975
ISSR 807	(АГ) ₈ Т	14	11	78,6	194-1142
ISSR 810	(ГА) ₈ Т	16	15	93,8	342-1231
ISSR 812	(ГА) ₈ А	6	4	66,8	105-990
ISSR 825	(АЦ) ₈ Т	6	5	83,3	226-1000
ISSR 826	(АЦ) ₈ Ц	8	7	87,5	270-990
ISSR 834	(АГ) ₈ ЦТТ	7	5	71,4	257-1591
ISSR 842	(ГА) ₈ ЦТГ	6	5	66,7	309-987
ISSR 846	(ЦА) ₈ АГТ	7	6	85,7	372-1267
ISSR 857	(АЦ) ₈ ЦТГ	1	0	0	852
	Всего	75	59	78,7	

ДНК выделяли из смеси семян СТАВ методом (Ausubel et al., 1987). Для проведения ПЦР использовали 10 праймеров к микросателлитным последовательностям с одним или тремя селективными нуклеотидами на 3'-конце (табл. 2).

Аmplификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе «Герцик» (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 20 нг ДНК и 0,2 мкМ праймера. ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 4 мин при 94°C, последующие 40 циклов с такими параметрами: денатурация – 45 с при 94°C, отжиг праймера – 45 с при 52°C, элонгация –

45с при 72°C; конечная элонгация – 7 мин при 72°C.

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Электродный буфер использовали с низкой ионной силой (Brody, Kern, 2004). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли при помощи трансиллюминатора ТСП-20МС с последующим фотографированием гелей. В качестве маркера молекулярной массы для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали 1 kb DNA ladder.

Вычисление молекулярной массы продуктов амплификации проводили при помощи

ISSR-АНАЛИЗ УКРАИНСКИХ СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

демо-версии программного пакета “TotalLab TL120” (<http://www.totallab.com>).

По результатам анализа была составлена бинарная матрица на основе выявленных ампликонов с помощью 10 ISSR праймеров. В матрице присутствие ампликона обозначалось цифрой 1, а отсутствие – 0. Каждая ISSR-полоса рассматривалась как отдельный генетический локус. Уровень полиморфизма определяли как отношение полиморфных локусов к общему числу выявленных локусов, детектируемые с использованием каждого праймера и выражали в процентах. Анализ генетического разнообразия проводили путем вычисления генетических расстояний по Nei, Li (1979). Для изучения генетических взаимоотношений между образцами клевера лугового строили дендрограмму методом ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ). Достоверность полученной дендрограммы проверяли с помощью бутстреп-анализа при 1000 повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ “PHYLIP-3.69”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения молекулярно-генетического полиморфизма сортов клевера лугового использовали 10 праймеров, состоящих из двух коротких tandemных повторов, которые ограничивают межмикросателлитные участки ДНК (табл. 2). Как результат такой амплификации синтезируются ампликоны с инвертированными микросателлитными последовательностями

праймера. На рис. 1 представлен пример амплификации ДНК клевера лугового с праймером ISSR 807.

Указанные в табл. 2 праймеры при амплификации с геномной ДНК клевера лугового выявляли разное количество ампликонов, которое варьировало в широких пределах – от 1 до 16 (ISSR 857 и ISSR 810, соответственно). Всего было идентифицировано 75 четко воспроизводимых ампликонов. При этом не по всем локусам детектировался полиморфизм. Например, при использовании праймера ISSR 857 амплифицировался только один четко воспроизводимый ампликон размером ~ 852 пн. Количество полиморфных компонентов варьировало от 1 до 15, при использовании праймеров ISSR 5 и ISSR 810, соответственно. Общее количество полиморфных локусов составило 59. В относительных единицах уровень полиморфизма изменялся от 25,0 до 93,8 %. В среднем этот показатель составил 78,7 %, что значительно выше, чем показано нами ранее при изучении изменчивости клевера лугового с использованием RAPD-анализа (Дугарь, Попов, 2011).

Размеры выявленных полос изменялись в широком диапазоне. Минимальный размер компонентов был ~ 105 пн., а максимальный – 1591 пн. при использовании праймеров ISSR 812 и ISSR 834, соответственно (табл. 2). Следует отметить, что для некоторых сортов клевера лугового обнаружены уникальные, присутствующие только им, полосы, которые могут представлять интерес для дальнейших генетико-селекционных исследований. Из 15 вовлеченных в анализ сортов клевера лугового у 11 сортов были выявлены уникальные полосы: UDS

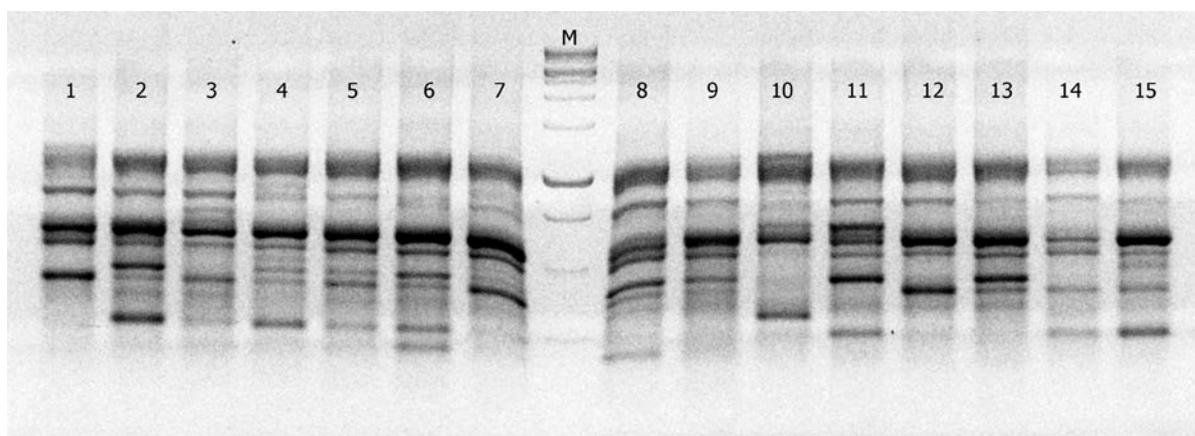


Рис. 1. Электрофореграмма разделения продуктов амплификации с использованием праймера ISSR 807.

1-15 – образцы клевера лугового, М – маркер молекулярной массы.

ДУГАРЬ



Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе матрицы генетических расстояний Nei и Li, между сортами клевера лугового.

Цифры у оснований внутренних узлов соответствуют бутстреп-значениям, %.

00131, Полис, Дарунок, Мироновская 45, Анитра, Агрос 12, Спарта, Полтавская 75 и Тернопольская 3, Политанка, Полянка. Наибольшее количество уникальных полос было идентифицировано у образца клевера лугового (УДС 00131) из Карпат, для которого число таких ампликонов составило четыре. Это уникальные полосы размером ~ 334 пн. (праймер ISSR 807), 457 пн. (праймер ISSR 834), а также 577 и 529 пн. (праймер ISSR 810).

Для оценки генетического разнообразия растений на основе полученной бинарной матрицы рассчитывали генетическое расстояние Nei и Li. В результате были получены значения генетических дистанций между исследуемыми образцами клевера лугового. Минимальное значение расстояния Nei и Li было выявлено между образцами Тернопольская 3 и Полянка и

составило 0,002250, а максимальное – 0,008856 для пары сортов Анитра и Маруся.

На основе данных матрицы генетических дистанций было построено согласованное дерево с бутстреп-значениями, в котором сорта клевера лугового объединены в три основных кластера. Генетические взаимоотношения между генотипами клевера показаны на рис. 2. Первый кластер был представлен образцами клевера лугового разного происхождения – Анитра (Винница), Полянка (Киев), Тернопольская 3 (Тернополь) и Полтавская 75 (Полтава). Бутстреп-оценка для узлов первого кластера составила 20, 47 и 93 %. Во второй кластер вошло шесть сортов клевера лугового, из которых основная часть – сорта киевской селекции (Маруся, Кумач, Мироновская 45, Дарунок). Исключение составили два образца – Политанка

(Винница) и UDS00131 (Карпаты). Для этого кластера характерны низкие бутстреп-значения, что теоретически может приводить к иной топологии дерева. Особенностью третьего кластера является то, что в него вошли два черниговских сорта (Фалкон и Агрос 12), которые объединены в общую пару, а также три образца (Полис, Тернопольская 4 и Спарта) разного происхождения, которые последовательно внешними ветвями примыкают к черниговским сортам. Бутстреп-значения для узлов в этом кластере низкие, за исключением внутреннего узла внешней ветви с сортом Спарта (рис. 2).

Таким образом, при изучении коллекции украинских сортов клевера лугового ISSR-анализом был выявлен высокий уровень полиморфизма и достаточно высокая эффективность его использования для дифференциации генотипов клевера. Полученная информация может быть полезна для дальнейших исследований в области молекулярной генетики клевера, в частности, маркер-зависимой селекции, что значительно оптимизирует трудоемкий селекционный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

- Акинина Г.Е., Попов В.Н. Полиморфизм микросателлитных локусов в сортах нута европейского происхождения // Цитология и генетика. – 2012. – Т. 46, № 1. – С. 27-36.
- Брик А.Ф., Календарь Р.Н., Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. IRAP- и REMAP-анализ сортов ячменя одесской селекции // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 24-33.
- Дугарь Ю.Н., Попов В.Н. RAPD-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) разного эколого-географического происхождения // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія – 2011. – Вип. 13, № 947. – С. 81-86.
- Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002. – Т. 34, № 4. – С. 279-295.
- Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 59-66.
- Попов В.Н., Урбанович О.Ю., Кириченко В.В. Исследование генетического разнообразия инбредных линий подсолнечника методами RAPD- и изоферментного анализов // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 7. – С. 937-943.
- Саналатий А.В., Солоденко А.Е., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа // Цитология и генетика. – 2006. Т. 40, № 4. – С. 37-43.
- Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э. Календарь Р.Н. Варибельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. – Одесса: Астропринт. – 2011. – 336 с.
- Чеботарь С.В., Сиволап Ю.М. Дифференциация, идентификация и создание базы данных сортов *T. aestivum* L. украинской селекции на основе STMS-анализа // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 6. – С. 18-27.
- Ausubel F. M., Brent R. Kingston R.E., Moor D.D., Seidman J.G. Current protocols in molecular biology / John Wiley & Sons. – New York, 1987. – P. 4.3.1-4.3.3.
- Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // BioTechniques. – 2004. – V. 36. – P. 214-216.
- Campos-de-Quiroz H., Ortega-Klose F. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers // Euphytica. – 2001. – V. 122. – P. 61-67.
- Dias P.M.B., Julier B., Sampoux J-P., Barre P., Dall'Agnol M. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers // Euphytica. – 2008. – V. 160. – P.189-205.
- Herrmann D., Boller B., Widmer F., Kölliker R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover // Genome. – 2005. – V. 48. – P. 474-486.
- Klimenko I., Razgulayeva N., Gau M., Okumura K., Nakaya A., Tabata S., Kozlov N., Isobe S. Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover // Theor. Appl. Genet. – 2010. – V. 120. – P. 1253-1263.
- Kolliker R., Enkerli J., Widmer F. Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries // Mol. Ecology Notes. – 2006. – V. 6. – P. 50-53.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Fortin M.G., Coulman B.E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers // Euphytica. – 1995. – V. 84. – P. 237-246.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Coulman B.E., Fortin M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA // Euphytica. – 1996. – V. 89. – P. 355-361.

ДУГАРЬ

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

Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y., Kaneko T., Sakurai N., Okumura K.,

Klimenko I., Sasamoto S., Wada T., Watanabe A., Kohara M., Fujishiro T., Tabata S. Comprehensive Structural Analysis of the Genome of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) // DNA Research. – 2005. – V. 12. – P. 301-364.

Поступила в редакцію
14.05.2012 з.

ISSR-ANALYSES OF THE UKRAINIAN RED CLOVER CULTIVARS (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

Yu. M. Dugar

V.V. Docuchaev *Kharkiv National Agrarian University*
(*Kharkiv, Ukraine*)

Molecular-genetic diversity of 15 red clover cultivars was examined by ISSR analysis. 59 polymorphic amplicons were identified. The red clover genotypes were shown to be highly polymorphic by ISSR loci. It was 78,7 % on the average. The studied cultivars of clover plants were merged in three clusters on the basis of Nei and Li genetic distances matrix. Possible reasons of their clustering are discussed.

Key words: *Trifolium pratense* L., ISSR-analyses, polymorphism, genetic distances

ISSR-АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)

Ю. М. Дугарь

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(*Харків, Україна*)

Проведений молекулярно-генетичний поліморфізм сортів конюшини лучної української селекції за допомогою ISSR-маркерів. Виявлено 59 поліморфних ампліконів. За ISSR-локусами виявили високий рівень поліморфізму серед генотипів конюшини лучної. Рівень поліморфізму склав 78,7 %. Досліджені зразки рослин конюшини на основі матриці генетичних відстаней Nei та Li були об'єднані у три кластери. Обговорюються можливі причини їх групування у кластери.

Ключові слова: *Trifolium pratense* L., ISSR-аналіз, поліморфізм, генетичні відстані