



**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ В ТРАДИЦИОННИ И
НОВОСЪЗДАДЕНИ ГЕНОТИПИ ДОМАТИ С ПОМОЩТА НА ДНК МАРКЕРИ
DETERMINING GENETIC VARIABILITY IN TRADITIONAL AND NEWLY
CREATED GENOTYPES WITH THE HELP OF DNA MARKERS**

**М. Ангелов*, Б. Божинов
M. Angelov, B. Bojinov**

***E-mail: m.angelov@gmail.com**

Abstract

As tomatoes are one of the most important vegetable crops, the breeding of new cultivars is of major importance in order to respond to the rising demands of consumers and producers. The aim of the study was to test if the ISSR marker system is a viable tool for characterizing the genetic variability in genotypes, used in a breeding program aimed at improving the fruit antioxidant contents. Eight genotypes with varying levels of antioxidant content in the fruit were examined. The results we obtained from our analysis show that the ISSR marker system could be successfully applied for the needs of breeding programs, seed production and genotyping of existing and newly created tomato cultivars.

Key words: *Solanum lycopersicum*, molecular markers, ISSR, Inter-Simple Sequence Repeats.

ВЪВЕДЕНИЕ

Редица автори отбелязват, че се наблюдава процес на намаляване на генетичното разнообразие при културния домати. Според Miller and Tanksley (1990) в домати сортове се наблюдават само около 5% от генетичното вариране в техните диви родственици.

Същевременно в повечето изследвания се установява по-високо разнообразие в местните сортове (Mazzucato, 2008; Archak et al., 2002). Bredemeijer et al. (2002) например изследват 500 образеца от Европейската база данни за домати с помощта на 20 праймерни двойки и установяват, че в 30% от тях се наблюдава някакво ниво на хетерогенност. В повечето сортове, в които е открита хетерогенност, шестте изследвани образеца за сорт се разделят на две или три групи.

Kochieva et al. (2002) използват ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) – маркерната система за анализ на 54 генотипа. С комбинация от 14 ISSR праймера авторите получават 304 полиморфни фрагмента, които позволяват

изготвянето на уникален профил за всеки от тестваните образци. Изследването потвърждава и малките разлики в генотипа на изпитаните сортове. Сходни резултати получават и Tikunov et al. (2003) при сравнително характеризирани на *Lycopersicon esculentum* и набор от диви видове.

С цел определяне на приложимостта и ефективността на ISSR метода за определяне на генетичното разнообразие при домата Terzopoulos et al. (2008) подлагат на анализ 41 образца (33 гръцки примитивни форми, 3 едроплодни и 3 дребноплодни сорта, както и два образца от *S. pimpinellifolium* с произход от Перу).

Генетичното сходство варира от 0,56 до 0,95, като интересно е откритието, че средното вариране в гръцките примитивни форми (0,838) е сходно с това в съвременни сортове (0,854). Сходни резултати бяха получени и в предходно наше изследване (Bojinov and Danailov, 2009), в което използвахме ISSR технологията за идентификация на 24 генотипа от българска селекционна колекция.

Приложимостта на ISSR маркерите е потвърдена и от Rodrigues et al. (2011). С помощта на 10 ISSR маркера те анализират 96 образца от зеленчуковата ген-банка на Федералния университет на Викоза (BGH-UFV).

На базата на проведен анализ на достъпната литература, както и на липсата на предварителна информация за изследваните генотипи, за провеждане на това изследване избрахме ISSR маркерната система.

Целта на изследването беше да се характеризира генетичното разнообразие в набор от селекционни образци, поддържани в Института по зеленчукови култури (ИЗК „Марица“), и да се определи хомогенността на избраните форми.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За целите на изследването бяха използвани линии 975, 984, 1116, 1140, 21 β , 53 β , както и сортовете ИЗК Аля и Пловдивска каротина, всички принадлежащи към вида *Solanum lycopersicum*. Образците се поддържат в Института по зеленчукови култури „Марица“ и се използват в селекционна програма като донори на гени за антиоксидантни вещества (аскорбинова киселина, ликопен, бета-каротен, антоцианини и др.) и други характеристики на плода. Някои от тези линии служат и като ценни източници на признаци с агрономическо значение. Използваните образци са хомогенизирани и стабилизирани по основните апробационни признаци за растенията и плодовете, и контролирани за главните им биохимични вещества. За екстракция на ДНК бяха използвани само растенията, отговарящи напълно на фенотипните описания по UPOV за съответния сорт или линия.

Праймерите, използвани за извършване на ISSR анализа (табл. 1), бяха подбрани от набор от праймери, показали високи нива на възпроизводимост и потенциал за идентификация на полиморфизми в предишни изследвания в катедра „Генетика и селекция“ на АУ – Пловдив.

Таблица 1

ДНК последователност и температура на хибридизация (Тх) на използваните ISSR праймери

Table 1

DNA sequence and hybridization temperature (Th) of used ISSR primers

Праймер Primer	ДНК посл. DNA seq.	Дължина (нд) Length (bp)	Тх (°C) Th (°C)
ISSR 1	(AG)8C+TC	19	56
ISSR 2	(AG)8C+TG	19	56
ISSR 3	(GA)8T	17	50
ISSR 4	(AC)8G	17	55
ISSR 5	(GA)8YC	18	53
ISSR 6	(AG)8YT	18	51
ISSR 7	(GT)8YC	18	53

Използваният цикъл за PCR реакцията започва с денатурация при 94°C за 3 минути, последван от 40 цикъла на 94°C – 1 минута, Тх – 45 секунди, 72°C – 45 секунди, последвани от финално удължаване при 72°C за 4 минути (Тх – температура на хибридизация, изчислена по Kochieva et al. (2002). Продуктите от PCR реакцията бяха анализирани чрез разделяне в 2%-ов агарозен гел и визуализиране с етидиев бромид.

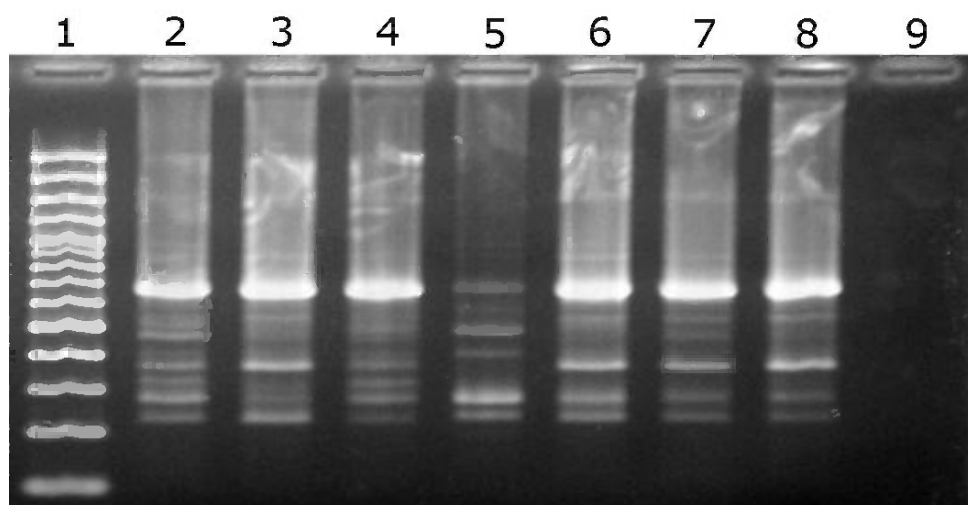
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От всички образци беше изолирана висококачествена геномна ДНК с помощта на стандартен набор от химикали на Omega Bio-Tek. Получената при екстракцията геномна ДНК беше със сходно качество и в приблизително еднакви количества (в повечето случаи между 300 и 500 µg).

Бяха изследвани 7 индивидуални растения от всеки образец, за да се потвърди възможността на избраната маркерна система за разкриване на достатъчен брой полиморфизми във всеки от тях. Резултатите от това първоначално изследване показаха възможността на избраната маркерна система да различи дори индивидуални растения в генотипите.

За оценка на хетерогенността, съществуваща във всеки от изследваните генотипи, беше използван пълният набор ISSR праймери, като бяха анализирани всички 7 растения на образец и се следеше за появата на фрагменти, характерни за всяко отделно растение. Интересно е, че никой от генотипите не показва абсолютно еднообразие в профилите на индивидуалните растения (както се очаква при типично самоопрашващ се вид). При всички образци поне едно от растенията се отклоняваше от останалите в получения профил. Пример за гореизложеното може да се види от фиг. 1, на която ивицата при около 380 нд липсва в четвъртото растение (пети старт), но присъства в профилите на останалите растения от линия 53β.

Същевременно при това растение се наблюдава ясно видим фрагмент при 410 нд, който не е характерен за останалите индивиди от същата линия.

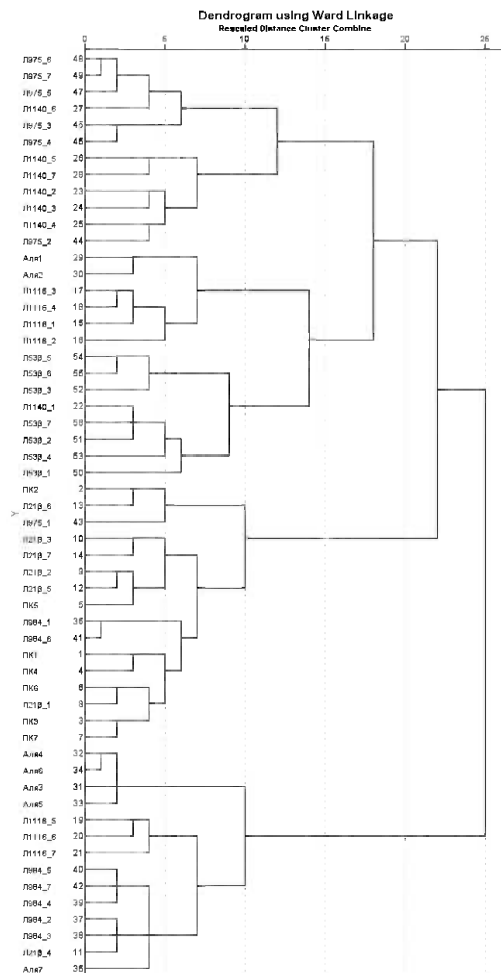


Фиг. 1. Резултати, получени с праймер ISSR1. Слот 1: стандартна ДНК, с по-интензивни ивици при 500 и 1000 нд; Слотове 2–8: индивиди от линия 53 β ; Слот 9: контрола

Fig. 1. Results with primer ISSR1. Lane 1: standard sized DNA, with stronger bands at 500 and 1000 bp; Lane 2–8: individual plants from line 53 β ; Lane 9: control

Въз основа на генотипното профилиране на всички образци с помощта на трите ISSR праймера (ISSR 1, 2 и 3), дали най-много полиморфни фрагменти (общо 55), беше проведен клъстерен анализ. Резултатите от този анализ съответстват в значителна степен на първоначално очакваните разпределения (фиг. 2).

Групирането на отделните индивиди отговаря на техния известен произход, като само отделни индивиди преминават в други групи. Интересни изключения в това отношение са образците “ИЗК Аля”, Линия 1116 и Линия 984, при които растенията са разделени в две ясно разграничени групи.



Въпреки че образците са стабилизирани и подбраните за изследване растения бяха хомогенни по фенотипните си белези, в индивидите, принадлежащи към всеки образец, бяха открити генотипни разлики. Възможно обяснение на несъответствието между фенотипната хомогенност и идентифицираната генотипна хетерогенност е, че откритите хетерозиготни локуси не са свързани с белезите, по които е извършен подборът на генотипите по време на селекционния процес. Поради спецификата на работа на избрания метод е възможно също така получените амплифицирани фрагменти да се намират в некодиращи региони и/или в локуси с количествен ефект (QTLs), които имат малко влияние върху генотипа, както е предложено от Bredemeijer et al. (2002) по отношение на получените от тях аналогични резултати.

Фиг. 2. Дендрограма, показваща разпределението на индивидите въз основа на генетичното сходство между тях
Fig. 2. Dendrogram of genotype distribution based on genetic similarity between individuals of all genotypes

ИЗВОДИ

1. ISSR маркерната система е в състояние ефективно да идентифицира различни генотипи домати дори при висока хомогенност на фенотипните прояви. Приложението на ISSR системата позволява да се открият не само полиморфизми, достатъчни за различаване на отделни образци, но и за идентифициране на отклоняващи се индивиди в дадена популация. Това показва големите възможности на тази технология за

откриване на разлики дори и в образци, чиито геноми са силно хомогенни, каквито са тези от *Solanum lycopersicum*.

2. Представеният клъстерен анализ показва, че с помощта на ISSR системата би било възможно различаването не само на представителите на отделните образци, но и откриването на индивиди, които се различават в метаболитните си профили.

3. Тъй като системата е надеждна, ефикасна, бърза, лесна и не на последно място евтина за приложение, тя е много добър кандидат за приложение в селекционните програми при доматиите.

LITERATURE

Archak, S., Karihaloo, J., and Jain, A., 2002. RAPD markers reveal narrowing genetic base of Indian tomato. Current Science, 82(9).

Bojinov, B. & Danailov, Z. P., 2008. Applicability of ISSRs for genotype identification in a tomato breeding collection, in IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 830, pp. 63–70.

Bredemeijer, G.; Cooke, R.; Ganai, M.; Peeters, R.; Isaac, P.; Noordijk, Y.; Rendell, S.; Jackson, J.; Röder, M.; Wendehake, K. & others, 2002. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties, Theoretical and Applied Genetics 105(6–7), pp. 1019–1026.

*Kochieva, E. Z.; Ryzhova, N. N.; Khrapalova, I. & Pukhalskyi, V., 2002. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis, Russian Journal of Genetics 38(8), pp. 958–966.*

*Mazzucato, A.; Papa, R.; Bitocchi, E.; Mosconi, P.; Nanni, L.; Negri, V.; Picarella, M. E.; Siligato, F.; Soressi, G. P.; Tiranti, B. & others, 2008. Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces, Theoretical and Applied Genetics 116(5), pp. 657–669.*

*Miller, J. and Tanksley, S., 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. Theoretical and applied genetics, 80(4), pp. 437–448.*

*Rodrigues, G. B.; Elsayed, A. Y. & da Silva, D. J., 2011. Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.), Revista Brasileira de Ciências Agrárias 6(2), pp. 243–252.*

*Terzopoulos, P. & Bebeli, P., 2008. DNA and morphological diversity of selected Greek tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces', Scientia horticulturae 116(4), pp. 354–361.*

*Tikunov, Y. M.; Khrustaleva, L. & Karlov, G., 2003. 'Application of ISSR markers in the genus *Lycopersi*.*

**Рецензент – проф. дсн Дияна Светлева
E-mail: svetleva@yahoo.com**