

УДК 634.11:577.21

UDC 634.11:577.21

03.00.00 Биологические науки

Biology

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ CASSANDRA ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ВИДА *PRUNUS SPINOSA*

USING OF RETROTRANSPOSONE CASSANDRA BASED DNA-MARKERS FOR EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF *PRUNUS SPINOSA* SPECIES

Степанов Илья Владимирович
м.н.с., SPIN-код (РИНЦ): 3968-1982

Stepanov Ilya Vladimirovich
staff sci, SPIN:1302-3070

Супрун Иван Иванович
к.б.н., зав. лабораторией
SPIN-код (РИНЦ):7124-5304

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci. head of the laboratory
SPIN: 7124-5304

Балапанов Ильнур Маликович
м.н.с., SPIN-код (РИНЦ): 7352-0780

Balapanov Ilnur Malikovich
staff sci, SPIN: 7352-0780

Насонов Андрей Иванович
к.б.н, с.н.с., SPIN-код(РИНЦ): 5636-6106
Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39, ivstepanof@gmail.ru

Nasonov Andrei Ivanovich
Cand. Biol. Sci., SPIN: 5636-6106
North-Caucasian Federal Research Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy, 39, ivstepanof@gmail.ru

В настоящей статье приведены результаты апробации IRAP ДНК-маркеров Cass1 и Cass2 применительно к виду *Prunus spinosa*. Полученные данные позволяют говорить о высокой перспективности их использования для изучения генетического разнообразия генофонда данного вида. По результатам анализа выборки, из 12 генотипов было идентифицировано от 6 до 13 фрагментов в спектре по маркеру Cass1 и от 5 до 11 фрагментов по маркеру Cass2. В результате кластерного анализа в изученной выборке сформировалось три группы образцов. В одну из групп, наиболее удаленную от двух остальных, вошли образцы, отобранные в Украине, в то время как две оставшиеся группы включили образцы из Армении, Краснодарского края, республики Адыгея, Волгоградской области, и три культурные крупноплодные формы. Распределение образцов по кластерам соответствовал их географическому происхождению, что свидетельствует в пользу объективности оценки генетических дистанций между образцами с использованием маркеров Cass1 и Cass2. Сделан вывод о перспективности использования данных ДНК-маркеров для изучения генетического разнообразия вида *Prunus spinosa*

This article presents the results of testing IRAP DNA markers Cass1 and Cass2 applied to *Prunus spinosa*. The findings suggest the high perspectiveness of their using for the study of genetic diversity of the gene pool of this species. According to the results of the analysis of the sample 12 genotypes were identified from 6 to 13 fragments in the spectrum of Cass1 and from 5 to 11 fragments for Cass2. As a result of cluster analysis in the sample formed three groups of samples. In one of the groups, which is most distant from the other two, includes samples taken in Ukraine, while the remaining two groups included samples from Armenia, the Krasnodar region region, the Republic of Adygea, Ukraine and Moldova, and three cultural large-fruited form. The distribution of samples in clusters corresponded to their geographical origin that favors the objective assessment of genetic distances between the samples using Cass1 and Cass2 markers. Thus, it was concluded that the prospects of using DNA markers to study the genetic diversity within a species of *Prunus spinosa*

Ключевые слова: ПОД PRUNUS, PRUNUS SPINOSA, ТЕРЕН, ДНК - МАРКЕРНЫЙ АНАЛИЗ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, IRAP-МАРКЕРЫ

Keywords: GENUS PRUNUS, PRUNUS SPINOSA, SLOE, DNA-MARKERS, GENETIC DIVERSITY, IRAP - MARKERS

Doi: 10.21515/1990-4665-134-094

Род *Prunus* это широко распространенный таксон древесных растений, относящийся к семейству *Rosaceae*. Многие виды этого рода имеют важное экономическое значение, так как являются ценными плодовыми культурами: персик, слива, абрикос, вишня, черешня, миндаль, а также используются для декоративных целей. Род *Prunus* возник монофилетически в среднем эоцене и в последующем широко распространился в умеренной и субтропической зоне. Большое разнообразие форм в сочетании с близким генетическим родством видов, делают род *Prunus* удобным объектом для изучения процессов видообразования и доместикиции. Генетические исследования терна тесно связаны с изучением происхождения родственного вида – сливы домашней (*Prunus domestica*).

Одним из дискуссионных вопросов в генетических исследованиях внутри рода *Prunus* является вопрос происхождения гексаплоидного вида слива домашняя (*Prunus domestica* L.; $2n=48$). Данный вид известен в культуре с IV века до нашей эры и в диком виде в настоящее время не встречается. Формы, которые предположительно считались дикими видами, при дальнейшем цитологическом и морфологическом анализе признаков оказались одичавшими формами сливы домашней, терна или алычи. Большинство исследователей сошлись на том, что слива домашняя - это естественный гибрид, полученный в природе в результате скрещивания терна (*Prunus spinosa*) и алычи (*Prunus cerasifera*) [1]. Считается более вероятным возникновение этого вида в Армении, Северном Иране и Сирии, где обнаружены, примитивные сорта сливы домашней, многочисленные сорта алычи и полукультурные формы терна [1,2]. Подтверждается гипотеза о более сложном происхождении сливы домашней. Изучая флавонолы косточковых культур, установили, что состав этих веществ у вишни мелкоплодной (*Prunus microcerasus*), терна и алычи свидетельствует в пользу новой гипотезы о происхождении терна

как аллополиплоида от гибридизации вишни мелкоплодной и алычи. Поскольку в состав генома терна входят геномы этих видов (Cs Ms), а в состав генома сливы домашней - геномы алычи (Cd), (Cs) и геном вишни мелкоплодной (Ms), геномная формула сливы домашней может быть представлена как: Cs Cs Cd Cd Ms Ms [1,2].

Кроме того, цитогенетическое исследование и оценка по комплексу морфологических признаков, выполненная группой ученых под руководством D. Zohary (2000) не позволило получить 100% подтверждений предположения о происхождении сливы в результате гибридизации терна и алычи. Авторами выдвинуто предположение, что слива возникла в результате полиплоидизации алычи. При этом возможность последующей гибридизации вновь возникших полиплоидных форм с видом *Prunus spinosa* они также не исключают [3].

Очевидно, что эти три вида: слива домашняя, алыча и терен генетически очень близки, и в исследовании, выполненном с использованием хлоропластных ДНК-маркеров, было обнаружено, что алыча генетически более близка к сливе, но терен, тем не менее, участвовал в формировании вида *Prunus domestica* [4].

Исследования в вопросе происхождения сливы домашней нельзя считать окончательно завершенными, поскольку не существует единого мнения. Очевидно, что изучение генетического полиморфизма видов, потенциально считающимися предками сливы домашней, будет способствовать накоплению научных знаний в данной области, что позволит, в дальнейшем сделать окончательные выводы о степени участия видов *Prunus cerasifera* и *Prunus spinosa* в формировании вида *Prunus domestica*.

Молекулярно-биологические исследования генетической структуры и филогенетических связей внутри рода *Prunus* дают возможность более тщательно рассмотреть механизмы эволюции внутри таксона и оценить

степень генетической близости видов. Для рода *Prunus* выполнен целый ряд работ, направленных на изучении генетических взаимосвязей на уровне вида/рода, но, как правило, данные работы изучали наиболее экономически значимые виды [5-8]. При этом для вида *Prunus spinosa*, являющегося одним из предковых видов сливы домашней, перечень таких работ очень лимитирован. Одна из наиболее недавних работ была выполнена с использованием микросателлитных ДНК-маркеров и выявила, что вид *Prunus cerasifera*, вероятнее всего являлся материнской формой при формировании вида слива домашняя и внес наибольший вклад в данный процесс. Но, тем не менее, авторы предположили, что вид *Prunus spinosa*, также участвовал в формировании вида *Prunus domestica*. Причем вероятным было как протекание прямой гибридизации с видом *Prunus cerasifera*, так и вторичная гибридизация терна с формами, являющимися промежуточным звеном между алычой и сливой домашней [9].

Наряду с SSR-маркерами к перспективным для использования в данном направлении геномным структурам можно отнести ретротранспозоны. Наиболее простой маркерной системой основанной на анализе вставок ретротранспозонов является IRAP маркеры, комплементарные концевым последовательностям LTR-областей ретротранспозона. Для ряда представителей рода *Prunus* были установлены последовательности ретротранспозонов и на их основе разработаны IRAP-маркеры [10].

На основе LTRs последовательностях транспозона Кассандра, обнаруженного у сливы домашней [7], были разработаны два IRAP маркера (Cass1 и Cass2). В дальнейшем эффективность разработанных IRAP маркеров была продемонстрирована при генотипировании репрезентативной выборки словацких сортов сливы домашней [8]

Учитывая высокий уровень информативности IRAP ДНК-маркеров на основе ретротранспозона Кассандра, выявленный при генотипировании

различных видов рода *Prunus*, в том числе и сливы домашней, нами была поставлена задача оценить перспективность использования данных ДНК-маркеров Cass1 и Cass2 для анализа генетического полиморфизма вида *Prunus spinosa*.

Объекты и методы исследования.

В изучаемую выборку входило 13 генотипов из коллекций косточковых культур МОС ВИР и КОСС ВИР. Генотипы терна отобранные в экспедициях: Гузерипль (Адыгея), Цареградский (Украина), Терн дикий (Молдова), Мукачевский 3 и Мукачевский 31 (Мукачево, Украина), Уманский 1 и Уманский 2 (Умань, Украина) Люсахпюр 2 (Армения), Боржоми (Грузия), Таманский 20 (Тамань). Возделываемые сорта крупноплодного терна: Терн вишневый, Терн абрикосовидный, Терн сверхобильный. В качестве растительного материала для экстракции ДНК использовались молодые листья. ДНК экстрагировали методом ЦТАБ [11].

Концентрация компонентов ПЦР-смеси: 1X буфер, 0,3 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 0,75 mM праймеров (Cass1 или Cass2), 1 ед. ДНК-полимеразы, 20 нг ДНК на одну реакцию. Условия проведения ПЦР-реакции: Для Cass1 – 1 мин предварительной денатурации при 94 С; 32 цикла включающие следующие этапы: денатурация 1 минута 94 С, 1 минута отжиг праймеров при 54 С, 3 минуты элонгация при 72 С; в конце 32 циклов заключительная элонгация при 72 С 10 минут. Для Cass2 – 3 мин предварительной денатурации при 94 С; 32 цикла включающие следующие этапы: денатурация 40 сек при 94 С, 40 секунд отжиг праймеров при 61 С, 2 минуты элонгация при 72 С; в конце 32 циклов заключительная элонгация при 72 С 5 минут. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле в течение 2 часов при напряжении 100 вольт. Статистическую обработку данных проводил с использованием программы PAST, доступной на сайте: <http://nhm2.uio.no/norlex/past/download.html>.

Результаты.

В результате выполненной работы была выявлена воспроизводимость используемых IRAP ДНК-маркеров для вида *Prunus cerasifera*. Для всех изученных генотипов идентифицировали IRAP-спектры по маркерам Cass 1 и Cass 2. На рисунке 1 приведен пример электрофоретического спектра изученных образцов терна по IRAP-маркеру Cass 2.

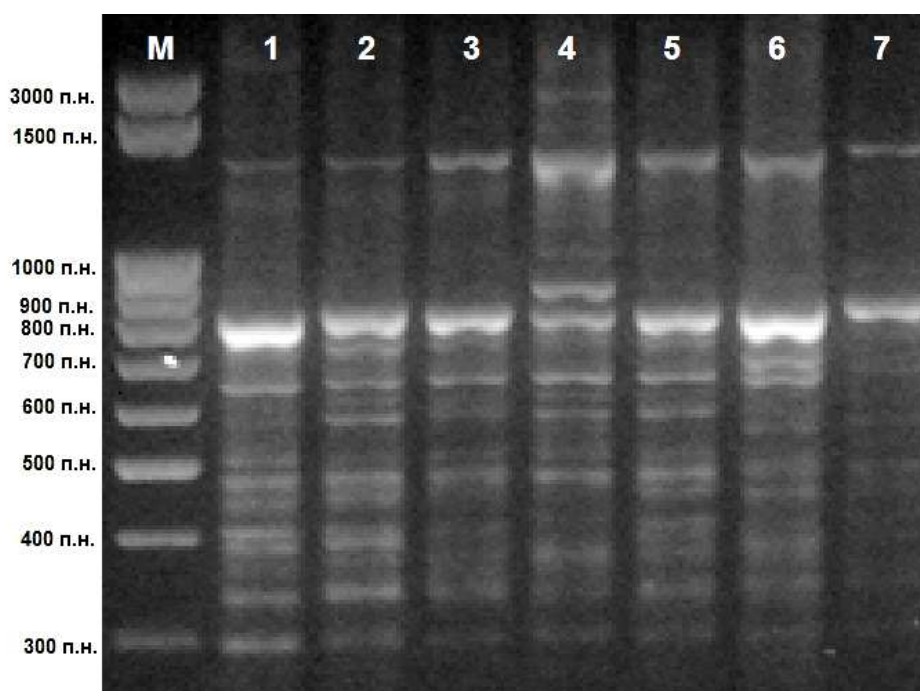


Рисунок 1 Электрофоретический анализ продуктов амплификации маркера Cass 2

М – маркер молекулярной массы ДНК; 1-7 образцы вида *Prunus spinosa*:

1 – Мукачевский 3, 2 – Мукачевский 31, 3 – Уманский 1, 4 – Уманский 2,
5 – Люсахпюр 2, 6 – Боржоми, 7 – Таманский 20

Полученные IRAP – спектры насчитывали следующее количество фрагментов: по маркеру Cass1 от 6 (образцы Боржоми и Таманский 20) до 13 фрагментов (образец) и для маркера Cass2 - от 6 до 12 фрагментов. Суммарно было идентифицировано 26 полиморфных фрагментов для маркера Cass1 и 22 полиморфных для маркера Cass2. Несмотря на то, что по маркеру Cass2 было выявлено меньшее суммарное количество

полиморфных фрагментов, количество уникальных фрагментов (выявляемых только у одного образца) по данному маркеру значительно превышало данный показатель маркера Cass1. Данный показатель был равен 9 и 3 для маркеров Cass2 и Cass1, соответственно.

Сопоставление данных полученных по результатам исследования IRAP полиморфизма в выборке из 13 образцов терна с результатами, полученными нами ранее при генотипировании сортов сливы домашней, персика и алычи позволяет сделать вывод о высоком уровне полиморфизма, выявляемого данными маркерами у вида *Prunus spinosa*. Кроме того, обнаружили, что для терна более полиморфным является маркер Cass1, в то время как при анализе выборки из 15 образцов сливы домашней, персика и алычи нами был выявлен более высокий уровень полиморфизма для маркера Cass2 - для маркера Cass1 выявили 17 полиморфных фрагментов и 22 полиморфных фрагмента по маркеру Cass2 [12]. В работе группы словацких ученых при IRAP анализе 9 сортов сливы домашней также был выявлен более высокий уровень полиморфизма для маркера Cass2 в сравнении с маркером Cass1 [13].

Выявленный факт обусловлен различиями в организации геномов изученных видов, а также может быть являться следствием различий в количестве вставок данного ретротранспозона в геноме.

С целью выявления генетических взаимосвязей в изученной выборке образцов, нами был выполнен кластерный анализ и анализ методом главных компонент на основе суммарных результатов IRAP генотипирования по маркерам Cass1 и Cass2. Результаты представлены на рисунках 2 и 3.

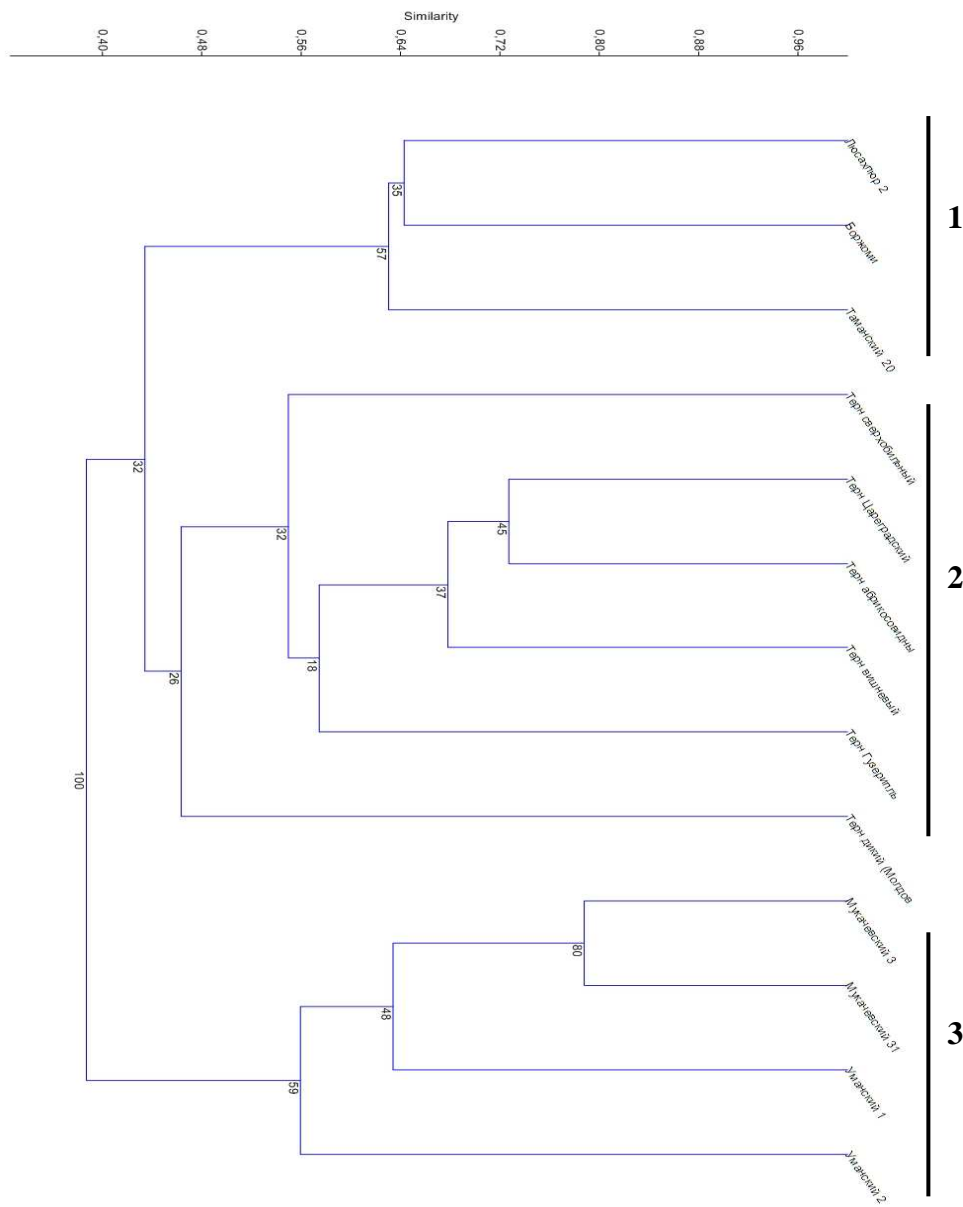


Рисунок 2 UPGMA дендрограмма характеризующая степень генетического сходства изученных образцов, выполненная на основе данных генотипирования по IRAP маркерам Cass1 и Cass2

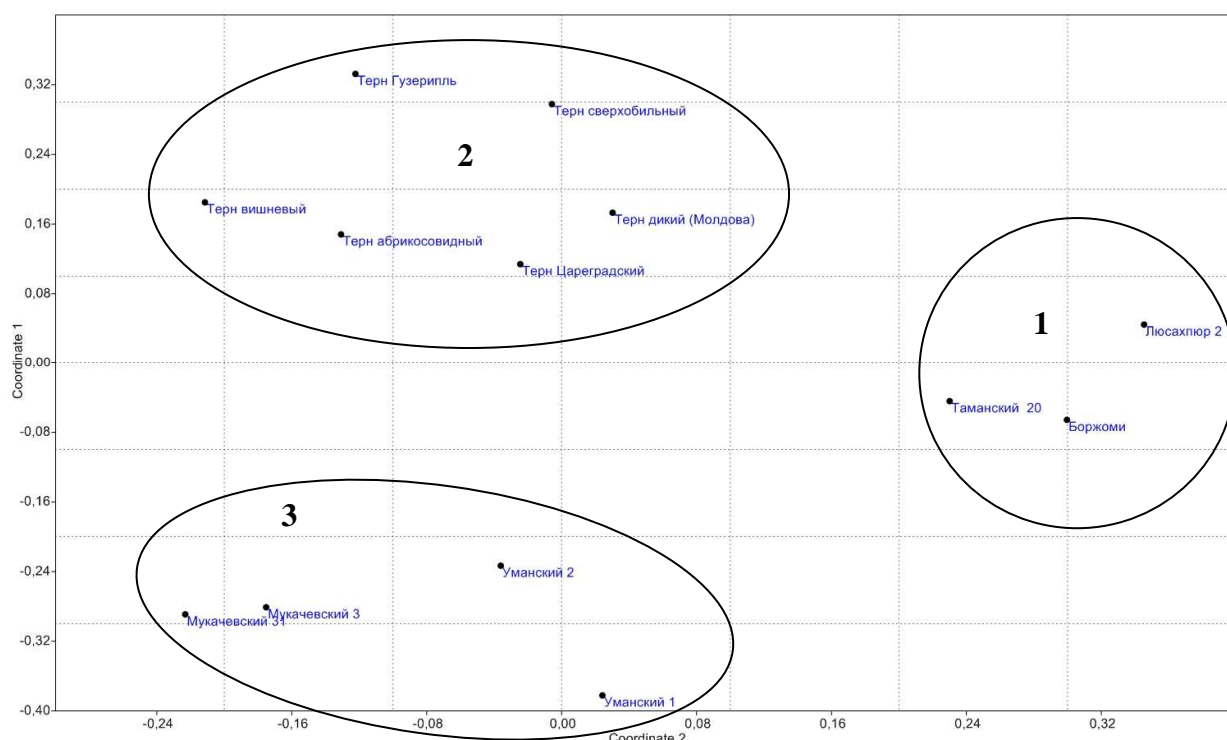


Рисунок 3 Распределение изученных образцов в пространстве главных координат полученное на основе данных генотипирования по IRAP маркерам Cass1 и Cass2

Как видно из рисунков 2 и 3, формируется 3 кластера/группы генотипов. Анализируя распределение образцов по кластерам необходимо выделить группу 3, в которую вошли образцы Мукачевский 3, Мукачевский 31, Уманский 1 и Уманский 2. Данные образцы терна из коллекции Крымской опытной станции были отобраны на Украине. В кластер 1 вошли образцы, представляющие Кавказ и Северокавказский регион: Грузия (Боржоми), Армения (Люсахпюр 2) и Краснодарский Край (Таманский 20). Группа 2 наиболее разнородная по географическому происхождению, однако, необходимо отметить, что в него вошли три крупноплодных культивируемых образца терна (Терн вишневый, Терн абрикосовидный, Терн сверхобильный), которые были отобраны в

культуру в Северокавказском регионе и один образец из республики Адыгея (Гузерибль).

Заключение: Учитывая результаты анализа полиморфизма, выявляемого IRAP маркерами Cass 1 и Cass 2, а также результаты кластерного анализа, можно сделать заключение о высоком уровне информативности данных ДНК-маркеров и перспективности их использования для изучения генетического полиморфизма вида *Prunus spinosa*. Они могут быть использованы для оценки полиморфизма, как на внутривидовом уровне, так и для анализа генетических взаимосвязей данного вида с другими видами, представляющими род *Prunus*.

Литература

1. Морозова Г.С. Отдаленная гибридизация и полиплоидия в селекции косточковых культур/ Г.С. Морозова, Г.В. Еремин // Аграрная наука. - 1981. - № 3. - С. 145.
2. Еремин Г.В. Происхождение и геномный состав терна и домашней сливы/ Г.В. Еремин, Г.Г. Половянов // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 1984. - № 3. - С. 24.
3. Zohary D. Domestication of Plants in the Old World / D. Zohary, M. Hopf // Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000.
4. Reales A. Phylogenetics of Eurasian plums. *Prunus* L. Section *Prunus* (Rosaceae), according to coding and non-coding chloroplast DNA sequences / A. Reales, D.J. Sargent, K.R. Tobutt, D. Rivera // Tree Genet. Genomes. – 2010. - № 6. – P. 37–45.
5. Decroocq V. Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats / V.Decroocq L.S. Hagen, M.-G. Fave J.-P. Eyquard et al. // Molecular Breeding. – 2004. - №13 - P.135-142
6. Dirlwanger 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. Dirlwanger, P. Cosson, M. Tavaud, M.J. Aranzana, et al. // Theor. Appl. Genet. – 2002. - №105. – P. 127-138.
7. Downey S.L. Polymorphic DNA Markers in Black Cherry *Prunus serotina* are identified using sequences from Sweet Cherry, Peach and Sour Cherry / S.L. Downey, A.F. Iezzoni // J. of Am. Soc. of Hort. Science. - 2000. - №125. - P.76-80.
8. Gharbi O. Characterization of accessions of 'Reine Claude Verte' plum using *Prunus* SRR and phenotypic traits / O. Gharbi, A. Wunsch, J. Rodrigo // Scientia Horticulturae. - 2014. - № 169. - P.57-65.
9. 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, H Christmann, et al // 2011. - № 129. – P. 283-293.
10. Yuyinga S. Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers / S. Yuyinga, D. Xiajunb, W. Fei et al // Scientia Horticulturae. - 2011. - V.132. - P.50–58.

11. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G.Murray, W.F. Thompson // *Nucleic Acids Research*. – 1980. - № 10. – P. 4321-4325.

12. Степанов И.В. Апробация IRAP маркеров на основе ретротранспозона кассандра для проведения анализа генетического полиморфизма в роде PRUNUS / И.В. Степанов, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, И.М. Балапанов // *Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]*. – Краснодар: КубГАУ. - 2014. – №10 (104) Режим доступа <http://ej.kubagro.ru/2014/10/pdf/55.pdf>.

13. Senkova S. Utilization of IRAP technique for plums genotypes differentiation. / S. Senkova, J. Ziarovska, M. Bezo et al // *Bioscience Research*. – 2013. – V.10 (1). – P. 1-7.

References

1. Morozova G.S. Otdalennaya gibridizatsiya i poliploidiya v selektsii kostochkovykh kul'tur/ G.S. Morozova, G.V. Yeremin // *Agrarnaya nauka*. - 1981. - № 3. - S. 145.

2. Yeremin G.V. Proiskhozhdeniye i genomnyy sostav terna i domashney slivyy/ G.V. Yeremin, G.G. Polovyanov // *Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk*. - 1984. - № 3. - S. 24.

3. Zohary D. Domestication of Plants in the Old World / D. Zohary, M. Hopf // Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000.

4. Reales A. Phylogenetics of Eurasian plums. Prunus L. Section Prunus (Rosaceae), according to coding and non-coding chloroplast DNA sequences / A. Reales, D.J. Sargent, K.R. Tobutt, D. Rivera // *Tree Genet. Genomes*. – 2010. - № 6. – R. 37–45.

5. Decroocq V. Microsatellite markers in the hexaploid Prunus domestica species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats / V.Decroocq L.S. Hagen, M.-G. Fave J.-P. Eyquard et al. // *Molecular Breeding*. – 2004. - №13 - P.135-142

6. 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.

7. Downey S.L. Polymorphic DNA Markers in Black Cherry Prunus serotina are identified using sequences from Sweet Cherry, Peach and Sour Cherry / S.L. Downey, A.F. Iezzoni // *J. of Am. Soc. of Hort. Science*. - 2000. - №125. - P.76-80.

8. Gharbi O. Characterization of accessions of 'Reine Claude Verte' plum using Prunus SRR and phenotypic traits / O. Gharbi, A. Wunsch, J. Rodrigo // *Scientia Horticulturae*. - 2014. - № 169. - P.57-65.

9. 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, H Christmann, et al // 2011. - № 129. – P. 283-293.

10. Yuyinga S. Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers / S. Yuyinga, D. Xiajunb, W. Fei et al // *Scientia Horticulturae*. - 2011. - V.132. - P.50–58.

11. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G.Murray, W.F. Thompson // *Nucleic Acids Research*. – 1980. - № 10. – R. 4321-4325.

12. Stepanov I.V. Aprobatsiya IRAP markerov na osnove retrotranspozona kassandra dlya provedeniya analiza geneticheskogo polimorfizma v rode PRUNUS / I.V. Stepanov, I.I. Suprun, S.V. Tokmakov, I.M. Balapanov // *Nauchnyy zhurnal KubGAU [Elektronnyy resurs]*. – Краснодар: KubGAU. - 2014. – №10 (104) Rezhim dostupa <http://ej.kubagro.ru/2014/10/pdf/55.pdf>.

13. Senkova S. Utilization of IRAP technique for plums genotypes differentiation. / S. Senkova, J. Ziarovska, M. Bezo et al // *Bioscience Research*. – 2013. – V.10 (1). – P. 1-7.