

УДК 634.11:577.21

UDC 634.11:577.21

АПРОБАЦИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВЫХ ФОРМ СОРТОВ ЯБЛОНИ

APPROBATION OF MICROSATELLITE DNA-MARKERS FOR IDENTIFICATION OF APPLE CLONES

Супрун Иван Иванович
к.б.н., зав. сектором

Suprun Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci., head of the laboratory

Артюх Светлана Николаевна
к.б.н., с.н.с.

Artyukh Svetlana Nikolaevna
Cand.Biol.Sci., senior scientist

Токмаков Сергей Вячеславович
к.б.н., м.н.с.

Tokmakov Sergey Vyacheslavovuch
Cand.Biol.Sci., junior scientist

Степанов Илья Владимирович
аспирант
Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39, supruni@mail.ru

Stepanov Ilya Vladimirovich
postgraduate student
North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy, 39, supruni@mail.ru

В результате проведенной работы была выполнена апробация ряда микросателлитных ДНК-маркеров для идентификации геномного полиморфизма между сортами яблони Флорина, Голден Делишес и их клоновыми формами. При высоком уровне межсортового полиморфизма, изученные ДНК-маркеры не выявили аллельных различий между сортами и их клоновыми формами

As the result of the work, the test of microsatellite DNA markers for the identification of genomic polymorphism between apple cultivars Florina, Golden Delicious and clonal forms has been done. With the high level of intervarietal polymorphism, studied DNA markers showed no allelic differences between varieties and their clonal forms

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, СОРТА, КЛОНЫ, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ДНК-МАРКЕРЫ

Keywords: APPLE, VARIETIES, CLONAL FORMS, MICROSATELLITE DNA-MARKERS

В классических селекционных экспериментах исследователю для изучения интересующего гена приходится по большей части работать над его фенотипическими проявлениями, представляющими собой конкретный признак. Но морфологические признаки могут иметь сложный характер наследования и часто зависят от условий внешней среды и их информативность как генетических маркеров ограничена.

Развитие методов молекулярной генетики привело к появлению нового класса генетических маркеров – ДНК-маркеров, основанных на полиморфизме первичной структуры ДНК.

Возможность их идентификации не зависит от условий окружающей среды, они не являются тканеспецифичными и, главное, с использованием ДНК – маркеров, гены, интересующие селекционера, могут быть

идентифицированы на любом этапе вегетации без проведения фенотипической оценки. Кроме идентификации целевых генов, ДНК-маркеры могут быть эффективно использованы для определения уровня генетического сходства исследуемых образцов за счет анализа их геномного полиморфизма.

ДНК - маркеры генетических систем разного уровня должны обладать определенными свойствами и отвечать следующим требованиям: высокий уровень полиморфизма, кодоминантный характер наследования, оптимальный уровень частоты встречаемости в геноме для решения конкретных задач, равномерное распределение в геноме по хромосомам, селективно нейтральное поведение, упрощенная оценка параметров маркера, возможность автоматизации оценки параметров маркера, высокая воспроизводимость оценки параметров маркера, возможность легкого обмена данными между лабораториями [1].

Многочисленными исследованиями было показано, что одна из наиболее информативных систем молекулярного маркирования сельскохозяйственных культур – так называемые микросателлитные последовательности ДНК (SSR). В геномы эукариот встроены тандемные повторы из простых последовательностей, которые могут состоять из 4, 3, 2 и даже одного нуклеотида. Позже эти регионы были названы «микросателлитами» [2].

Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в ДНК высших растений. Они были обнаружены у 34 видов. Средняя частота встречаемости на ДНК – каждые 50 тысяч пар нуклеотидов. Обследование баз данных для 54 видов растений показало, что среди SSR последовательностей в геноме ядра преобладают ди-, три- и тетрануклеотидные повторы [3]. Источник полиморфизма этих последовательностей – в сайт-специфическом варьировании длины

повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора [4].

Одна из наиболее крупных работ по идентификации и секвенированию SSR-локусов у яблони была выполнена Liebhard R. с соавторами (2002). Ее результатом стали 140 впервые идентифицированных микросателлитных локусов и праймерные пары, их фланкирующие. Для яблони построены детальные молекулярно - генетические карты с использованием SSR, ДНК - маркеров [5].

Данная маркерная система на настоящий момент одна из наиболее широко используемых в исследованиях, направленных на оценку внутривидового генетического полиморфизма данной культуры. Так, к примеру, исследователи провели оценку степени генетического родства и ДНК - фингерпринт в выборке из 41 сорта яблони с использованием SSR ДНК-маркерной системы [6]. В результате работы все сорта были идентифицированы по уникальным аллельным комбинациям.

В качестве одного из наиболее крупных проектов в области изучения микросателлитного полиморфизма следует отметить исследования группы ученых из Национального центра сохранения генетических ресурсов Государственного департамента США по сельскому хозяйству (USDA-ARS-National Center for Genetic Resources Preservation). С использованием анализа полиморфизма микросателлитных локусов ядерного генома, а также полиморфных маркеров хлоропластного генома выполнили оценку уровня генетического разнообразия коллекции образцов диких видов груши, собранных в Европе и на Ближнем востоке, а также коллекции сортов и видов яблони (порядка 1900 образцов) [7-8]. По результатам исследований был выявлен ряд дубликатных образцов, а данные генотипирования послужили основой для формирования базы данных геномных фингерпринтов.

В связи с высоким уровнем полиморфизма данного вида ДНК - маркерных систем, нами была поставлена задача апробации микросателлитных ДНК-маркеров для идентификации клоновых форм от исходных сортов яблони. Актуальность исследований обусловлена также и тем, что наличие методов ускоренной ДНК-маркерной идентификации генетических различий между исходным сортом и его клоновыми формами позволит повысить эффективность клоновой селекции за счет возможности проведения отбора форм на ранних этапах селекционного процесса.

Материал и методы исследований

Материалом для исследований послужили сорта яблони Апорт АСС, Память Есаулу, Щит, а также сорта Голден Делишес и Флорина и их клоновые формы – Золотая Корона и Фламенко, соответственно.

Для экстракции ДНК использовали метода ЦТАБ, основанный на применении цетилтриметиламмоний бромида в качестве основного детергента в составе лизирующего буфера [9].

Изучали полиморфизм восьми SSR-локусов: CN01g12, CN03a04, CN01f03b, CN581493, AJ 320188, Ni04d02, Ni03c04, CN02a04 . Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 5 минут при 94°C - начальная денатурация, следующих 30 циклов: 30 секунд денатурация при 94 °С, 30 секунд отжиг праймеров при 58 °С, 30 секунд синтез при 72°C; последний цикл синтеза - 3 минуты при 72C°.

В состав ПЦР смеси входили: 40-50 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,3µМ каждого праймера, 1 единица Taq-полимеразы, 25 mM KCl, 60 mM Tris-HCl, pH 8,5, 0,1% Тритон X-100, 10мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5мМ MgCl₂, в общем объеме реакционной смеси 25мкл. Реакция была проведена в амплификаторе Eppendorf Mastercycler gradient.

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР использовали 8% акриламидный гель на основе 1×Трис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М Борной кислоты, 2мМ ЭДТА, рН=8,2). Электрофорез проводили при напряжении 200V в течение 3 часов. Гелевые пластины окрашивали в раствор бромистого этидия 5мкг/мл и фотографировали в ультрафиолете. Для определения относительной молекулярной массы амплифицированных фрагментов использовали программу Gel-Pro Analyzer 3.1.

Результаты

Несмотря на то, что используемые микросателлитные ДНК – маркеры ранее были нами использованы в сортовой идентификации яблони [10] и проявили уровень полиморфизма, достаточный для дифференциации сортов и подвоев, в данное исследование было включено дополнительно три сорта местной селекции: Апорт, Память Есаулу, Щит помимо сортов Голден Делишес и Флорина и их клоновых форм. Это было сделано для более объективной сравнительной оценки уровня полиморфизма изучаемых SSR-маркеров выявляемого при оценке межсортового полиморфизма и полиморфизма сорт/клон сорта.

Следует отметить, что все используемые в работе ДНК-маркеры проявили высокий уровень межсортового полиморфизма – от трех до пяти аллелей на локус в изучаемой выборке из пяти сортов. Результаты микросателлитного генотипирования сортов представлены в таблице 1. Наличие двух фрагментов, разделенных косой чертой, говорит о гетерозиготности локусов.

Таблица 1 - Полиморфизм микросателлитных локусов у изученных сортов яблони*

Маркер Сорт	CN5814 93	CH01 f03b	CH03 a04	Hi03 c04	CH01 g12	CH02 a04	Hi04 d02	AJ 320188
Golden Delicious	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Щит	204/232	164	102	198	116	93	183/186	230/256
Флорина	244	144	98/102	180/198	116	110	180/185	197/218
Память есаула	Нуль- аллель	176	88	180	116	114	185	218/230
Апорт АСС68- 32	191	151	102	189	114	94/101	205/215	197/218
Апорт АСС 68- 2	191	151	102	189	114	94/101	205/215	197/218

* - размер ПЦР фрагмента указан в парах нуклеотидов

Из результатов микросателлитного генотипирования видно, что каждый из сортов обладает уникальным, специфичным лишь для него набором аллелей по изученным восьми микросателлитным локусам. Это подтверждает высокий уровень полиморфизма SSR - локусов, использованных в работе.

На рисунках 1-3 продемонстрированы результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации с праймерными парами, фланкирующими SSR-локусы, изученные в ходе выполнения исследований.

На электрофореграммах, наряду с сортами яблони, вовлеченными в исследование, представлены также и клоновые формы сортов Голден Делишес и Флорина. Для сорта Голден Делишес было изучено шесть клоновых форм (Золотая корона), для сорта Флорина – три формы (Фламенко). Кроме того, с целью определения генетической чистоты образцов сорта Апорт, изучали полиморфизм SSR-локусов у двух различных образцов: Апорт АСС 68-32 и Апорт АСС 68-2.

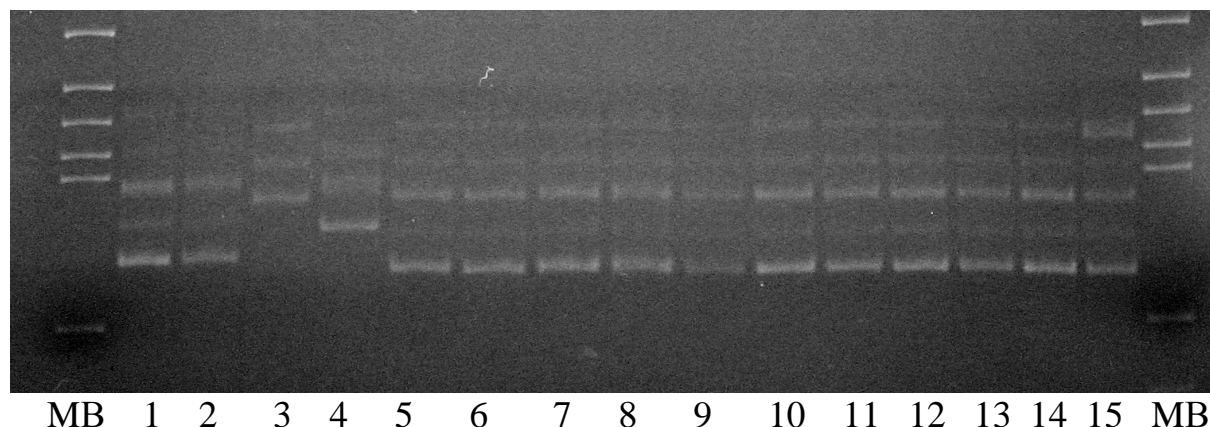


Рисунок 1. Результаты анализа изученных образцов яблони по микросателлитному локусу CH01f03b

МВ – маркер молекулярного веса ДНК (pBR322/BsuR1); 1-16 сорта и формы яблони: 1 - Апорт АСС 68-2, 2 - Апорт АСС 68-32, 3 - Память Есаулу, 4 - Щит, 5 - Фламенко 64-32, 6 - Фламенко 64-27, 7 - Фламенко 64-П-24, 8 - Флорина, 9 - Золотая Корона 64-16, 10 - Золотая Корона 64-П-18, 11 - Золотая Корона 64-П-36, 12 - Золотая Корона 64-1, 13 - Золотая Корона 64-7, 14 - Золотая корона 64-8, 15 – Голден Делишес

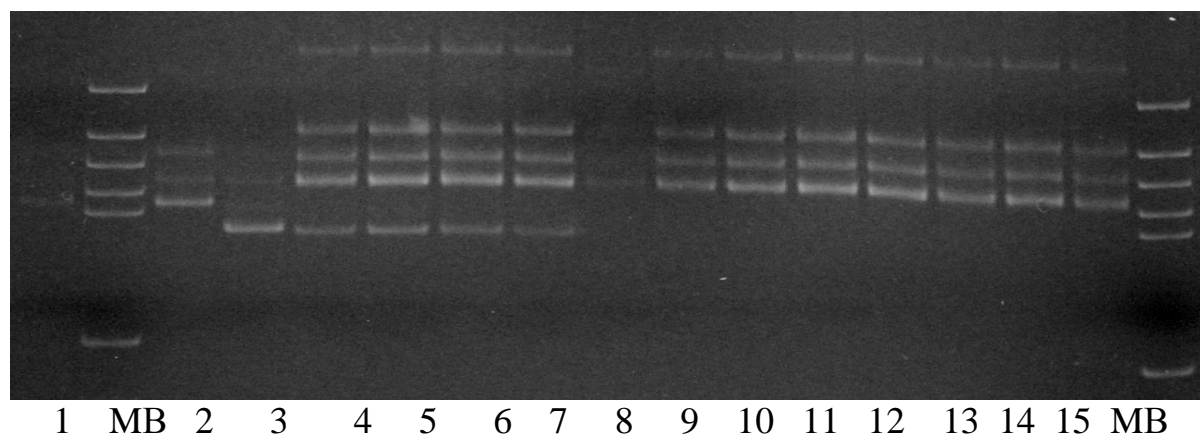
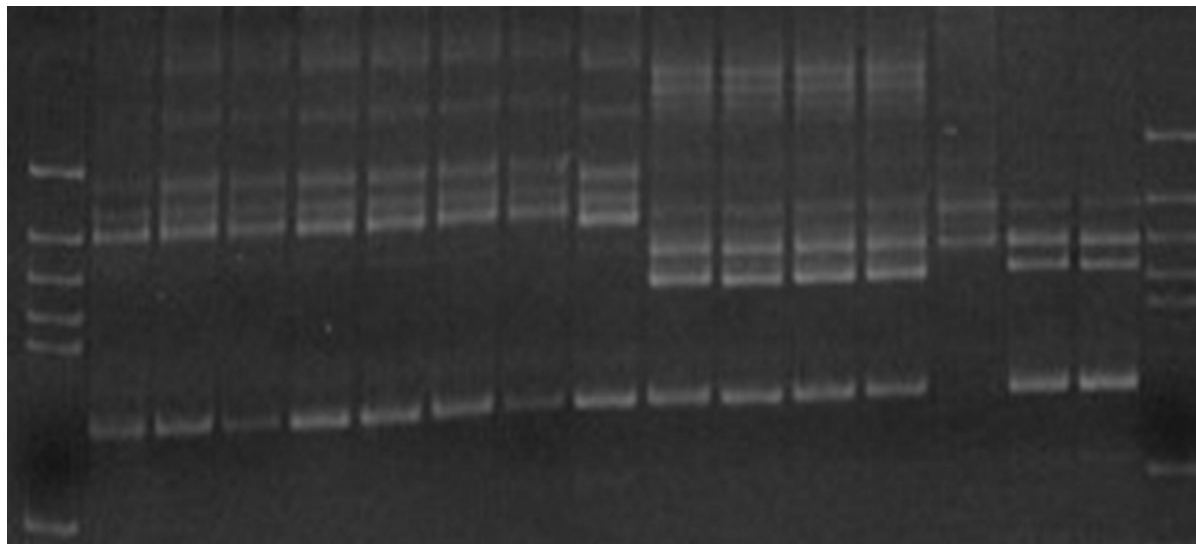


Рисунок 2. Результаты анализа изученных образцов яблони по микросателлитному локусу Ni03C04

МВ – маркер молекулярного веса ДНК (pBR322/BsuR1); 1-16 сорта и формы яблони: 1 - Апорт АСС 68-2, 2 - Апорт АСС 68-32, 3 - Память Есаулу, 4 Флорина, 5 - Фламенко 64-32, 6 - Фламенко 64-27, 7 - Фламенко 64-П-24, 8 -Щит, 9 - Золотая Корона 64-16, 10 - Золотая Корона 64-П-18, 11 - Золотая Корона 64-П-36, 12 - Золотая Корона 64-1, 13 - Золотая Корона 64-7, 14 - Золотая корона 64-8, 15 – Голден Делишес



MB 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 MB

Рисунок 3. Результаты анализа изученных образцов яблони по микросателлитному локусу AJ 320188 SSR

MB – маркер молекулярного веса ДНК (pBR322/BsuR1); 1-16 сорта и формы яблони: 1 - Голден Делишес, 2 - Золотая Корона 64-16, 3 - Золотая Корона 64-II-18, 4 - Золотая Корона 64-II-36, 5 - Золотая Корона 64-1, 6 - Золотая Корона 64-7, 7 - Золотая корона 64-8, 8 - Щит, 9 - Флорина, 10 - Фламенко 64-32, 11 - Фламенко 64-27, 12 - Фламенко 64-II-24, 13 - Память Есаулу, 14 - Апорт АСС 68-2, 15 - Апорт АСС 68-32

Из результатов электрофоретического анализа продуктов ПЦР с праймерными парами, фланкирующие микросателлитные локусы, видно, что межсортовой полиморфизм может быть четко идентифицирован. К примеру, по микросателлитному локусу AJ 320188 SSR, все сорта отличаются друг от друга по размеру амплифицированных фрагментов (1- Голден Делишес, 8-Щит, 9-Флорина, 13-Память Есаулу, 14,15- Апорт АСС). Это выражено в наличии электрофоретических фрагментов на разных позициях на электрофореграмме.

Несмотря на высокий уровень межсортового полиморфизма, при сравнительной оценке результатов SSR-анализа полиморфизма на уровне сорт/клон сорта было выявлено, что сорта Голден Делишес и Флорина

имеют идентичные микросателлитные ДНК - фингерпринты с их клоновыми формами. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Полиморфизм микросателлитных локусов между сортами яблони Голден Делишес и Флорина и их клонами

Маркер Сорт	CN 581493	СН01 f03b	СН03 a04	Hi03 c04	СН01 g12	СН02 a04	Hi04 d02	AJ 320188
Голден Делишес	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Золотая корона 64-8	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Золотая Корона 64-7	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Золотая Корона 64-1	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Золотая Корона 64-II-36	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Золотая Корона 64-II-18	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Золотая Корона 64-16	204/232	144	102	198	109	93/99	182	234/259
Флорина	244	144	98/102	180/198	116	110	180/185	197/218
Фламенко 64-II- 24	244	144	98/102	180/198	116	110	180/185	197/218
Фламенко 64-27	244	144	98/102	180/198	116	110	180/185	197/218
Фламенко 64-32	244	144	98/102	180/198	116	110	180/185	197/218

Как видно из таблицы, все изученные микросателлитные ДНК-маркеры не позволили идентифицировать генетические различия на уровне сорт/клон сорта. Все клоновые формы имеют ПЦР - фрагменты идентичные по размеру с сортом, из которого были выделены. Это свидетельствует о необходимости значительного увеличения количества SSR-маркеров, используемых для клоновой идентификации. Наряду с микросателлитными маркерами, перспективным может оказаться использование других типов ДНК-маркеров, в том числе и мультилокусных. Независимо от типа ДНК-маркеров очевидна необходимость вовлечения в исследование большего количества ДНК-маркеров, в сравнении с сортовой идентификацией.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 11-04-96610 «р_юг_ц».

Список литературы

- 1 Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // Сельскохозяйственная биология.- 1998.- №5.- С.3-25.
- 2 Litt M., And Luty J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene // *Am.J.Hum.Genet.*- 1989.- V.44.- P. 388-396.
- 3 Diwan N., Cregan P.B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean // *Theor. Appl. Genet.* - 1997.- V.95. - P. 723-733.
- 4 Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations// *Genetics.*- 1997.- V.146. P. 309-320.
- 5 Silfverberg-Dilworth E. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome // *Tree Genetics & Genomes.*- 2006.- V. 2.- P. 202-224.
- 6 Goulao, L. and C.M. Oliveira. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers // *Euphytica.*- 2001.- V.- 122.- P. 81-89.
- 7 Volk, G. M. The USDA-ARS national plant germplasm system malus collection: diversity of cultivars and wild species / M. Volk, C. Richards, B. Gross [et al.] // Sixth Rosaceous Genomics Conference (RGC6): program and book of abstracts (30th September – 4th October 2012) / Mezzocorona (Trento), Italy, 2012. – P. 131.;
- 8 Gross, B. L. Identification of interspecific hybrids among domesticated apple and wild relatives / B. L. Gross, A. D. Henk, P. L. Forsline [et al.] // *Tree Genetics & Genomes.* – 2012.]
- 9 Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research.*- 1980.- V.10.- P. 4321-4325.
10. Супрун И.И., Токмаков С.В., Малюченко О.П., Ушакова Я.В., Бабаков А.В. Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров // *Известия ТСХА.*-№ 2011.- №6.- С.162-166.