

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДНК-МАРКИРОВАНИЯ В ОЦЕНКЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Супрун И.И., канд. биол. наук, Токмаков С.В., канд. биол. наук, Степанов И.В.,
Лободина Е.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)

Реферат. Приведены результаты SSR-генотипирования 12 образцов персика (10 сортов вида *Prunus persica* и два генотипа, являющиеся персиковыми подвоями гибридного происхождения). Выявлено, что изученная выборка сортов персика обладает низким уровнем генетического разнообразия.

Ключевые слова: персик, генетическое разнообразие, ДНК-маркерный анализ

Summary. The results of SSR genotyping of 12 peach samples (10 varieties of *Prunus persica* and two genotypes that are peach rootstocks of hybrid origin) are presented. It was revealed that the studied choice of peach varieties has a low level of genetic diversity.

Key words: peach, genetic diversity, DNA marker analysis

Введение. Успехи молекулярной биологии, развитие методов молекулярного ДНК-маркирования, а также накопление экспериментальных данных в области молекулярно-генетических исследований обусловило появление технологии так называемой маркерной селекции (marker assisted selection – MAS). Данная технология позволяет проводить идентификацию и отбор генотипов, несущих целевые гены, минуя фенотипическую оценку, основываясь лишь на данных ДНК-анализа.

ДНК-маркеры могут быть наиболее востребованы в селекции по признакам, фенотипическая оценка которых является сложной процедурой, а также в селекционных программах, направленных на объединение ряда генов в одном генотипе. И при селекции одновременно на несколько хозяйственно полезных признаков MAS обнаруживает значительные преимущества над традиционными методами, так как отпадает необходимость отдельных полевых испытаний (например, на устойчивость к засухе, болезням и насекомым-вредителям) и можно одновременно отслеживать несколько аллелей, отвечающий за каждый из этих признаков [1]. Наряду с маркерной селекцией методы молекулярного ДНК-маркирования радикально нашли широкое применение в оценке генетического разнообразия, паспортизации и классификации сортов, картирования и определения физической природы генов и генетического мониторинга в селекции и генетике культурных растений.

Основные направления использования молекулярных маркеров при работе с генетическими ресурсами растений можно представить следующим образом:

- интродукция генетических ресурсов: поиск нового разнообразия для привлечения в коллекцию; контроль процесса включения нового образца в коллекцию (для предотвращения дублирования);
- структура коллекции: выяснение с использованием молекулярных маркеров внутривидовых связей; анализ родства видов и генотипов;
- создание коллекций на основе использования молекулярных маркеров: идентификация и регистрация образцов коллекции; формирование стержневых коллекций; контроль генетической стабильности при создании коллекций *in vitro*;

– охрана авторских прав: идентификация и паспортизация сортов, регистрация источников и доноров ценных признаков, решение спорных вопросов авторства сортов.

Среди методов молекулярного ДНК-маркирования широкое распространение нашли ДНК-маркеры, основанные на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома (SSR), а также на полиморфизме участков, локализованных между микросателлитными последовательностями (ISSR).

Источник полиморфизма микросателлитных последовательностей (SSR) – сайт-специфическое варьирование длины повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора. Наиболее привлекательные свойства SSRs – это кодоминантность, распределение по всему геному, простота манипуляций и значительная аллельная изменчивость, что обеспечивает доступность и высокую информативность этих маркеров. В настоящее время SSR-маркеры чаще всего используют для дифференцировки растений внутри вида, идентификации сортов, составлении генетических карт и в маркерной селекции, а также в работах по изучению генетического разнообразия и паспортизации сортов культурных растений.

Среди плодовых культур из семейства розоцветных наибольшее количество SSR-маркеров идентифицировано у персика и яблони. Для этих культур построены наиболее детальные молекулярно-генетические карты с использованием SSR ДНК-маркеров [2, 3]. Также следует отметить высокую степень изученности генома винограда, который входит в число секвенированных на сегодняшний день. В ходе секвенирования генома данной культуры было идентифицировано большое количество SSR-маркеров, что дает возможность выполнять работы, направленные на молекулярно-генетическую идентификацию генотипов.

Одна из наиболее крупных работ по идентификации и секвенированию SSR-локусов у яблони была выполнена Liebhard с соавторами [4]. Ее результатом стали 140 впервые идентифицированных микросателлитных локусов и праймерные пары, их фланкирующие. Даная маркерная система на настоящий момент – одна из наиболее широко используемых в исследованиях, направленных на оценку внутривидового генетического полиморфизма среди плодовых культур. Так L. Goulao and C.M. Oliveira (2001) провели оценку степени генетического родства и ДНК - фингерпринт в выборке из 41 сорта яблони с использованием SSR и ISSR ДНК-маркерной системы [5]. В результате работы все сорта были идентифицированы по уникальным аллельным комбинациям.

Одно из наиболее обширных исследований на сливе было проведено по изучению генетического разнообразия и взаимосвязи генетической структуры сортов с фенотипическими признаками у трех видов из Французской национальной коллекции сливы (*P. domestica* L., *Prunus cerasifera* Ehrh. и *Prunus spinosa* L.). Совместно с SSR маркерами в работе использовались маркеры хлоропластной ДНК. Данные, полученные по SSR, подтвердили гибридное происхождение *P. domestica* от *Prunus cerasifera* и *Prunus spinosa*. При этом SSR маркеры показали более высокий уровень полиморфизма, чем маркеры хлоропластной ДНК [6].

Микросателлиты, выделенные из ядерного и хлоропластного генома абрикоса, были использованы для изучения происхождения и генетического разнообразия европейских сортов сливы домашней [7]. Подобные исследования на трёх видах сливы (*P. domestica*, *P. cerasifera* и *P. spinosa*) были проведены с помощью SSR в сочетании с хлоропластными ДНК-маркерами [6]. Разработанные на ряде косточковых культур микросателлиты послужили надежной маркерной системой в филогенетической оценке генотипов в рамках подвида *P. domestica* subsp. *italic* [8]. Работы, основанные на применении микросателлитных (SSR) маркеров, продемонстрировали их высокую эффективность в качестве инструментов для молекулярно-генетической характеристики сортов различных плодовых культур. Тем не менее, исследований, направленных на изучение генофонда сливы домашней с помощью SSR локусов, в настоящее время в мире относительно мало, в связи с чем пред-

ставляется актуальным выполнение апробации SSR-маркеров, разработанных для других видов рода *Prunus*, применительно к сливе домашней, и выполнение генотипирования генофонда данной культуры.

Также, основываясь на использовании SSR маркеров, были проведены широкомасштабные исследования по генетическому разнообразию сортов персика – генетически наиболее изученного вида среди косточковых плодовых культур. Коллекция генетических ресурсов данной культуры, насчитывающая порядка 212 сортов и охватывающая широкий спектр внутривидовой изменчивости, была проанализирована с помощью 16 микросателлитных маркеров. Из всех изученных генотипов 195 имели уникальные фингерпринты. Разработанные на персике и черешне микросателлитные ДНК-маркеры были использованы для построения генетической карты *Prunus*. SSR были обнаружены во всех восьми группах сцепления на данной карте, и их распределение было относительно равномерным, что обеспечило широкий охват генома средней плотности 5.4 cM / SSR. Из набора были выделены двадцать четыре монолокусных SSR, высоко полиморфных у персика и равномерно распределенных по геному [9, 10].

Работы, основанные на применении микросателлитных (SSR) маркеров персика, продемонстрировали их высокую эффективность в качестве инструментов для молекулярно-генетической характеристики сортов как данного вида, так и для использования SSR-маркеров персика при изучении генетического полиморфизма других видов рода *Prunus* различных плодовых культур. В связи с высоким уровнем информативности данного типа ДНК-маркеров в задачи нашей работы входило изучение генетических взаимосвязей сортов персика и подвоев, используемых для косточковых культур.

Объекты и методы исследований. Материалом для исследования послужили сорта персика из коллекции генофонда плодовых культур юга РФ. Для экстракции ДНК методом ЦТАБ использовали следующий протокол.

Образец вносили в микропробирки и растирали с прогретым до 60 °С 2×ЦТАБ буфером, содержащим 2 % ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4 М хлористого натрия, 0,1 М Трис-гидрохлорида, 20 мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). При этом соблюдали соотношение 500 мкл буфера на 0,1 г ткани. Образцы центрифугировали 10 минут при 5 тыс. об./мин., отбирали супернатант и добавляли к нему 0,2 V 5×ЦТАБ буфера, содержащего 5 % ЦТАБ и 350 мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин. при 60 °С. После инкубации в пробирки с образцами вносили равный объем хлороформа, инкубировали 20 минут, центрифугировали 10 мин. при 5 тыс. об./мин., отбирали верхнюю фазу в чистую пробирку, добавляли равный объем буфера для преципитации (1 % ЦТАБ, 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. После преципитации ДНК осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1 М NaCl, 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА), добавляли 1 мл этилового спирта (96 %) и ставили в -20 °С на 2-3 часа. Далее образцы центрифугировали 10 минут при 13 тыс. об./мин., осадок промывали 70 % этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 50-100 мкл стерильной дистиллированной воды или 0,1*TE-буфера.

ПЦР-анализ проводили по стандартным методикам [11]. ПЦР-смесь включала: 40-50 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл 10xSE ПЦР-буфера (ООО «Сибэнзим»), 1 единицу активности Taq-ДНК полимеразы в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 1 мин. при 94 °С для начальной денатурации; следующие 35 циклов: денатурация 30 сек. при 94 °С; 30 сек. отжиг праймеров при температуре 58 °С; 30 сек. синтез при 72 °С. Финальный цикл синтеза при 72 °С – 5 мин. Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1.

При оценке результатов микросателлитного анализа матрица генетических дистанций была построена с использованием коэффициентов (индексов) подобия по М. Nei и W. Li (1979) [12]. Кластерный анализ выполнен невзвешенным попарно-групповым методом на основе арифметических средних (UPGMA) с использованием программ PAST version 2.17с, а также Free Tree Application 0.9.1.50 (ZDAT v. o. s.). Графическое построение дендрограммы проведено в программе TreeView (Win32) 1.6.6.

Обсуждение результатов. Было выполнено микросателлитное генотипирование 12 образцов персика из коллекций генетических ресурсов юга России с использованием маркеров по 6 микросателлитным (SSR) локусам. 10 из исследованных генотипов относятся к сортам вида персик обыкновенный (*Prunus persica*), два генотипа являются персиковыми подвоями гибридного происхождения. При работе использовали мультиплексный фрагментный анализ. На рис. 1-3 в качестве примера представлены результаты анализа сортов Никитский 75, Памяти Бабенкова и Обильный по использованным в работе SSR-маркерам.

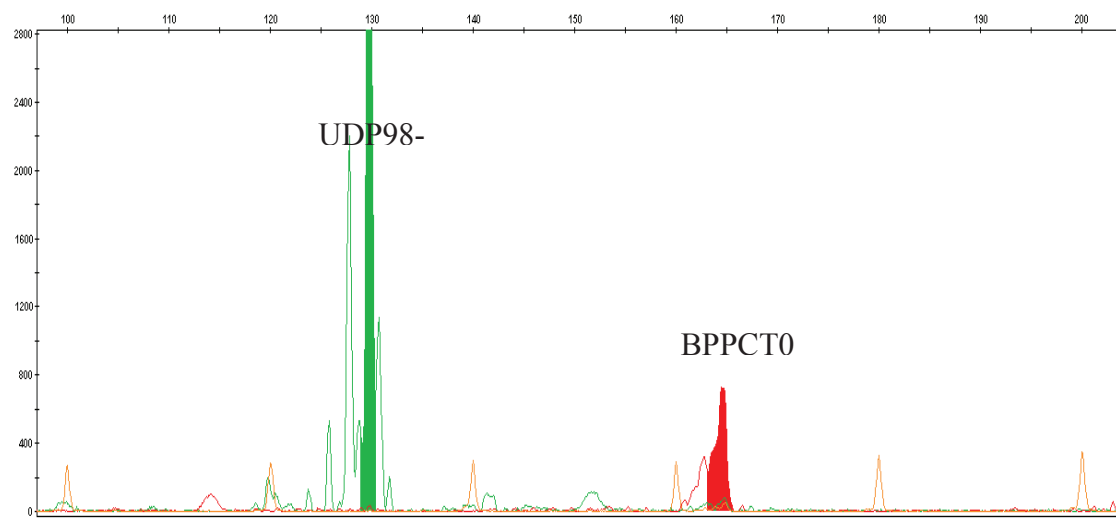


Рис. 1 Результаты анализа сорта персика Никитский 75 по микросателлитным маркерам UDP98-409 и BPPCT017

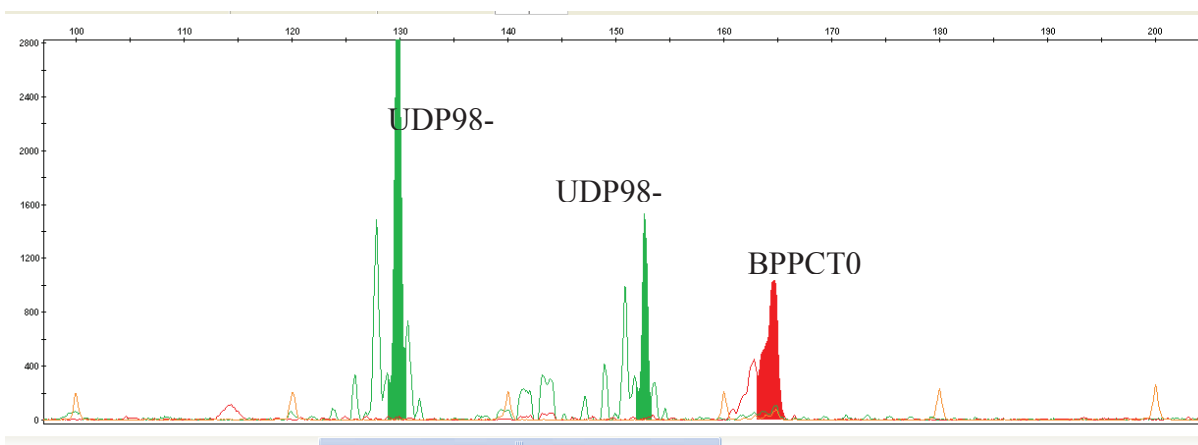


Рис. 2. Результаты анализа сорта персика Памяти Бабенкова по микросателлитным маркерам UDP98-409 и BPPCT017

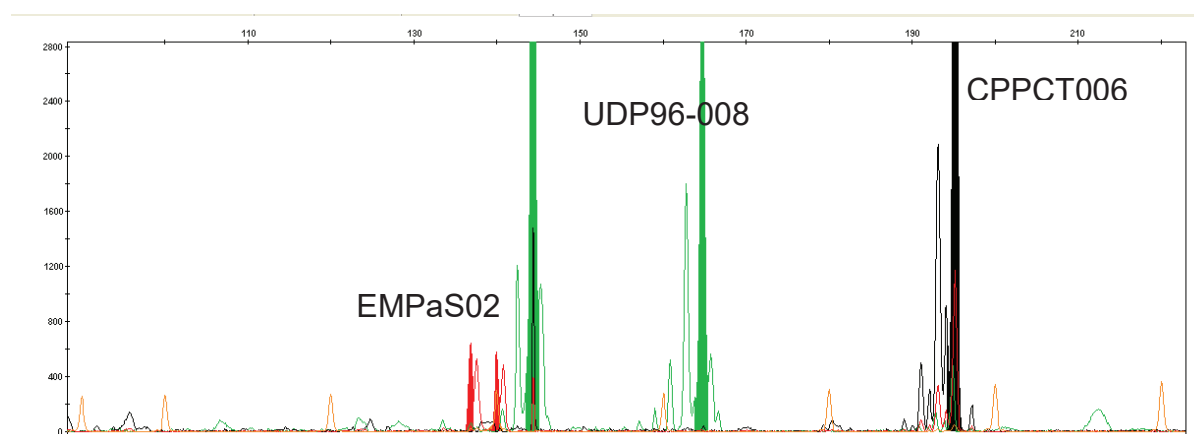


Рис. 3 Результаты анализа сорта персика Обильный по микросателлитным маркерам EMPaS02, UDP96-008 и CPPCT006

Оптимальные экспериментальные параметры и сочетания маркеров в мультиплексных наборах позволяют безошибочно идентифицировать целевые пики электрофореграмм. Для каждого SSR-маркера характерен пик со специфичным цветом на электрофореграмме. При этом наличие двух пиков одного цвета (маркер UDP98-409 у сорта Памяти Бабенкова; маркеры EMPaS02 и UDP96-008 у сорта Обильный) соответствует гетерозиготности анализируемого локуса.

Полученные данные по проанализированным генотипам персика послужат основанием для создания достоверных ДНК-паспортов сортов. Также был проведён анализ по ряду статистических показателей, отражающих генетическую структуру отобранных в работе образцов и их полиморфизма по изученным маркерам.

В табл. 1 приведены данные по распределению частот встречаемости аллелей. Можно заключить, что для каждого локуса характерно преобладание одного наиболее распространенного аллеля (выделен курсивом в табл. 1), причём частота встречаемости наиболее распространенного аллеля у всех локусов превышает или соответствует 50 %. Это свидетельствует об ограниченности генетической гетерогенности в использованной выборке сортов, причиной которой может являться использование генетически близких родительских форм при создании сортов, представленных в выборке.

Проанализированные SSR маркеры в выборке сортов варьируют как по числу аллелей, так и по количественному соотношению аллелей между собой в пределах отдельно взятого локуса. Наибольшее количество аллелей характерно для локусов UDP98-409 (6 аллелей) и UDP96-018 (6 аллелей), наименьшее их количество установлено у локуса EMPaS02 (3 аллели), остальные локусы по количеству аллелей занимают промежуточное положение. Диапазон размеров аллелей (в парах нуклеотидов) также варьирует в зависимости от маркера. Наибольшим диапазоном обладает маркер BPPCT017, размер его аллелей варьирует от 153 до 228 пар нуклеотидов (табл. 2).

Для оценки генетического полиморфизма выборки сортов были рассчитаны такие показатели, используемые в популяционных исследованиях: как число аллелей (N_a), количество эффективных аллелей (N_e), наблюдаемая гетерозиготность (H_o), ожидаемая гетерозиготность (H_e). Кроме того, дополнительно был рассчитан индекс Шеннона для подтверждения/опровержения предположения о низком уровне генетического разнообразия в изученной выборке. Результаты анализа по данным параметрам отражены в табл. 3.

Таблица 1 – Частоты встречаемости аллелей 6 использованных в работе SSR-маркеров в исследованной выборке сортов персика

UDP98-409	Аллель (п. н.)	Частота аллели	BPPCT017	Аллель (п. н.)	Частота аллели
	124	0,182		153	0,083
	130	0,500		165	0,625
	132	0,136		182	0,208
	140	0,045		216	0,042
	142	0,045		228	0,042
	153	0,091			
UDP96-018	Аллель (п. н.)	Частота аллели	EMPaS02	Аллель (п. н.)	Частота аллели
	234	0,167		114	0,045
	250	0,042		137	0,273
	251	0,125		140	0,682
	252	0,042			
	258	0,500			
	273	0,125			
UDP96-008	Аллель (п. н.)	Частота аллели	CPPCT006	Аллель (п. н.)	Частота аллели
	125	0,042		183	0,167
	138	0,042		193	0,250
	144	0,292		195	0,542
	151	0,042		197	0,042
	165	0,583			

Таблица 2 – Диапазон аллелей изученных SSR-маркеров

SSR-маркер	Диапазон аллелей (п.н.)	Величина диапазона аллелей (п.н.)
UDP98-409	124 - 153	29
BPPCT017	153-228	75
UDP96-018	234-273	39
EMPaS02	114-140	26
UDP96-008	125-165	40
CPPCT006	183-197	13

Таблица 3 – Популяционные характеристики изученной выборки сортов персика

SSR-маркер	Na	Ne	I	Ho	He
UDP98-409	6,000	3,184	1,427	0,364	0,686
BPPCT017	5,000	2,250	1,092	0,333	0,556
UDP96-018	6,000	3,200	1,430	0,500	0,688
EMPaS02	3,000	1,847	0,756	0,364	0,459
UDP96-008	5,000	2,323	1,071	0,583	0,569
CPPCT006	4,000	2,595	1,110	0,500	0,615
Ср. знач.	4,833	2,566	1,148	0,441	0,595

Примечание: Na – количество выявленных аллелей,
Ne – количество эффективных аллелей,
Ho – наблюдаемая гетерозиготность,
He – ожидаемая гетерозиготность,
I – индекс Шеннона.

Значения эффективного числа аллелей ниже наблюдаемого числа аллелей у всех проанализированных маркеров, что характерно для данного показателя, в среднем оно равняется 2,566. В изученной выборке преобладают гомозиготы, в среднем по SSR-маркерам лишь 44,1 % генотипов являются гетерозиготами, а у маркера BPPCT017 эта величина снижается до 33,3 %. В свою очередь, значения ожидаемой гетерозиготности по 5 из 6 маркеров выше, чем значения наблюдаемой гетерозиготности, исключение составил маркер UDP96-008.

Индекс Шеннона, отражающий меру разнообразия, демонстрирует низкие значения по SSR-маркерам, среднее значение 1,148, это свидетельствует о низком уровне полиморфизма, выявляемом изученными SSR-маркерами. Наиболее низкое значение меры разнообразия характерно для маркера EMPaS02, обладающего тремя аллелями. Полученные данные также подтверждают предположение о высоком уровне близкородственного скрещивания и отсутствия значимого генетического вклада отдаленной внутривидовой гибридизации на генофонд проанализированных сортов.

На основе данных SSR-генотипирования был проведен кластерный анализ 12 образцов персика методом UPGMA. Результаты кластерного анализа представлены в виде дендрограммы на рис. 4. На дендрограмме видно, что наиболее удаленными от общей группы генотипами являются подвой АП-1 и Розовый Фламинго. Сорта персика образуют отдельную группу, сформированную из двух неравновесных кластеров. Первый кластер включает сорта Никитский 75, Фаворит Мореттини, Красноармейский, Подарок Крыма, Ной, Памяти Бабенкова, Лодз полосатый и Паганель.

Второй кластер состоит из двух сортов – Ветеран и Обильный. Первый кластер разделен на два субкластера: 1) Никитский 75, Фаворит Мореттини, Красноармейский, Подарок Крыма; 2) Ной, Памяти Бабенкова, Лодз полосатый и Паганель. Проведенный анализ методом главных координат с использованием коэффициента в целом соответствует результатам кластеризации UPGMA, что подтверждает их достоверность. Результаты анализа графически представлены на рис. 5.

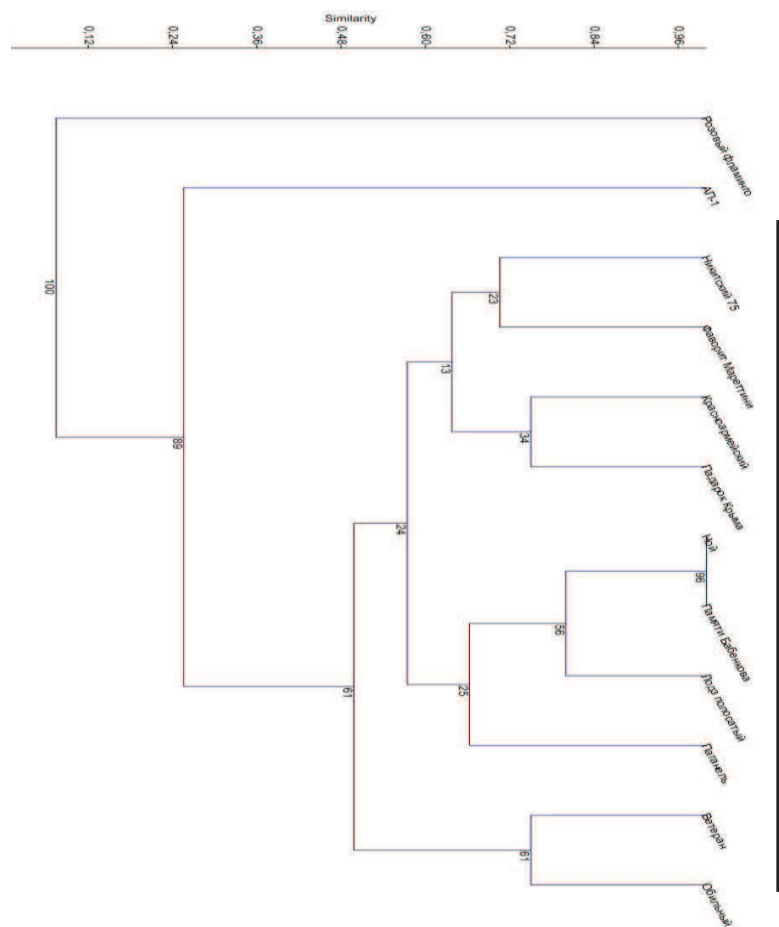


Рис.4. Кластеризация сортов персика методом UPGMA

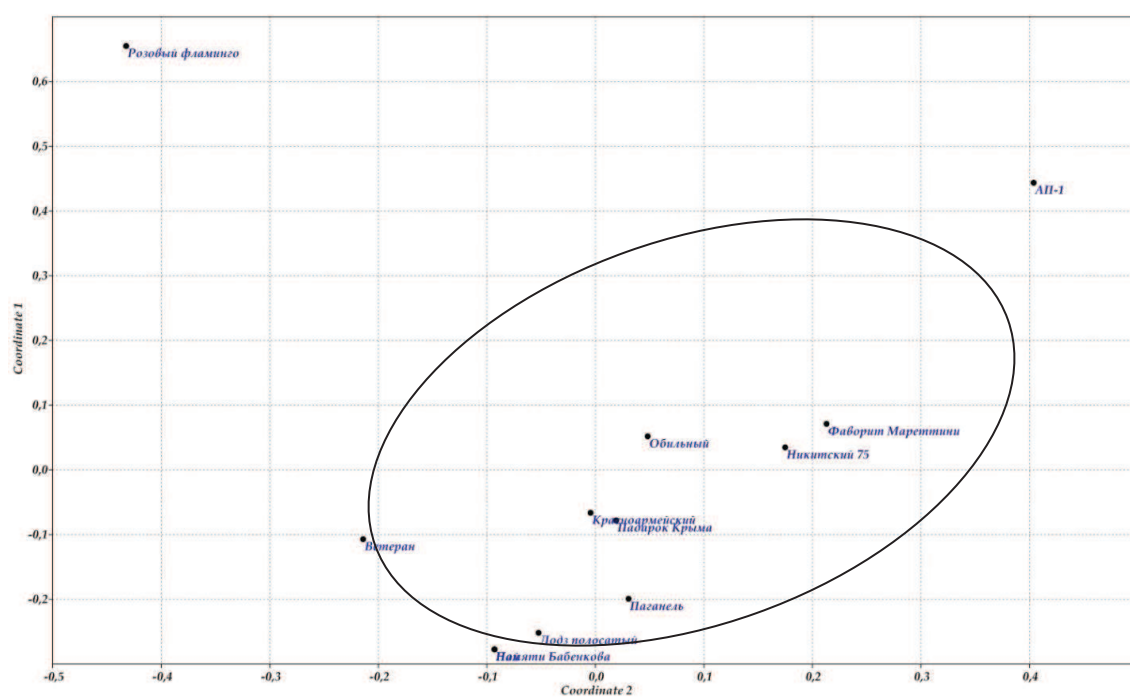


Рис. 5 Результаты анализа методом главных координат по 12 генотипам персика

Однако следует учесть и расхождения двух методов. Так, на графике главных координат сорта Обильный и Ветеран, отнесенных методом UPGMA в отдельный кластер, расположены в значительном отдалении друг от друга. Это свидетельствует об условности выделения этих генотипов в одну группу. В остальном результаты двух методов согласуются между собой. Сорта второго субкластера первого кластера образуют две пары на достаточном расстоянии друг от друга в пространстве главных координат. В свою очередь сорта, образующие второй субкластер первого кластера, на дендрограмме (Ной, Памяти Бабенкова, Лодз полосатый и Паганель) при распределении образуют достаточно обособленную группу, в которую входят два сорта армянского происхождения – Лодз полосатый и Ной. Генотипы подвоев расположены в удалении от сортов культурного персика.

Выводы. По результатам SSR-генотипирования получены ДНК-паспорта для 12 образцов персика (10 сортов вида *Prunus persica* и два генотипа являющиеся подвоями гибридного происхождения). На основании данных микросателлитного генотипирования выполнена оценка генетических взаимосвязей генотипов и уровня генетического разнообразия в изученной выборке. Выявлено, что изученная выборка сортов персика обладает низким уровнем генетического разнообразия, что может быть следствием использования ограниченного перечня родительских форм в селекционном процессе или форм, генетически близких. Подвои АП-2 и Розовый фламинго генетически дистанцированы от остальных изученных генотипов.

Литература

1. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. 1997. № 5. С.3-19.
2. Silfverberg-Dilworth, E. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome // Tree Genetics & Genomes. - 2006. - Vol. 2. - P. 202-224.
3. Aranzana, MJ. Development and variation analysis of microsatellite markers in peach / MJ. Aranzana, J. Garcia-Mas, J. Carbo [et al.] // Plant Breeding – 2002. – Vol. 121 – P.87–92.
4. Liebhard, R. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) / R. Liebhard, L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder [et al.] // Molecular Breeding. - 2002. – Vol. 10. — P. 217-241.
5. Goulao, L. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers / L. Goulao, C.M. Oliveira. // Euphytica. - 2001. - Vol. 122. - P. 81-89.
6. Aranzana, MJ. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification marker mutation pedigree inferences and population structure / M. J. Aranzana, J. Carbó, P. Arús // Theor Appl Genet. – 2003. – Vol. 106. – P.1341–1352.
7. Horvath, A. Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.) / A. Horvath, E. Balsemin, J.-C. Barbot [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2011. – Vol. 129. – P. 283–293.
8. Dirlewanger, E. Development of microsatellite markers in peach *Prunus persica* L. Batsch and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry *Prunus avium* L. / E. Dirlewanger, P. Cosson, M. Tavaud, M.J. Aranzana, [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2002. – №105. – P.127-138.
9. Gharbi, O. Characterization of accessions of 'Reine Claude Verte' plum using *Prunus* SSR and phenotypic traits / O. Gharbi, A. Wunsch, J. Rodrigo // Scientia Horticulturae. - 2014. – №169. – P. 57-65.
10. Aranzana, MJ. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification marker mutation pedigree inferences and population structure / M. J. Aranzana, J. Carbó, P. Arús // Theor Appl Genet. – 2003. – Vol.106. – P.1341–1352.
11. Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоплатов // Молекулярная клиническая диагностика. М.: Мир, 1999. С. 395-427.
12. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei and W. H. Li // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1979. – Vol.76(10). – P. 5269–5273.