

**ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО ЛОКУСА CAMS-336
У СОРТОВ ПЕРЦА И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ***Е.А. СНИГИРЬ^{1, 2}, О.Н. ПЫШНАЯ², Е.З. КОЧИЕВА^{1, 3}, Н.Н. РЫЖОВА¹

Полиморфизм микросателлитного локуса CAMS-336 исследовали у 45 сортов, гибридов и линий перца *Capsicum annuum* L. отечественной и зарубежной селекции, а также у образцов близкородственных культурных видов *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*. Было обнаружено 6 аллельных вариантов локуса, различающихся по длине, определены частоты встречаемости аллелей. Выявлены уникальные аллели для ряда сортов и видов, вычислены величины PIC (polymorphism information content) для полного набора образцов. Аллельная вариабельность подтверждена прямым секвенированием, что позволило установить точный нуклеотидный состав и размеры обнаруженных аллельных вариантов микросателлитного локуса CAMS-336. Кроме того, секвенирование этого локуса дало возможность определить механизм возникновения новых аллельных вариантов В и D, что связано с точечной заменой Т на А. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения микросателлитного локуса CAMS-336 для паспортизации отечественных сортов *C. annuum*.

Ключевые слова: SSR-анализ, *Capsicum annuum*, паспортизация сортов.

Keywords: SSR analysis, *Capsicum annuum*, cultivar fingerprinting.

Идентификация и паспортизация сортов — один из основных способов защиты интеллектуальной собственности в селекции и семеноводстве. В настоящее время для этой цели широко используются методы молекулярного маркирования геномов, прежде всего SSR-анализ (simple sequence repeats) микросателлитных локусов — коротких (длиной менее 6 нуклеотидов) тандемно повторяющихся ДНК-последовательностей. Подобные повторы часто встречаются в геномах растений как в гетеро-, так и в эухроматиновых областях, включая экзонные, интронные и межгенные последовательности, и, как правило, равномерно распределены по геному (1). Число повторов внутри микросателлитного локуса и его длина могут значительно варьировать даже у близкородственных генотипов, в то время как фланкирующие микросателлит последовательности у генотипов одного и того же вида остаются неизменными (2, 3). Вариабельность числа повторов микросателлита — результат проскальзывания ДНК (DNA slippage) при репликации или неравного кроссинговера (4). Анализ аллельного полиморфизма микросателлитных локусов характеризуется высокой дискриминирующей способностью, поэтому широко используется для генотипирования сортов культурных растений, при сортовой и интрогрессивной гибридизации (3, 5-12).

Эффективность SSR-маркеров для оценки внутрисортного и межсортного полиморфизма, а также генотипирования сортов и линий сельскохозяйственных культур подтверждалась неоднократно (3, 13-22). При этом существенное значение имеет определение набора наиболее информативных микросателлитных праймеров и локусов, так как исходный генетический материал для создания современных сортов в разных странах значительно различается. Достаточно часто SSR-маркеры, рекомендуемые для генотипирования одного набора сортов, не столь эффективны при идентификации других образцов (13, 16).

Работы по использованию микросателлитных локусов генома у перца немногочисленны (20-22). Наиболее информативные данные представлены в статье, посвященной получению генетической карты *Capsicum an-*

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00300-а и гранта Министерства образования и науки ГК 16.М04.11.0004.

nnium на основе SSR-маркеров (22). Для микросателлитного локуса CAMS-336 на выборке из 7 сортов японской и американской селекции показан аллельный полиморфизм, характеризующийся высокими значениями PIC (polymorphism information content) (22).

Целью настоящей работы стала характеристика микросателлитного локуса CAMS-336, определение его варибельности у сортов перца *Capsicum annuum* L. и образцов близкородственных культурных видов, а также оценка возможности применения этого локуса для паспортизации отечественных сортов *C. annuum* L.

Методика. Для анализа были взяты растения 45 сортов, гибридов и линий перца *C. annuum* L. отечественной и зарубежной селекции из коллекции Всероссийского НИИ селекции и семеноводства овощных культур, а также образцы близкородственных культурных видов — *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*.

Тотальную растительную ДНК выделяли из 8-10-суточных проростков перца по методике, предложенной К. Edwards с соавт. (23), с дополнительной депротеинизацией смесью фенол:хлороформ (1:1). Эта методика позволяет проводить быстрое выделение тотальной ДНК высокого качества (ОП_{260/280} 1,6-1,9) в количестве более 5 мкг.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли с использованием соответствующих наборов реактивов («Диалат», Россия). Амплификацию микросателлитных локусов проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 1× буфер из набора, 0,16 мМ каждого dNTP, 0,3 мкМ праймера, 0,3 ед. Taq-полимеразы, 100 нг геномной ДНК. Была подобрана оптимальная концентрация MgCl₂. Реакцию амплификации проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США) в следующем режиме: денатурация — 30 с при 94 °С, отжиг праймера — 45 с при 50 °С; синтез ДНК — 1 мин при 72 °С с предварительной денатурацией 5 мин при 94 °С (35 циклов); заключительная элонгация ПЦР-фрагментов — 10 мин при 72 °С. Температуру плавления праймеров определяли по формуле: $T_{пл.} = 69,3 + 0,41(GC) - 650/L$, где L — число нуклеотидов в праймерной последовательности, GC — содержание GC-оснований в праймере, % (26). Исходную температуру отжига рассчитывали по формуле: $T_{отж.} = T_{пл.} - 3$ °С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,7 % агарозном геле в 1×TBE-буфере, окрашивали бромистым этидием и фотодокументировали. Маркер молекулярных масс — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва).

Для выявления аллельного полиморфизма микросателлитных локусов продукты амплификации разделяли в 6 % денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) и визуализировали окрашиванием нитратом серебра с использованием набора SILVER SEQUENCE™ DNA («Promega», США) согласно рекомендациям производителя. Аллельный полиморфизм SSR-локуса оценивали с использованием коэффициента PIC: $PIC = 1 - \sum p_i^2$, где p_i — частота встречаемости i -го аллеля в выборке (24).

Первичные последовательности определяли на ABI 310 capillary DNA Analyzer (США). Нуклеотидные последовательности анализировали в программе Mega 3.0 (25).

Результаты. Ранее на выборке из 5 образцов ДНК были выявлены оптимальные условия амплификации локуса CAMS-336 с праймерами С3F и С3R: температура отжига праймеров — 56 °С, концентрация MgCl₂ — 1,1 мМ при прочих стандартных параметрах (22). В подобранных нами условиях у всех исследованных образцов также были получены фрагменты ожидаемой длины (150-200 п.н.) (рис. 1). В 1,7 % агарозном геле выявлял-

ся только один мажорный фрагмент. По результатам электрофореза удалось идентифицировать 4 аллеля микросателлита у сортов перца *C. annuum*, а также 2 аллельных варианта локуса у образцов *C. chinense* и *C. baccatum*.

При разделении полученных ПЦР-фрагментов в денатурирующем полиакриламидном геле у локуса SAMS-336 идентифицировали 6 аллелей (А, В, С, D, Е и F) (рис. 2).

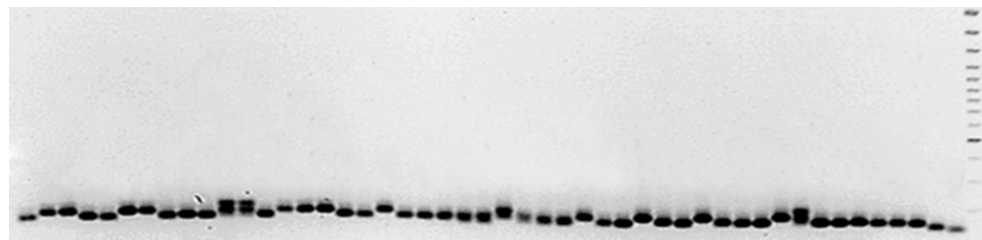


Рис. 1. Электрофоретические спектры продуктов ПЦР-амплификации локуса SAMS-336 у 45 сортов, гибридов и линий перца *Capsicum annuum* L., а также образцов близкородственных культурных видов *Capsicum*, полученные в 1,7 % агарозном геле (слева направо): Калифорнийское Чудо, Мадонна, Spady, Рубин, Salad Festival, Marconi pepper, Chimes, F₁ Раиса, F₁ Пурпурная красавица, Мазурка, Оранжевое Чудо, Pirati, Memphis, RS 87001, Гибрид 167, Болеро, Шарм, Шрегада, Бенда, Медаль, F₁ Екатерина, Белоснежка, Мария, Желтый букет, Ёжик, Маяк, Каскад, Золотой Дождь, F₁ Хризолит, F₁ Очарование, Карлик, F₁ Сибиряк, Малыш, F₁ Руза, F₁ Ария, F₁ Изабелла, Златозар, Линия 71, Сирень, Агаповский, Здоровье, Мавр, Родник, Нежность, Сиреневый туман, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*; крайний справа — маркер молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.



Рис. 2. Электрофоретические спектры продуктов ПЦР-амплификации локуса SAMS-336 у 45 сортов, гибридов и линий перца *Capsicum annuum* L., а также образцов близкородственных культурных видов *C. frutescens*, *C. chinense* и *C. baccatum*, полученные в 6 % денатурирующем полиакриламидном геле: А, В, С, D, Е и F — аллели локуса (плюсом отмечено предполагаемое гетерозиготное состояние); крайний справа — маркер молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Аллель А содержали сорта Salad Festival, Мазурка, Шрегада, Медаль, Екатерина, Мария, Желтый букет, Каскад, Золотой дождь, Карлик, Златозар, Здоровье, Мавр, Нежность, Сиреневый туман, F₁ Раиса, F₁ Руза, Линия 71, а также вид *C. frutescens*; аллель В — сорта Мадонна, Spady, Marconi pepper, Chimes, Оранжевое чудо, Pirati, RS 87001, Болеро, Ария, Сирень, Агаповский, F₁ Хризолит, F₁ Сибиряк, Гибрид 167; аллель С — сорта Калифорнийское чудо, Рубин, Memphis, Шарм, Белоснежка, Маяк, Малыш, Изабелла, Родник, F₁ Пурпурная красавица, F₁ Очарование. Сорт Ёжик характеризовался присутствием сортоспецифичного аллеля D. В образцах *C. chinense* и *C. baccatum* обнаружили специфичные аллельные варианты — соответственно Е и F, значительно отличающиеся по длине от аллелей, детектированных для представителей *C. annuum*. Интересно, что у растений сортов Оранжевое чудо, Агаповский, Pirati локус SAMS-336 был представлен двумя фрагментами, различающимися по длине, что предполагает его гетерозиготное состояние (В+).

Частота встречаемости каждого аллеля микросателлитного локуса SAMS-336 определялась как отношение числа сортов, имеющих этот аллель, к общему числу анализируемых сортов. Так, для аллеля А она составила 40, для аллеля В — 31, аллеля С — 23, аллелей D, Е и F — 2 %. То есть наиболее распространенными были аллельные варианты А, В и С, с помощью которых

риабельность подтвердило прямое секвенирование, что позволило определить точный нуклеотидный состав и размеры обнаруженных аллельных вариантов SAMS-336, а также механизм возникновения новых аллельных вариантов В и D. Показана возможность применения микросателлитного локуса SAMS-336 для паспортизации отечественных сортов *S. annuum* L.

ЛИТЕРАТУРА

1. Katti M.V., Ranjekar P.K., Gupta V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 2001, 18(7): 1161-1167.
2. Toth G., Gaspari Z., Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 2000, 10: 967-981.
3. Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. Genetic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.*, 2005, 23: 48-55.
4. Schlotterer C., Tauz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 211-215.
5. Кочиева Е.З. Использование методов на основе полимеразной цепной реакции для маркирования генома растений. *С.-х. биол.*, 1999, 1: 1-19.
6. Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н. Использование PCR-амплификации на основе сателлитных последовательностей для маркирования генома различных видов перца. *С.-х. биол.*, 2001, 1: 94-97.
7. Tommasini L., Batley J., Arnold G.M., Cooke R.J., Donini P., Lee D., Law J.R., Lowe C., Moule C., Trick M., Edwards K.J. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, 106: 1091-1101.
8. Spooner D.M., Nunez J., Trujillo G., Herrera M.R., Guzman F., Ghislain M. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *PNAS USA*, 2007, 104(49): 19398-19403.
9. Koopman W.J.M., Li Y., Coart E., Van de Weg E., Vosman B., Roldan-Ruiz I., Mulders M.J.M. Linked vs. unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression. *Mol. Ecol.*, 2007, 16: 243-256.
10. He C., Poysa V., Yu K. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, 106: 363-373.
11. Macaulay M., Ramsay L., Powell W., Waugh R. A representative, highly informative «genotyping set» of barley SSRs. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102: 801-809.
12. Ghislain M., Spooner D.M., Rodriguez F., Villamon F., Nunez J., Vasquez C., Waugh R., Bonierbale M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 108: 881-890.
13. Barandalla L., de Galarreta R.J.I., Rios D., Ritter E. Molecular analysis of local potato cultivars from Tenerife Island using microsatellite markers. *Euphytica*, 2006, 152: 283-291.
14. Moisan-Thiery M., Marhadour S., Kerlan M.C., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T., Hingrat Y.L. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Res.*, 2005, 48: 191-200.
15. Giarocco L.E., Marassi M.A., Salerno G.L. Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. *Crop Sci.*, 2007, 47: 853-858.
16. De Galarreta R.J.I., Barandalla L., Lorenzo R., Gonzalez J., Rios D.J., Ritter E. Microsatellite variation in potato landraces from the island of La Palma. *Spanish J. Agric. Res.*, 2007, 5(2): 186-192.
17. Manifesto M.M., Schlatter A.R., Hopp H.E., Suarez E.Y., Dubcovsky J. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci.*, 2001, 41: 682-690.
18. Bracci T., Sebastiani L., Busconi M., Fogher C., Belaj A., Trujillo I. SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 2009, 122(2): 209-215.
19. Wang L., Guan R., Zhangxiong L., Chang R., Qiu L. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sci.*, 2006, 46: 1032-1038.
20. Prince J.P., Lackney V.K., Angeles C., Blauth J.R., Kyle M.M. A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivar. *Genome*, 1995, 36: 404-417.
21. Nagy I., Polley A., Ganal M. Development and characterization of microsatellite

- markers in pepper. Proc. Xth Meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant (Avignon, France, 7-11 September, 1998). Paris, INRA, 1998: 235-237.
22. Minamiyama Y., Tsuru M., Hirai M. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. Mol. Breed., 2006, 18: 157-169.
23. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl. Acid Res., 1991, 19(6): 1349.
24. Nei M. Analyses of gene diversity in subdivided populations. PNAS USA, 1973, 70: 3321-3323.
25. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform., 2004, 5: 150-163.

¹Центр «Биоинженерия» РАН,
117312 г. Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1,
e-mail: ekochieva@yandex.ru;

²ГНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства
овощных культур Россельхозакадемии,
143080 Московская обл., Одинцовский р-н, п/о Лесной городок,
e-mail: pishnaya_o@mail.ru;

³ФГОУ ВПО Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова,
119899 г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию
19 октября 2010 года

POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCUS CAMS-336 IN PEPPER VARIETIES AND CLOSELY RELATED SPECIES

E.A. Snigir^{1, 2}, O.N. Pishnaya², E.Z. Kochieva^{1, 3}, N.N. Ryzhova¹

S u m m a r y

The polymorphism of microsatellite locus CAMS-336 was investigated in 45 pepper varieties of native and foreign selection, and also in variants of closely related cultivated species of the *Capsicum frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*. The authors revealed 6 alleles of this locus, distinguished in length, and determined the frequency of its occurrence. The unique alleles for some varieties and species were isolated and the PIC quantities for complete set of variants were calculated. The allelic variability was confirmed by sequencing, which permitted to determine the accurate nucleotide sequence and the size of revealed alleles of microsatellite locus CAMS-336. In addition, the sequencing of this locus permits to determine the mechanism of appearance of new B and D alleles, notably point substitution of T for A. The obtained data suggests the possibility of the use of microsatellite locus CAMS-336 for issue passports to the native varieties of *C. annuum* L.

*Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология»
выполняет рассылку электронных отписок опубликованных статей*

Для получения электронного отписка Вам необходимо:

- ❖ отослать точное описание заказа (авторы и название статьи, год, номер журнала, страницы) по адресу agrobiol@mail.ru, указав Ваши фамилию, имя, отчество (полностью), город, где проживаете, контактные e-mail и телефон;
- ❖ получить из редакции по своему контактному e-mail подтверждение заказа (с присвоенным ему номером);
- ❖ оплатить услугу, указав в платежном документе в графе «Назначение платежа» присвоенный заказу номер и Ваши фамилию, имя, отчество.

Отписки высылаются на Ваш контактный e-mail после зачисления оплаты на счет редакции.

Банковские реквизиты редакции:

Получатель:

ИНН 7708051012 Редакция журнала «Сельскохозяйственная
биология», Марьиноорощинское ОСБ 7981, г. Москва,
р/с 40703810638050100603

Банк получателя:

Сбербанк России ОАО г. Москва,
БИК 044525225,
к/с 30101810400000000225

В назначении платежа укажите номер заказа, Ваши фамилию, имя, отчество.

Стоимость услуги:

- ❖ один отиск — 120 руб.,
- ❖ не более шести отписок (абонемент) — 360 руб.,
- ❖ не более двенадцати отписок (абонемент) — 700 руб.

Цены приведены с учетом НДС 10 %. Абонементное обслуживание предполагает предоставление указанного числа отписок за период не более каждого текущего года по предоплате.

E-mail для заказа электронных отписок — agrobiol@mail.ru

© Электронные отписки являются интеллектуальной собственностью редакции журнала «Сельскохозяйственная биология». Внесение в них каких бы то ни было изменений и дополнений не допускается. Перепечатка, тиражирование, размещение в средствах информации, в том числе электронных и сети Интернет, а также коммерческое распространение возможны только с разрешения редакции.