

СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО

УДК 633.72+631.52(479)

doi: 10.31360/2225-3068-2022-80-78-84

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЧАЯ НА ЗАПАДНОМ КАВКАЗЕ

Мацькив А.О., Конинская Н.Г., Шуркина Е.С.

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,
г. Сочи, Россия, e-mail: matskiv_a@mail.ru

Чай *Camellia sinensis* (L.) Kuntze – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, он занимает второе место в мире по употреблению среди безалкогольных напитков. Для повышения эффективности селекции необходима полная характеристика генетических ресурсов чая на Кавказе, выявление генетического разнообразия и поиск маркеров, ассоциированных с важными селекционными признаками. Целью данного исследования был поиск и апробация молекулярных маркеров для характеристики генетических ресурсов чая на Западном Кавказе. В результате исследований выявлены эффективные ISSR- и SSR-маркеры, проведено генотипирование и выявлена генетическая структура базовой коллекции селекционных форм чая. Полученные результаты будут полезны для маркер-опосредованной селекции чая в России.

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, генотипирование, молекулярные маркеры, микросателлитный анализ, генетическое разнообразие.

Молекулярные технологии, такие как ISSR-, SSR-, SNP- генотипирование, QTLs-картирование, поиск генов-кандидатов *in silico* и их гомологов, анализ их экспрессии у разных сортов и другие, активно внедряются в селекцию различных сельскохозяйственных культур в мире, так как могут обеспечить повышение эффективности признак-ориентированной селекции древесных культур, в том числе и чая [1–4].

Чай *Camellia sinensis* (L.) Kuntze – одна из важнейших сельскохозяйственных культур в мире, занимает второе место по употреблению среди безалкогольных напитков [4]. В 2018 г. китайскими коллегами секвенирован геном двух сортов чая, и секвенирован транскриптом чая, что позволило разработать эффективные наборы молекулярных маркеров для характеристики геноресурсов [5, 6, 8, 9]. Однако верификация генетических маркеров, разработанных зарубежными коллегами, и ресеквенирование генома и транскриптома российских

генотипов чая по-прежнему являются актуальными задачами для понимания механизмов доместикации этой культуры в нетипичных регионах, а также для повышения эффективности селекции, направленной на устойчивость к абиотическим стрессам.

Доместикация культуры чая на Кавказе проходила поэтапно в течение 200 лет из Грузии в Краснодарский край, а затем и в республику Адыгея, которая на сегодняшний день является одним из наиболее северных регионов его культивирования в мире [2, 7]. Этот регион характеризуется достаточно экстремальными для чая экологическими условиями: понижениями температур в зимний период до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже, недостаточной влагообеспеченностью (менее 700 мм в год). При этом качество чайного сырья, производимого здесь, является очень высоким. К тому же чай в этом регионе выращивается без орошения, без применения средств химической защиты растений, что позволяет получать экологически чистую продукцию, в сравнении с регионами промышленного чаеводства в мире, такими как Китай, Индия, Шри Ланка, где чайные плантации обрабатываются пестицидами [2].

Таким образом, коллекция гермоплазмы чая на Кавказе может являться источником доноров хозяйственно-ценных признаков для мировой селекции чая. Для повышения эффективности селекции необходима полная характеристика генетических ресурсов чая на Кавказе, выявление генетического разнообразия и поиск маркеров, ассоциированных с важными селекционными признаками.

В связи с этим **цель данного исследования** – поиск и апробация молекулярных маркеров в базовой коллекции селекционных форм и популяций чая на западном Кавказе.

Объекты и методы исследований:

Растительный материал для исследований – базовая коллекция чая ФИЦ СЦ РАН:

- 1) сеянцы чая от свободного опыления, полученные в условиях Адыгеи (60 растений);
- 2) сеянцы сорта ‘Каратум’ и F1-потомство, полученное в результате его опыления пылью зимостойких сортообразцов, произрастающих в Адыгее (22 растения);
- 3) сеянцы сорта ‘Колхида’ (23 растения);
- 4) сеянцы чая от свободного опыления, полученные в условиях производственной плантации, заложенной китайским сортом ‘Кимынь’ (22 растения);
- 5) генотипы чая, отобранные на грузинских производственных плантациях района Озургетти (15 растений);
- 6) генотипы наиболее распространённых производственных популяций чая из Шри-Ланки (4 растения).

Всего исследовали 147 сортообразцов.

Кроме этих популяций проведён анализ данных генотипирования базовой коллекции мутантных форм, сортов и перспективных гибридов чая, созданных отечественными селекционерами (всего 106 генотипов) (работа была начата в 2018 г. на базе Института селекции плодовых культур, Дрезден, Германия).

Выделение ДНК и условия ПЦР. Полногеномную ДНК выделяли методом СТАВ, качество ДНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле, и концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе BioDrop μ Lite. Для генотипирования использовали 10 ISSR-праймеров, апробированных нами в первый год исследований на микропобегах чая (табл. 1). Амплификацию фрагментов ДНК проводили на приборе Mini-Amp (ThermoFisher Scientific). Объём реакционной смеси 15 мкл.

Состав ПЦР-смеси для ISSR-анализа: БиоМастер HS-Тaq ПЦР (2 \times) буфер (Биолабмикс) 7.5 мкл, праймер 0.7 мкл (из раствора 10 мкмоль), ДНК 1 мкл (из раствора 50–200 нг/мкл), вода для ПЦР. Программа ПЦР для ISSR-анализа: 95 °С – 5 мин, отжиг 40 циклов: 95 °С 15 сек, 52 °С – 20 сек, 72 °С – 2 мин, финальная элонгация 72 °С – 5 мин.

Таблица 1

**ISSR-праймеры для генотипирования чая,
Mondal, 2002; Roy and Chakraborty, 2009**

Тип #	Название маркера	Источник	Температура отжига, °С
ISSR1	810	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR2	–	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR3	813	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR4	815	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR5	851	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR6	873	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR7	879	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR8	880	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR9	ISSR13	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR10	ISSR14	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR11	ISSR15	Roy and Chakraborty 2009	52
ISSR12	ISSR814.1	Roy and Chakraborty 2009	52
SSR1	TM337	Wang et al. 2016	60
SSR2	TM447	Wang et al. 2016	60
SSR3	TM514	Wang et al. 2016	60
SSR4	TM341	Wang et al. 2016	60
SSR5	TM352	Wang et al. 2016	60
SSR6	TM415	Wang et al. 2016	60
SSR7	TM589	Wang et al. 2016	60

Визуализация продуктов ПЦР происходила в 2%-ном агарозном геле, с использованием 1x TAE буфера, разгон ампликонов осуществляли в течение 120–160 мин при напряжении 90V. Визуализацию продуктов проводили на приборе BlueCube300L (Serva).

Результаты и их обсуждение. Из 10 ISSR-праймеров по шести не удалось получить эффективную амплификацию и разделение фрагментов. У других четырёх праймеров размер амплифицированных фрагментов не превышал 3 000 пар нуклеотидов (рис. 1). Из изученных праймеров, несколько – № 7 (СТТСА)3, № 9 (АС)7С и № 12 (СТ)8TG – позволяют выявить диагностические фрагменты, характерные для родительских генотипов. В дальнейшем планируется использовать эти фрагменты для секвенирования и генотипирования F1 популяций.

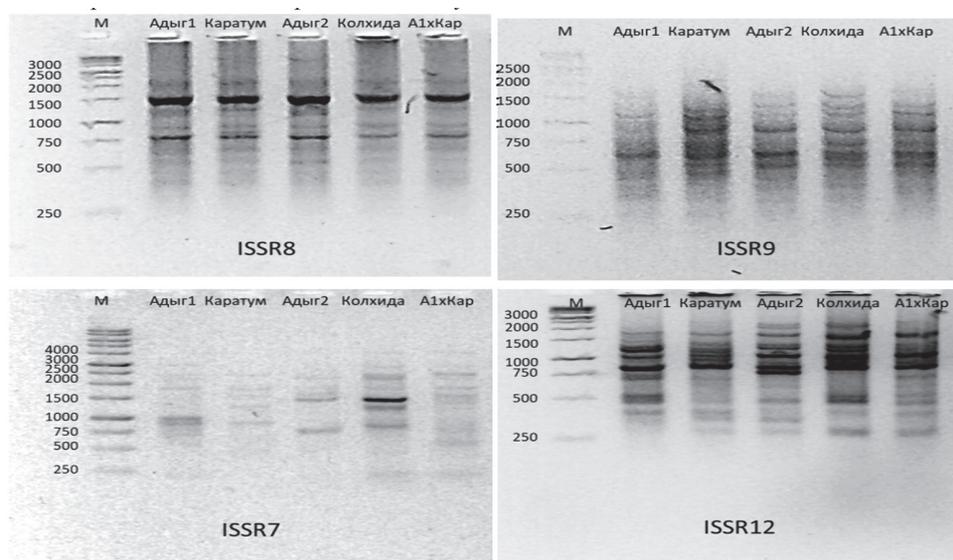


Рис. 1. Полиморфизм ISSR-фрагментов у родительских генотипов чая А1, А2, ‘Колхида’, ‘Каратум’

Для 35 из 106 образцов выявлены диагностические SSR-аллели (рис. 2). Впервые охарактеризовано генетическое разнообразие коллекции чая. Филогенетический анализ этой коллекции методом Neighbour joining показал, что все образцы делятся на три основных кластера. Самый большой кластер – смешанный – включает в себя два подкластера. В первый подкластер входят селекционные формы, клоны и образцы популяции ‘Кимынь’ производственной плантации (АО «Мацестинский Чай») (всего 37 генотипов). Во второй подкластер (27 генотипов) в основном входят мутантные формы, полученные методом радиационного

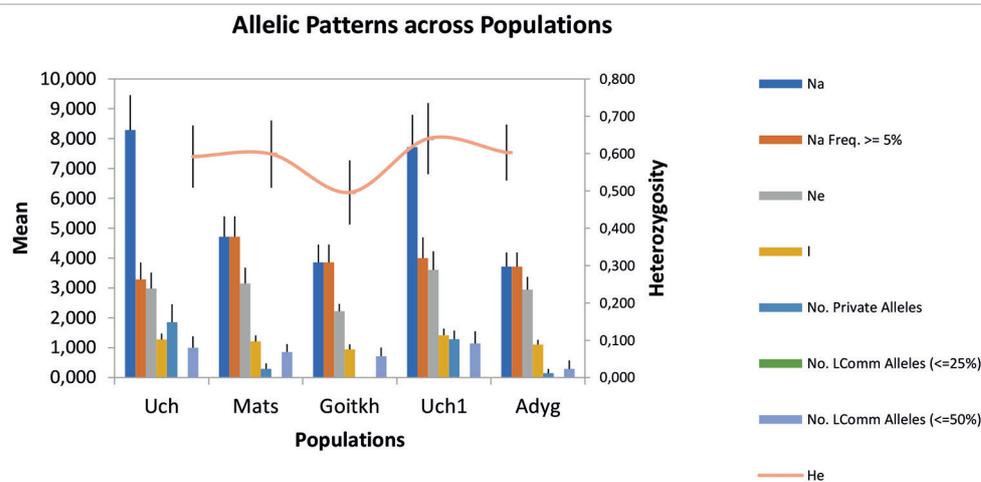


Рис. 2. Характер распределения аллелей в популяциях базовой коллекции чая ФИЦ СЦ РАН (n = 106).

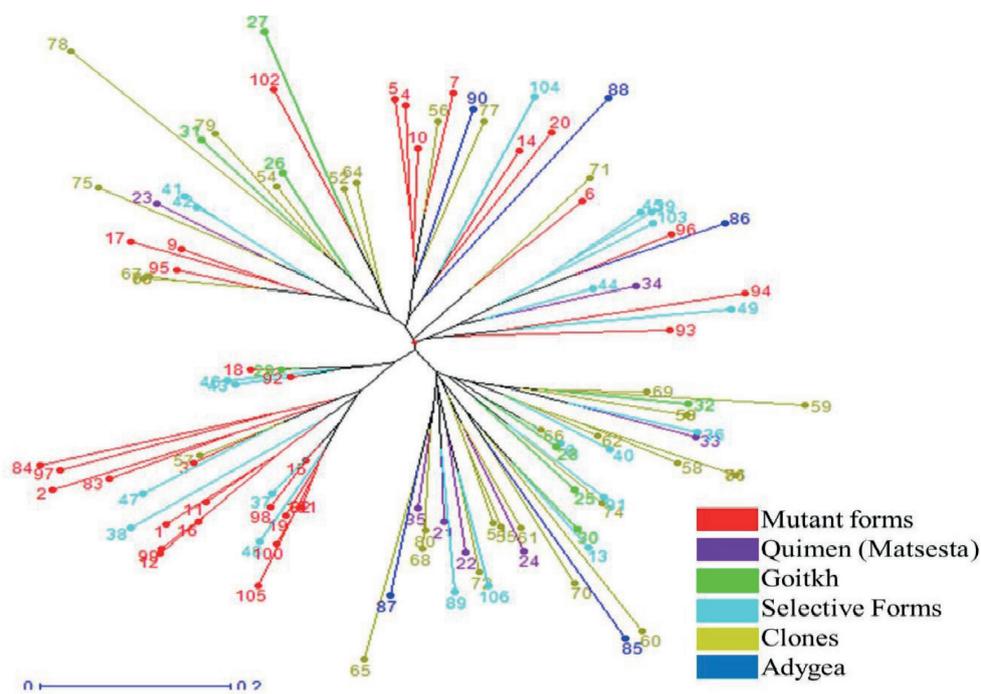


Рис. 3. Диаграмма генетических дистанций 106 генотипов базовой коллекции чая (мутантных форм, гибридов, клонов, сортов), генотипированной по 7 SSR-маркерам с использованием фрагментного анализа на ABI Prism

и химического мутагенеза грузинским селекционером Керкадзе И.Г. Второй большой кластер состоит из 32 образцов и, в основном, образован клонами и мутантными формами. При этом 2 адыгейских генотипа и три селекционных формы также попали в этот кластер. Третий кластер – самый немногочисленный, состоит из 10 генотипов, среди которых три мутантных формы, пять селекционных форм и два адыгейских генотипа (рис. 3).

Заключение. В результате исследования выявлены эффективные SSR- и ISSR-маркеры для характеристики генетического разнообразия чая. Выявлены генетические дистанции у генотипов чая, культивируемых на Западном Кавказе. Полученные данные будут полезны в дальнейших селекционных исследованиях.

Благодарности

*Исследования проведены при финансовой поддержке
Российского Научного Фонда проект № 18-76-10001*

Библиографический список

1. Chen J., Gao T., Wan S., Zhang Y., Yang J., Yu Y., Wang W. Genome-Wide Identification, Classification and Expression Analysis of the HSP Gene Superfamily in Tea Plant (*Camellia sinensis*) // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – № 19(9). – P. 2633. – <https://doi.org/10.3390/ijms19092633>.
2. Gvasaliya M.V. Spontaneous and induced cultivars and forms of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in the humid subtropics of Russia and Abkhazia, propagation and conservation *in vitro* // PhD thesis, Kuban State Agrarian University. – Krasnodar, Russia. – 2015.
3. Hao X., Horvath D.P., Chao W.S., Yang Y., Wang X., Xiao B. Identification and evaluation of reliable reference genes for quantitative real-time PCR analysis in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) // Int J Mol Sci. – 2014. – № 15. – P. 22155-2217. – <https://doi.org/10.3390/ijms151222155>.
4. Hao X., Tang H., Wang B., Yue Ch., Wang L., Zeng J., Yang Y., Wang X. Integrative transcriptional and metabolic analyses provide insights into cold spell response mechanisms in young shoots of the tea plant // Tree Physiol. – 2018. – № 38(11). – P. 1655-1671. – <https://doi.org/10.1093/treephys/tpy038>.
5. Li Y., Mi X., Zhao Sh., Zhu J., Guo R., Xia X., Liu L., Liu Sh., Wei Ch. Comprehensive profiling of alternative splicing landscape during cold acclimation in tea plant // BMC Genomics. – 2020. – № 21. – P. 65. – <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6491-6>.
6. Roy S.C. and Chakraborty B.N. Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis* O. Kuntze) cultivars revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. // Indian Journal of Biotechnology. – 2009. – № 8. – P. 370-376. – <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0559-3>.
7. Tuov M., Ryndin A. Perspective tea hybrids in subtropics of the Russian Federation // Subtropical and Ornamental Horticulture. – 2011. – № 44. – P. 101-109. – ISSN 2225-3068.
8. Vyas D., Kumar S. Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) clone with lower period of winter dormancy exhibits lesser cellular damage in response to low temperature // Plant Physiol. Bioch. – 2005. – № 43(4). – P. 383-8. – <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.02.016>.
9. Wang R.J., Gao X.F., Kong X.R. and Yang J. An efficient identification strategy of clonal tea cultivars using long-core motif SSR-markers // SpringerPlus. – 2016. – № 5. – P. 1152. – <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2835-8>.

10. Xia E.H., Tong W., Wu. Q., Wei S., Zhao J., Zhang Z.Z., Wei C.L., and Wan X.C. Tea plant genomics: achievements, challenges and perspectives // Horticulture research. – 2020. – № 7(7). – <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0225-4>.

**ANALYZING
THE GENETIC DIVERSITY OF TEA POPULATIONS
IN THE WESTERN CAUCASUS**

Matskiv A.O., Koninskaya N.G., Shurkina Ye.S.

*Federal Research Centre
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Sochi, Russia, e-mail: matskiv_a@mail.ru*

Camellia sinensis tea is one of the most important horticultural crops worldwide and tea is the second most consumed non-alcoholic beverage in the world. Characterization of tea genetic resources in Caucasus is necessary to identify markers associated with important horticultural traits and increase the breeding efficiency. The aim of this study was to search and test efficient molecular markers for characterizing tea genetic resources in the Western Caucasus. As a result of the research, effective ISSR- and SSR-markers were revealed, the genetic structure and diversity of tea were evaluated. The results will be useful for marker-assisted tea breeding in Russia.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, genotyping, molecular markers, microsatellite analysis, genetic diversity.