

**Эффективность SSR- и ISSR-маркеров  
для оценки генетического полиморфизма сортов  
и гибридов хризантемы садовой (*Chrysanthemum × hortorum* Bailey)**

**The efficiency of SSR and ISSR markers  
for the assessment of genetic polymorphism of varieties  
and hybrids of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum × hortorum* Bailey)**

Якушина Л. Г., Шхалахова Р. М.

Yakushina L. G., Shhalahova R. M.

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук» г. Сочи, Россия.  
E-mail: Vishnya584@yandex.ru

Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Sochi, Russia

**Реферат.** Проведен генетический анализ пяти сортов и 17 гибридов коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СЦ РАН) г. Сочи с использованием ДНК-маркеров: SSR-анализ и ISSR-анализ. При помощи данных маркеров удалось выявить генетические отличия исследуемых образцов. Параллельно проведен анализ фенотипических признаков, который позволил разделить исследуемые растения на фенотипические группы. При обработке генотипических и фенотипических групп выявлено пять родственных групп исследуемых растений. SSR- и ISSR-маркеры позволяют оценивать генетический полиморфизм сортов и гибридов хризантемы садовой.

**Ключевые слова.** Генетические дистанции, полиморфизм, селекция, хризантема. SSR-анализ, ISSR-анализ.

**Summary.** The genetic analysis of five varieties and seventeen hybrids of the collection of the Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (FRC SSC RAS) of Sochi was carried out using DNA markers: SSR analysis and ISSR analysis. With the help of these markers, it was possible to identify the genetic differences of the studied samples. At the same time, the analysis of phenotypic traits was carried out, which allowed us to divide the studied plants into phenotypic groups. When processing genotypic and phenotypic groups, five related groups of the studied plants were identified. SSR-and ISSR-markers allow us to evaluate the genetic polymorphism of varieties and hybrids of *Chrysanthemum × hortorum*.

**Key words.** Breeding, chrysanthemum, genetic distances, ISSR-analysis, polymorphism, SSR-analysis

Селекция хризантемы (*Chrysanthemum × hortorum*) насчитывает тысячелетнюю историю. В наши дни эта культура также востребована и представляет экономический интерес. Спрос на новые сорта постоянно растет. Выводятся новые сорта, различные по габитусу, срокам цветения, окраске и форме, адаптированные к условиям произрастания (Адрианов, 2004; Недолужко, 2004; Мохно и др., 2017).

В Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СЦ РАН) г. Сочи поддерживается коллекция хризантем, проводятся исследования по сортоизучению и выведению новых сортов (Рындин, Слепченко, 2019; Клемешова, Габуева, 2020).

Огромное хозяйственное значение имеют разнообразные сорта, которые используются в качестве срезанных цветов, горшечных растений или садовых многолетников. Существует богатый ассортимент сортов, в котором хризантемы раскрывают удивительные цвета, разнообразные формы соцветия и куста. Помимо декоративных качеств, хризантемы обладают многими целебными свойствами, используемыми в медицине. Потребности рынка провоцируют к постоянному поиску новых методов селекции и размножения для получения большого количества растений в относительно короткие сроки (Мохно и др., 2017).

Современные методы маркер-опосредованного отбора могут использоваться для ускорения селекции. В настоящее время актуальны исследования по изучению генетического разнообразия, идентификации и паспортизации селекционных достижений. Они помогают сократить сроки создания сорта. Генетический паспорт сорта также является актуальной разработкой, так как он позволяет защитить авторские права селекционера. Эти паспорта могут разрабатываться на основе ДНК-маркеров (Клименко и др., 2020).

Маркер-вспомогательная селекция получила развитие в последние десятилетия (MAS, marker-assisted selection) и используется в селекционных программах экономически развитых стран в качестве методического приема для интенсификации селекционных процессов. В 1980-х гг., с начала своей разработки, молекулярные маркеры определили активное развитие молекулярной генетики и селекции растений. К молекулярным маркерам относятся ДНК-маркеры, а также изоферменты и другие маркерные системы, основанные на полиморфизме белков (Хлесткина, 2013). Применение молекулярных маркеров в практической селекции обозначается термином MAS (marker-assisted selection). В русском языке этот термин переводится как «молекулярная селекция», «маркер-вспомогательная селекция», или «селекция с использованием молекулярных маркеров». При создании новых сортов и селекционных линий используется известный маркер – признак, выделенный при идентификации сцепления между маркером и геном, контролирующим признак. Одной из задач селекционеров становится установление ассоциации маркер – признак, а далее при создании новых генотипов могут использоваться традиционные методы селекции (скрещивание, самоопыление, беккроссирование, отбор). ДНК-маркерный анализ можно проводить на любой стадии развития (от семян до взрослого растения) в лабораторных условиях. При этом методическом приеме нет необходимости проведения оценки фенотипа в полевых условиях в определенное время года в условиях региона (Леонова, 2013).

Для выявления уровня полиморфизма и оценки возможности использования ДНК-маркеров для генотипирования коллекции хризантемы мы использовали метод SSR-анализа и ISSR-анализа. SSR – это микросателлитные маркеры, которые являются локус-специфичными, характеризуются высоким полиморфизмом и широко используются для генотипирования различных культур. ISSR-маркеры мультилокусного типа, не являясь локус-специфичными, амплифицируют фрагменты разных длин до 5000 п.н., в регионах генома, расположенных между микросателлитами. Широко применяются для генотипирования, особенно в случаях отсутствия локус-специфичных маркеров (Feng et al., 2016; Luo et al., 2018).

Целью нашего исследования было проанализировать генетическое разнообразие гибридов и сортов хризантемы садовой и выявить родственные связи между ними.

Объектами исследования стали 17 гибридов и 5 сортов хризантемы коллекции ФИЦ СИЦ РАН.

ДНК была выделена из свежих листьев хризантемы. Содержание ДНК измеряли с помощью наноспектрофотометра. Методами исследования стали классическая ПЦР с использованием 5 пар SSR-праймеров, разработанных для хризантем (Feng et al., 2016) и ISSR-праймеры. Для SSR-анализа к 20 мкл реакционной смеси для ПЦР добавляли 10 мкл реакционного буфера с полимеразой горячего старта (BioLabmix, Россия), 0,2 мкл каждого праймера (10 мкм), 1 мкл ДНК (20 нг мкл<sup>-1</sup>) и воду, обработанную DEPC. Использовалась двухступенчатая программа амплификации: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг 40 циклов по 15 сек при 50–60 °С и элонгация при 72 °С в течение 7 мин. Разделение SSR-фрагментов проводилось на усовершенствованной системе QIAxcel (Quiagen, США) с набором высокого разрешения в соответствии с инструкциями производителя. Визуализация результатов – методом электрофореза в агарозном геле.

Электрофореграммы амплифицированных фрагментов ПЦР анализировали с составлением бинарных матриц, в которых отмечали фрагменты, как присутствующие (1), так и отсутствующие (0). В анализе использовались только четкие и воспроизводимые полосы, которые не различаются между репликами.

Кластерный анализ проводился с применением программного обеспечения GeneAlex3.2, Darwin6.0, Dendroscope.

Праймеры SSR показали высокий полиморфизм по всем тестируемым генотипам (рис. 1, 2).

В результате было получено 39 амплифицированных фрагментов в диапазоне 2100–550 (в среднем 7,8 полос на праймер) как для сортов, так и для гибридов. В результате исследования удалось выявить высокий уровень полиморфизма у всех изученных групп. Маркеры SSR-6818 и SSR-357 генерировали наибольшее количество полиморфных полос. Также генетический анализ был произведен при помощи ДНК-маркеров ISSR (рис. 3, 4). Данный вид маркеров также свидетельствует о высоком уровне полиморфизма исследуемой культуры.

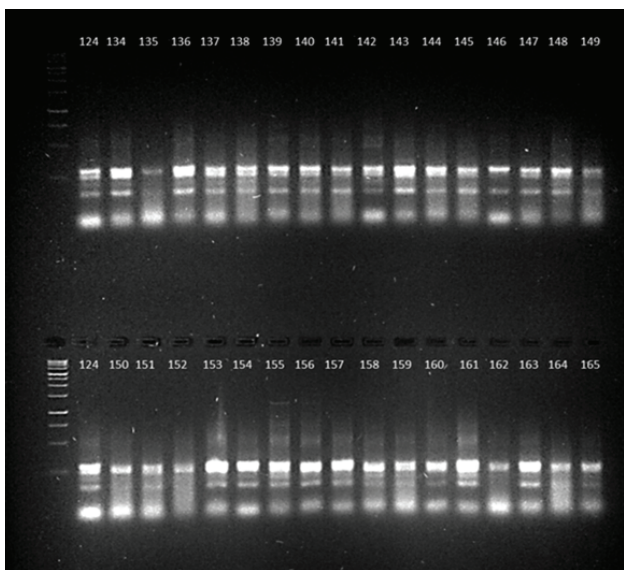


Рис. 1. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов хризантемы, полученных по маркеру SSR-357.

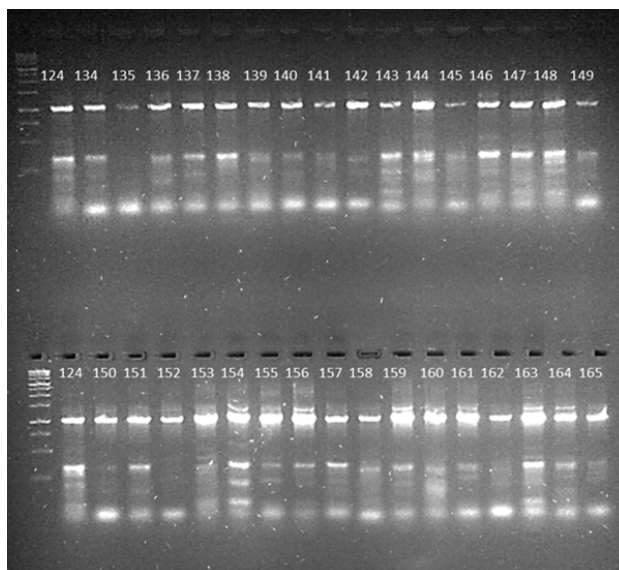


Рис. 2. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов хризантемы, полученных по маркеру SSR-6818.

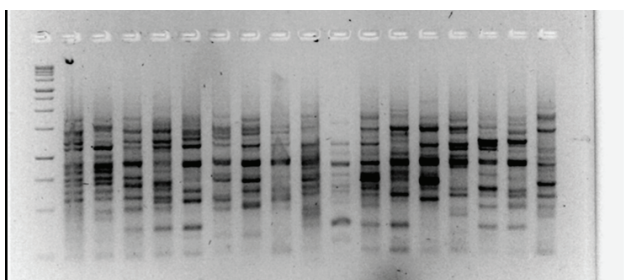


Рис. 3. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов хризантемы, полученных по маркеру ISSR-1.

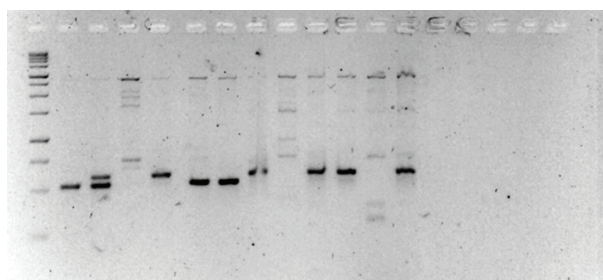


Рис. 4. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов хризантемы, полученных по маркеру ISSR-7.

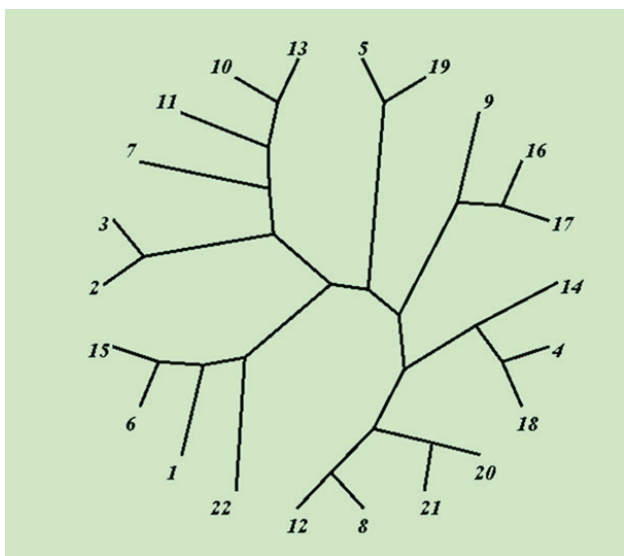


Рис. 5. Дендрограмма генетических расстояний между гибридами и сортами на основе анализа 5 микросателлитных маркеров.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что маркеры SSR и ISSR показали высокий полиморфизм для изучения генетического разнообразия коллекции хризантемы.

На основе полученных данных построены дендрограммы и выявлены генетические дистанции в группе селекционных гибридов и сортов хризантемы (рис. 5, 6).

По фенотипическим признакам выделены группы растений, сходные между собой (рис. 7).

Генетический анализ также подтверждает близость растений со сходными морфологическими признаками. При системном анализе возможно отыскать коррелятивные закономерности между наличием определенных аллелей и признаками хризантемы.

Кластерный анализ позволил разделить изучаемые генотипы на 5 групп: 1 – ‘Mona Lisa’; ‘Sadko’; P-120-5; И -34-5; C-3-1 (Сеянцы от ‘Mona Lisa’); P-192-12; 2 – P-196-15; P-196-27; ‘Izetka

Bernstein'; P-194-12; 3 – P-195-8; P-195-9; Ж-10-4 (№23); Н-103-7; P-194-13; 'Simfoniya'; 'Etrusko'; 4 – P-201-1; P-196-25; P-196-26; 5 – P-30-24; P-195-7 (рис. 8).

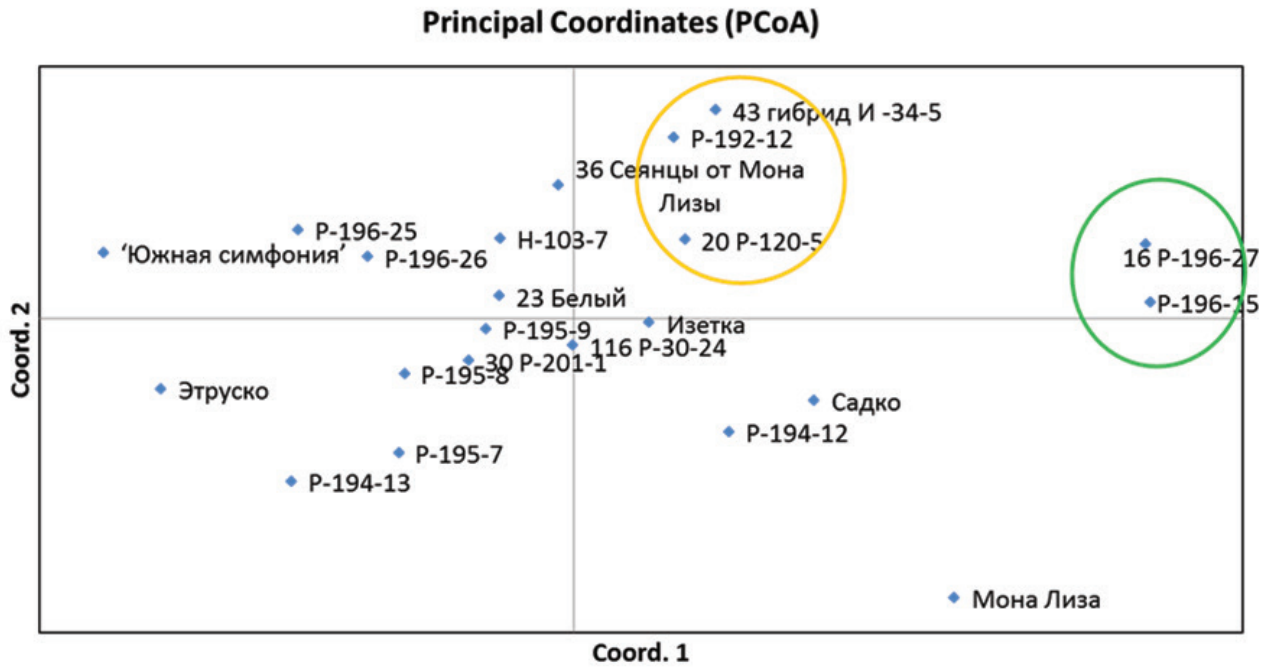


Рис. 6. Генетические дистанции между гибридами на основе анализа 5 микросателлитных маркеров.

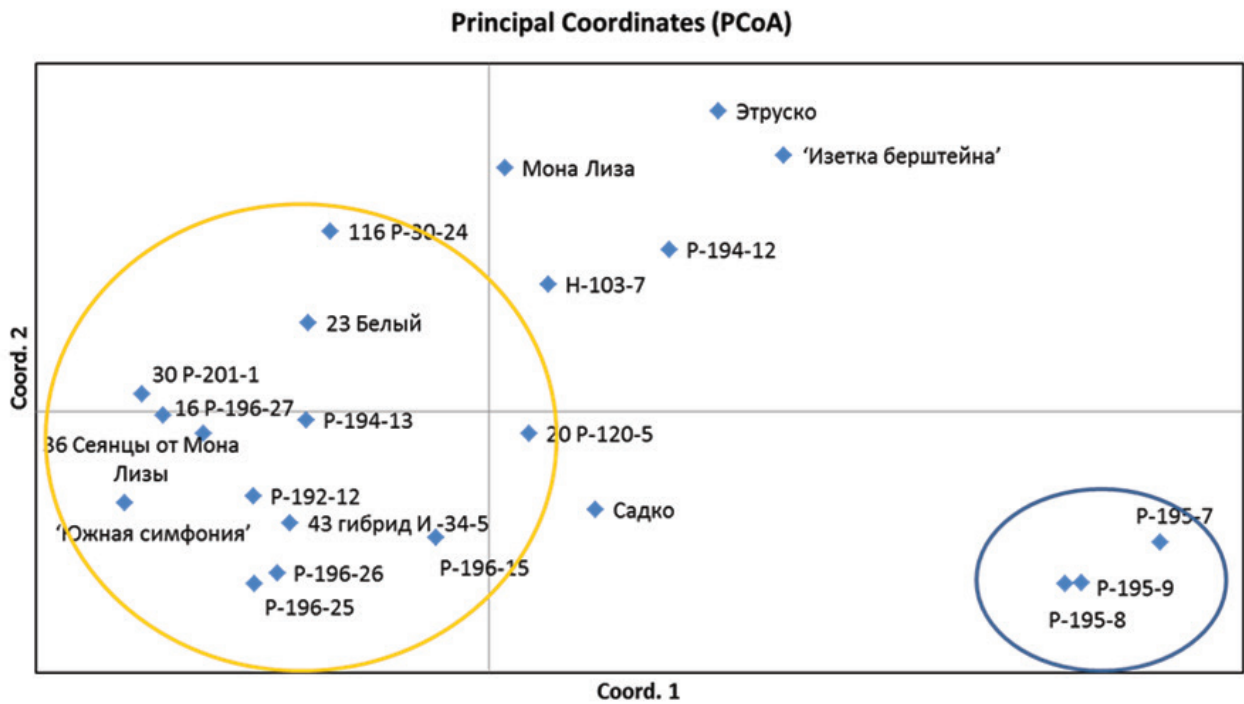


Рис. 7. Дистанции между гибридами на основе анализа 16 фенотипических признаков.

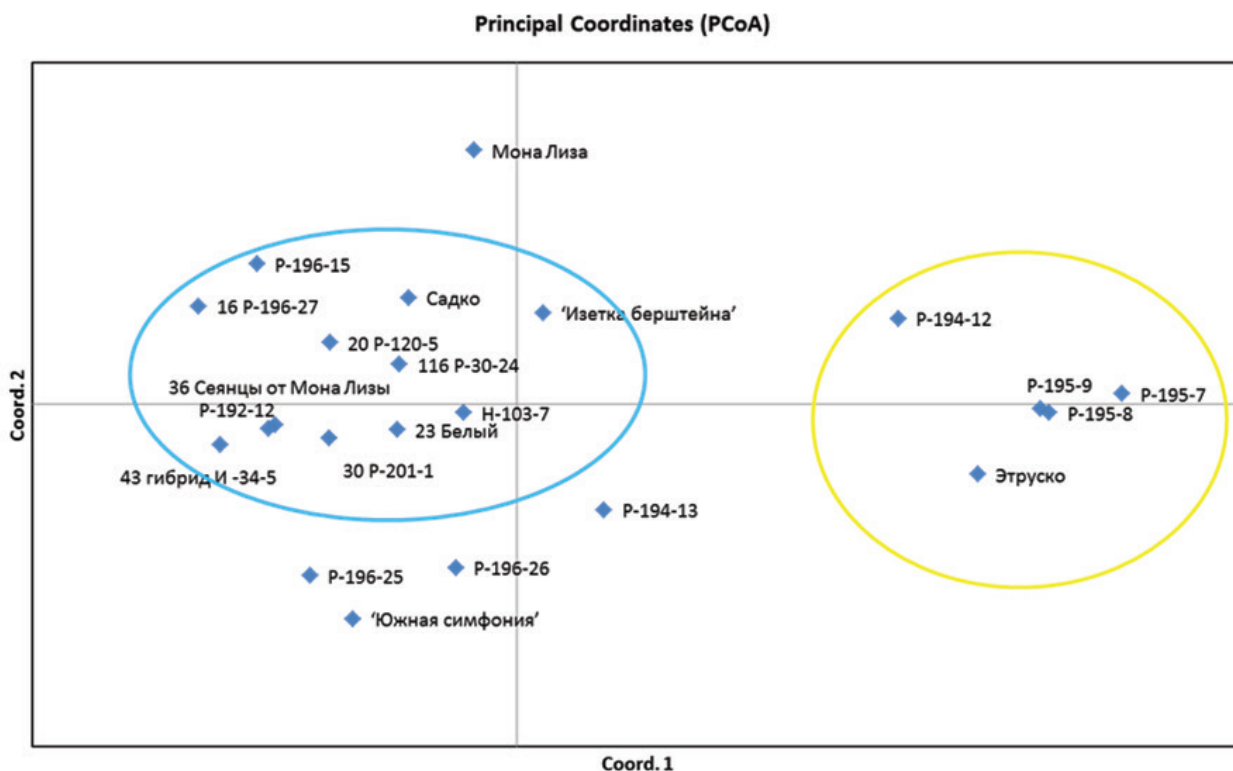


Рис. 8. Генетические дистанции между гибридами на основе анализа 5 микросателлитных маркеров и 16 фенотипических признаков.

При совокупности генетических и фенотипических особенностей место в кластере уточняется. Проведенный анализ позволяет сделать вывод о наличии высокого уровня полиморфизма между исследуемыми сортами и гибридами. Самый высокий полиморфизм выявлен с помощью праймера SSR6818 и SSR357. Наименьший – зафиксирован с использованием праймера SSR320.

**Благодарности.** Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СИЦ РАН № 0492-2021-0009 «Изучение механизмов наследования значимых признаков и создание новых высокоэффективных сортов субтропических и цветочно-декоративных культур по комплексу хозяйственно ценных признаков» и 0492-2021-0006 «Поиск и исследование молекулярно-генетических механизмов и разработка современных инструментов создания качественно новых генотипов цветочно-декоративных, субтропических и южных плодовых культур».

#### ЛИТЕРАТУРА

- Адрианов В. Н.** Хризантемы в теплице // Гавриш, 2004. – № 5. – С. 35–37.
- Клемешова К. В., Габуева Т. Ю.** Основные декоративные признаки сортов *Chrysanthemum × hortorum* Bailey в условиях влажных субтропиков России // Субтропическое и декоративное садоводство, 2020. – Вып. 73. – С. 43–50. DOI: 10.31360/2225-3068-2020-73-43-50
- Клименко И. А., Костенко С.И., Мавлютов Ю. М., Шамустакимова А. О.** Эффективность SSR- и Paws-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 2020. – 181 (3). – С. 100–109. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109
- Леонова И. Н.** Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013 – Т. 17, № 2. – С. 314–325.
- Мохно В. С., Братухина Е. В., Якушина Л. Г.** Селекция хризантемы в условиях влажных субтропиков Краснодарского края // Субтропическое и декоративное садоводство, 2017. – Вып. 63. – С. 78–85.
- Недолужко А. И.** Биологические основы и методы создания исходного материала для селекции садовых хризантем на юге Приморья // Вестник ДВО РАН, 2004. – № 4. – С.74–77.

**Рындин А. В., Слепченко Н. А.** Генофонд цветочно-декоративных культур ФГБНУ ВНИИЦиСК: поддержание и пополнение коллекций // Научное обеспечение устойчивого развития плодового садоводства и декоративного садоводства: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию ВНИИЦиСК и 85-летию Ботанического сада «Дерево Дружбы» (23–27 сентября 2019 г., г. Сочи). – Сочи: ФГБНУ ВНИИЦиСК, 2019. – С. 311–318.

**Хлесткина Е. К.** Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013. – Том 17, № 4/2. – С. 1044–1054.

**Feng S., He R., Lu J., Jiang M., Shen X., Jiang Y., Wang Z., Wang H.** Development of SSR Markers and Assessment of Genetic Diversity in Medicinal Chrysanthemum morifolium Cultivars // Front. Genet., 2016. – Vol. 7. – P. 1–13. DOI: 10.3389/fgene.2016.00113

**Luo C., Chen D., Cheng X., Liu H., Li Y., Huang C.** SSR Analysis of Genetic Relationship and Classification in Chrysanthemum Germplasm Collection // Horticultural Plant Journal, 2018. – Vol. 4, № 2. – P. 73–82. DOI: 10.1016/j.hpj.2018.01.003.