

УДК 581.1:633/635

UDC 581.1:633/635

**АПРОБАЦИЯ IRAP МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ РЕТРОТРАНСПОЗОН КАССАНДРА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА В РОДЕ PRUNUS<sup>1</sup>**

**APPROVAL OF IRAP MARKERS BASED ON CASSANDRA RETROTRANSPOSON FOR THE ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISMS IN THE GENUS PRUNUS**

Степанов Илья Владимирович  
аспирант, м.н.с.

Stepanov Ilya Vladimirovich  
postgraduate student

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

Suprun Ivan Ivanovich  
Cand.Biol.Sci., Head of laboratory

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

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich  
Cand.Biol.Sci., researcher

Балапанов Ильнур Маликович  
аспирант, м.н.с.  
*Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Северо-кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук, Краснодар, Россия, e-mail: [kubansad@kubannet.ru](mailto:kubansad@kubannet.ru)*

Balapanov Ilnur Malikovich  
postgraduate student  
*State Research Institution North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Krasnodar, Russia, e-mail: [kubansad@kubannet.ru](mailto:kubansad@kubannet.ru)*

Целью исследования являлась апробация IRAP маркеров, разработанных на сливе домашней, на сортах персика, сливы русской и алычи и проведение генотипирования отечественных и зарубежных сортов сливы домашней, с последующим анализом полученных данных. В ходе апробации маркеров был выявлен высокий уровень полиморфизм как между генотипами сливы домашней, так и между исследуемыми видами. На основе результатов генотипирования 15 образцов косточковых культур была выполнена кластеризация, определившая три группы генотипов, соответствующих сортам персика, сортам сливы домашней и общая группа для сортов сливы русской и алычи

This study was aimed on testing of IRAP markers developed at plum on varieties of peach, Russian plum and cherry plum and genotyping of home and foreign varieties of plum, followed by an analysis of the data. During the testing of the markers have been identified as a high level of polymorphism between genotypes of plum and between the studied species. On the basis of the results obtained by genotyping 15 samples of Prunus was built dendrogram. Cluster analysis was divided into 3 groups corresponding varieties of P. persica, P. domestica and a common group for varieties of Russian plum and cherry plum

Ключевые слова: РЕТРОТРАНСПОЗОН CASSANDRA, РОД PRUNUS, ДНК-МАРКЕРЫ, СЛИВА ДОМАШНЯЯ, СЛИВА РУССКАЯ, АЛЫЧА, ПЕРСИК

Keywords: RETROTRANSPOSON CASSANDRA, GENUS PRUNUS, DNA MARKERS, PRUNUS DOMESTICA, RUSSIAN PLUM, CHERRY PLUM, PEACH

**Введение** За несколько десятилетий активного использования ДНК-маркеров в генетике, значительно расширился набор используемых маркерных систем. Богатство маркерных систем позволяет проводить оценку генетического разнообразия и филогенетического родства, основываясь на полиморфизме различных участков генома, будь-то сайты рестрикции, точковые мутации, микросателлитная ДНК, гены кодирующие рРНК и т.д.

<sup>1</sup> Исследования выполняются при поддержке РФФИ: проект № 14-04-32298 мол\_a

Для увеличения точности и объективности генетического анализа необходимо введение в исследовательскую практику новых маркерных систем (1).

Ретротранспозоны являются важным компонентом, распространенным в большинстве эукариотических геномов. Для них характерен процесс транспозиции без вырезания из генома, обусловленный циклами транскрипции, обратной транскрипции и встраивания новой копии в геном. Данная особенность способствует широкому и равномерному распределению ретротранспозонов на хромосомах (2). Благодаря вышеперечисленным свойствам изучение ретротранспозонов перспективно для разработки новых ДНК-маркеров. В частности существует ряд маркерных систем, таких как RBIP, REMAP, SSAP, RBIP, доказавших свою эффективность в генетических исследованиях на различных биологических объектах (3).

SSAP, IRAP и REMAP являются мультилокусными маркерами, ориентированными на анализ фрагментов ДНК с не идентифицированной локализацией в геноме. В IRAP анализируемые области располагаются между вставками ретротранспозонов. Метод SSAP позволяет анализировать последовательности между сайтом вставки ретротранспозона и сайтом рестрикции, к которому присоединяется специфичный адаптер. Метод REMAP оценивает полиморфизм областей, локализованных между ретротранспозонными вставками и ближайшими микросателлитами. RBIP маркеры, в отличие от выше перечисленных маркерных систем, позволяет определить наличие ретротранспозонной вставки в конкретном локусе. Метод RBIP анализирует, подобно SSR маркерам, единичные специфические локусы с известным месторасположением. Для данных маркерных систем характерен широкий выбор подходов к детектированию продуктов: проведение электрофореза в агарозном и полиакриламидном геле, использование капиллярного электрофореза и микрочипов. Таким образом, применение ДНК-маркеров основанных на полиморфизме ретротранспозон-

ных вставок перспективно в изучении филогении и генетического разнообразия (2).

Одним из крупных и экономически важных таксонов семейства Rosaceae является род *Prunus*. На формирование отдельных видов в рамках рода оказали влияние процессы полиплоидии, отдаленной гибридизации и интродукция. Перечисленные факторы видообразования способствовали возникновению современного видового богатства и разнообразия *Prunus* (4). В связи со сложностью эволюционного процесса и видовым разнообразием рода, данный таксон представляет интерес для молекулярно-генетических исследований.

С использованием ДНК-маркеров различной природы были проведены филогенетические исследования, направленные на выявление родственных связей внутри рода *Prunus*. В частности использовались такие маркерные системы как ITSs, рестрикционный анализ хлоропластной ДНК, RAPD и др. Данные, полученные в ходе молекулярно-филогенетических исследований подтвердили предположения о наличии двух ветвей эволюции рода *Prunus* *Amygdalus–Prunus* и *Cerasus–Laurocerasus–Padus* (5). В свою очередь в эволюционной ветви *Amygdalus–Prunus* было выявлено 3 основных кластера: один наиболее генетически отдаленный, соответствующий подроду *Amygdalus* и два более близких по отношению друг к другу, соответствующие секциям *Eurprunus* и *Armeniaca* (6).

Наибольшую сложность представляет внутривидовая классификация сливы домашней, мировой генофонд которой насчитывает более полутора тысяч сортов. Были предприняты многочисленные попытки внутривидовой систематизации сортов сливы домашней, основанные как на естественных, так и на искусственных системах распределения сортов сливы домашней по группам. Основываясь на морфо-физиологических характеристика в рамках вида слива домашняя было выделено 4 подвидов: слива

европейская (венгерки); тернослива; ренклюд; мирабель. Однако лишь ограниченное количество сортов сливы домашней можно достоверно отнести к конкретным подвидам исходя из совокупности их признаков (7).

На основе LTRs последовательностях транспозона Кассандра, обнаруженного у сливы домашней (8), были разработаны два IRAP маркера (Cass1 и Cass2). В дальнейшем эффективность разработанных маркеров была продемонстрирована на 8 словацких сортах сливы домашней (9). Кассандра является не автономным ретротранспозоном относящимся группе TRIMs (terminal-repeat retrotransposons in miniature). Данный ретротранспозон включает консервативную область 5S рибосомы и связанные с полимеразой III промотор и терминатор в LTR последовательности. Подобно остальным представителям группы TRIMs Кассандра не обладает рамками считывания для синтеза ретротранспозонных белков (8).

Целью настоящей работы является апробация маркеров Cass1 и Cass2, разработанных на сливе домашней, на сортах персика, сливы русской и алычи и проведение генотипирования 9 отечественных и зарубежных сортов сливы домашней, с последующим анализом полученных данных.

**Объекты и методы.** В качестве растительного материала для экстракции ДНК использовались молодые листья. Были проанализированы 9 генотипов сливы домашней: Краснодарская, Ренклюд Альтана, Милена, Кабардинская ранняя, Герцог, Кубанский карлик, Подруга, Стенлей, Керасий кислая. Так же в исследование были включены два генотипа сливы русской, два генотипа алычи, сорт нектарина Лола и сорт персика Ранний Кубани. ДНК экстрагировалась методом СТАВ.

Концентрация компонентов ПЦР-смеси: 1X буфер, 0,3 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 C; 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 течении 1 часа при напряжении 120 вольт. Статистическую обработку данных проводил с использованием программы DendroUPGMA, доступной на сайте: <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>.

**Результаты и обсуждение.** По результатам электрофореза продуктов амплификации был установлен полиморфизм используемых в работе маркеров в исследуемой выборке сортов. При оценке данных полученных с применением маркера Cass1 было выявлено 13 фрагментов у 9 генотипов сливы домашней из них 9 полиморфных (Рис. 1).

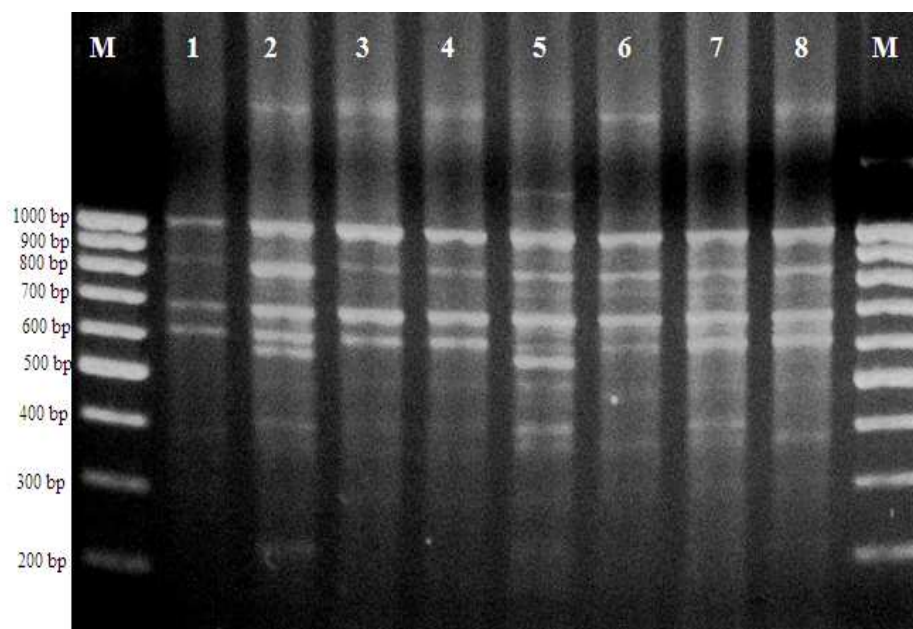


Рисунок 1 Электрофоретический анализ продуктов амплификации маркера Cass1 (слива домашняя).

Примечание: М – маркер молекулярной массы; 1-8 сорта сливы домашней:

1 Краснодарская, 2 Ренклод Альтана, 3 Милена, 4 Кабардинская ранняя, 5 Герцог, 6 Кубанский карлик, 7 Подруга, 8 Стенлей.

В свою очередь, при общем анализе 15 исследуемых генотипов косточковых было выявлено 19 фрагментов, 17 из которых являлись полиморфными. Для генотипов сливы домашней было выявлено 6 фрагментов обнаруженных только у данного вида. Для двух сортов персика так же были установлены 6 специфических фрагментов, не выявленных у 13 оставшихся генотипов (Рис 2).

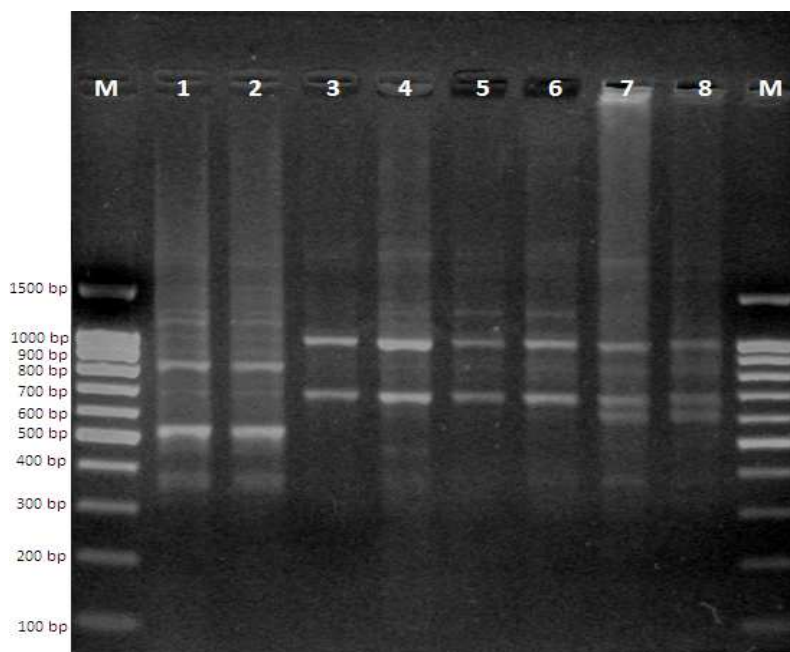


Рисунок 2 Электрофоретический анализ продуктов амплификации маркера Cass1(разные виды рода *Prunus*).

Примечание: М – маркер молекулярной массы. Нектарин: 1- Лола, Персик: 2- Ранний Кубани; Алыча: 3 – Геогджа, 4 - Неберджаевская ранняя; Слива русская: 5- Кубанская комета, 6-Гек; Слива домашняя: 7-Стенлей, 8- Керасий кислая.

Для маркера Cass2 было выявлено 12 полиморфных фрагментов из 17 обнаруженных у генотипов сливы домашней и 22 полиморфных фраг-

мента у 15 генотипов косточковых из 23. 9 фрагментов были уникальны для сливы домашней, 5 уникальны для сортов персика (Рис. 3 и Рис. 4).

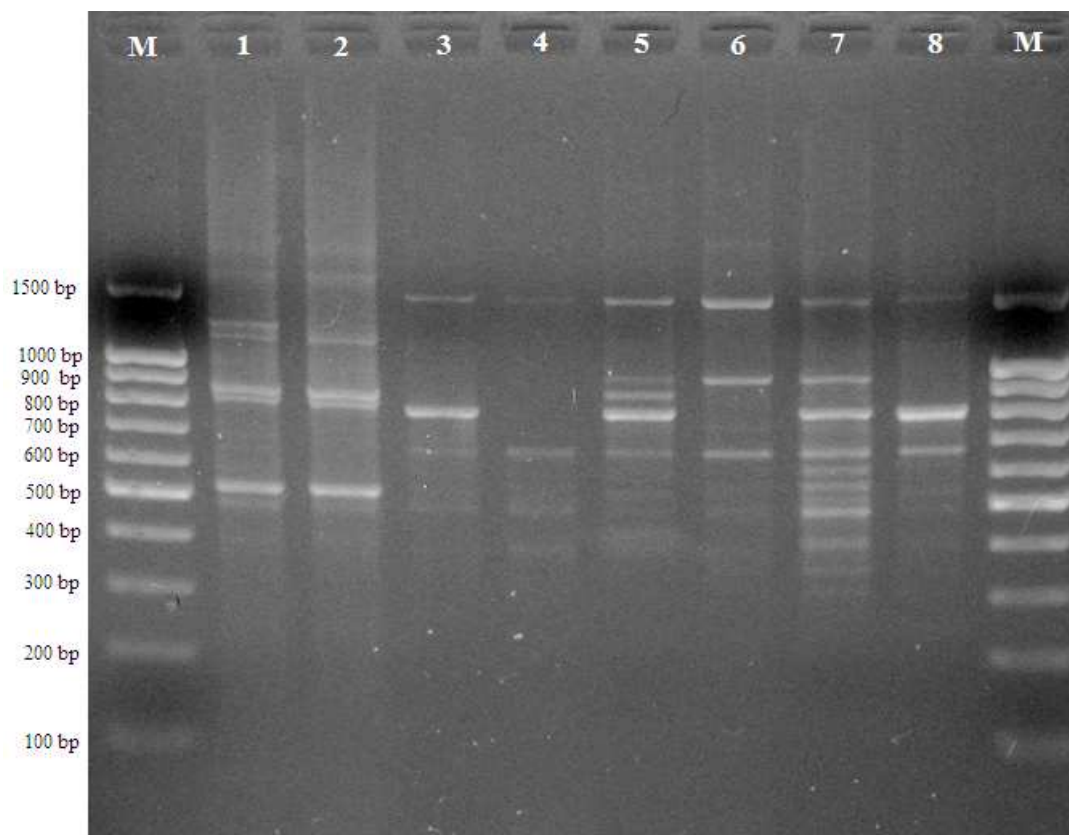


Рисунок 3 Электрофоретический анализ продуктов амплификации маркера Cass2 (разные виды рода *Prunus*)

Примечание: М – маркер молекулярной массы. Нектарин: 1- Лола, Персик: 2- Ранний Кубани; Алыча: 3 – Геогджа, 4 - Неберджаевская ранняя; Слива русская: 5- Кубанская комета, 6-Гек; Слива домашняя: 7-Стенлей, 8- Керасий кислая.



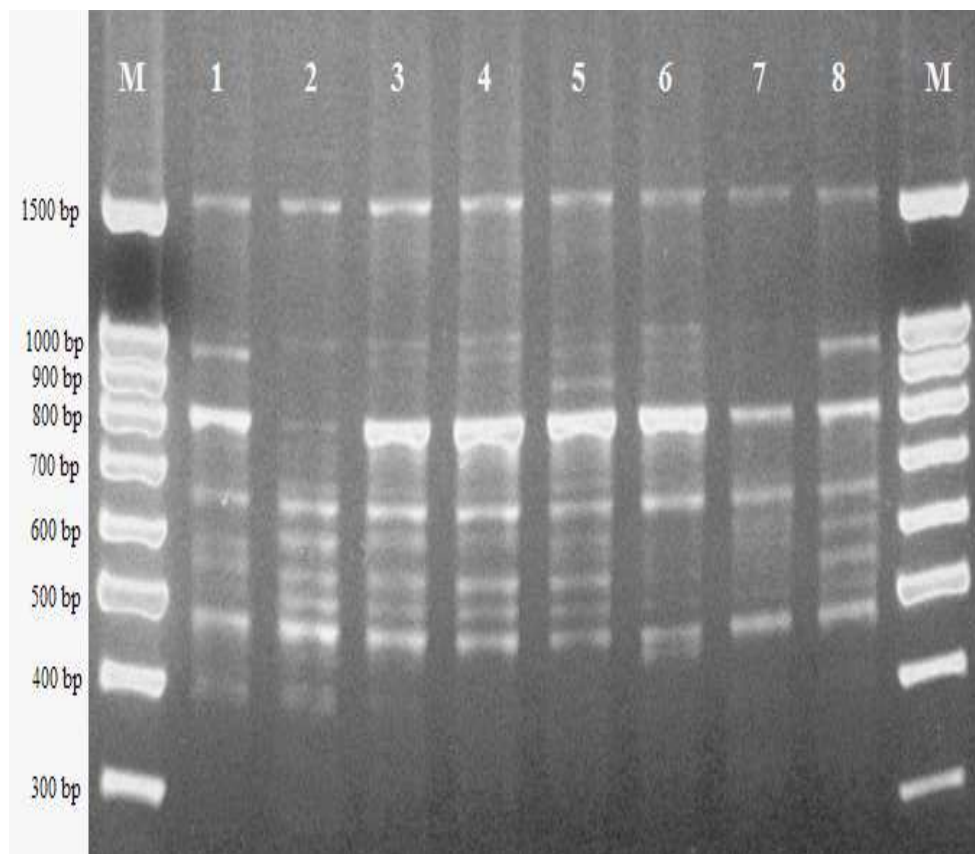


Рис. 3 Электрофоретический анализ продуктов амплификации маркера Cass2 (слива домашняя)

Примечание: М – маркер молекулярной массы. 1 Краснодарская, 2 Ренклод Альтана, 3 Милена, 4 Кабардинская ранняя, 5 Герцог, 6 Кубанский карлик, 7 Подруга, 8 Стенлей.

На основе результатов генотипирования 15 генотипов косточковых по маркерам Cass1 и Cass2 была построена дендрограмма, полученная в ходе кластерного анализа UPGMA, с применением коэффициента Dice. 15 генотипов были разделены на 3 группы, соответствующие происхождению образцов (Рис. 4).



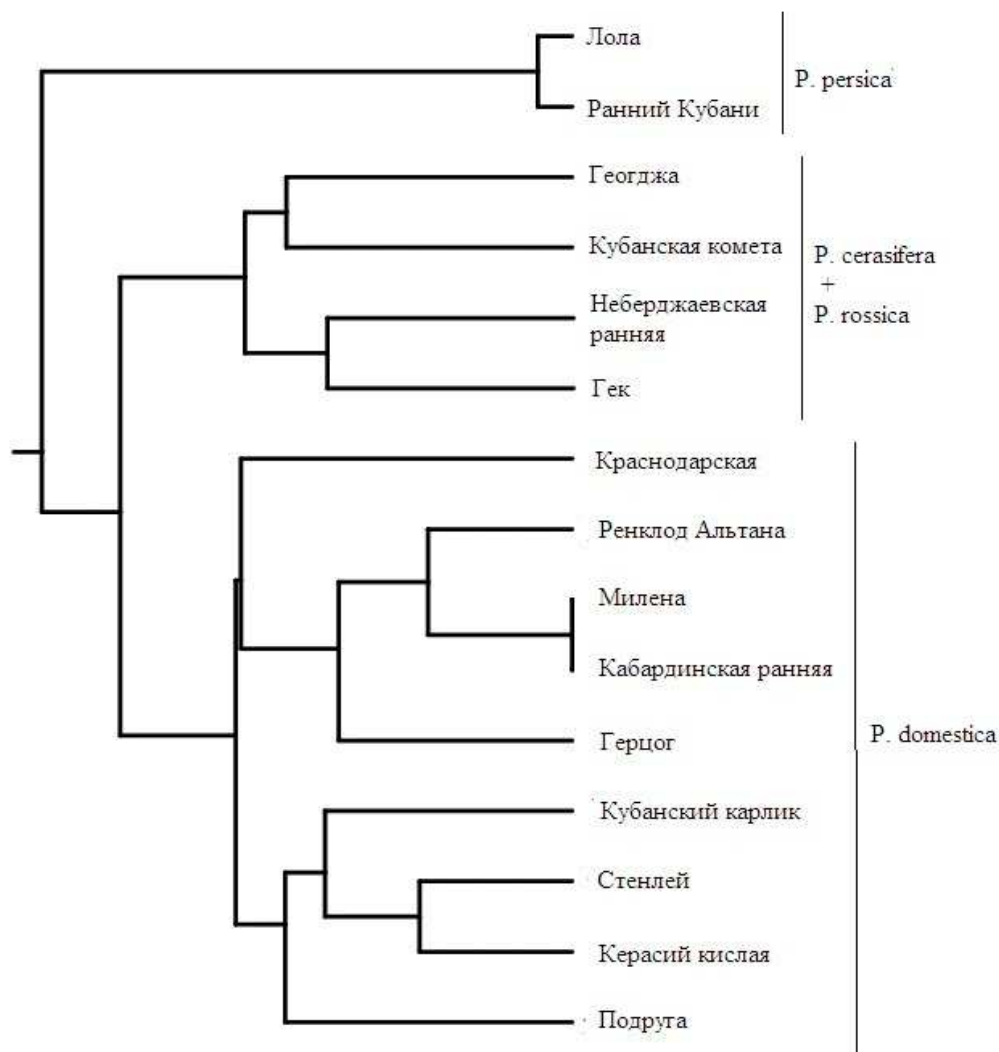


Рис. 4 Дендрограмма UPGMA кластеризации генотипов косточковых, построенная на основе данных генотипирования по IRAP маркерам Cass1 и Cass2.

Наиболее отдаленная группа была представлена двумя сортами персика и нектарина (*P. persica*). Вторая группа соответствовала диплоидным видам сливы русской (*P. rossica*) и алычи (*P. cerasifera*), находящимся в близком генетическом родстве. Все генотипы сливы домашней (*Prunus domestica*) были отнесены к третьей группе. Результаты кластеризации не отразили предполагаемой внутривидовой структуры сливы домашней, ос-

нованной на выделении четырех подвидов. Для внутривидового анализа требуется применение большего количества маркеров и более детальное проведение оценки полученных данных.

Исходя из полученных данных, был подтвержден более высокий полиморфизм маркера Cass1 в сравнении с Cass2. Оба маркера дают значительный полиморфизм между генотипами сливы домашней и могут быть использованы как эффективный инструмент в генотипировании представителей данного вида. В процессе апробации маркеров на сортах алычи сливы русской и персика были получены легко интерпретируемые спектры ПЦР - фрагментов. Однако маркер Cass1 не выявил отличий между сортами персика, а исходя из данных по Cass2, генотипы персика отличались по одному локусу.

**Заключение.** В данной работе была успешно проведена апробация маркеров Cass1 и Cass2, комплементарных LTR –последовательностям ретротранспозона Кассандра, на видах *P. persica*, *P. cerasifera* и *P. rossica*. У всех исследуемых генотипов по двум маркерам были получены ПЦР-продукты. В связи с высоким межвидовым уровнем полиморфизма, использование Cass1 и Cass2 перспективно для проведения дальнейших исследований представителей рода *Prunus*. Для детального внутривидового анализа генотипов сливы домашней на основе отработанных IRAP маркеров в дальнейшем планируется разработка REMAP маркеров.

#### Список литературы

- 1 Mohan, M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants / M. Mohan, S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna et al. // Mol. Breed. – 1997. – V.3 – P.87-103
- 2 Kumar, A. Plant retrotransposons / A. Kumar, J.L. Bennetzen // Annu. Rev. Genet. – 1999. – V.33 – P.479-532
- 3 Kalendar, R. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar, T. Grob, M. Regina et al. // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V.98 – P.704-711
- 4 Zohary D, Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* EHRH. × *P. spinosa* L. allopolyploid? Euphytica, – 1992. – V60, – P75-77.

5 Sangtae L. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA / L. Sangtae, W. Jun // American Journal of Botany, – 2001 – V88(1) – P150-160.

6 Badenes M. L. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation / M. L. Badenes, D. E. Parfitt // Theor Appl Genet – 1995 – V90 – P1035-1041

7 Витковский В. Л. Плодовые растения мира СПб: Издательство «Лань», 2003. 592 с.

8 Kalendar R, J. Tanskanen, W. Chang , et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. / R Kalendar, J. Tanskanen, W. Chang et al. // Proc Natl Acad Sci U S A., – 2008 – V.105 – P.5833-5838.

9 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.01-07

### References

1 Mohan, M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants / M. Mohan, S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna et al. // Mol. Breed. – 1997. – V.3 – P.87-103

2 Kumar, A. Plant retrotransposons / A. Kumar, J.L. Bennetzen // Annu. Rev. Genet. – 1999. – V.33 – P.479-532

3 Kalendar, R. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar, T. Grob, M. Regina et al. // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V.98 – P.704-711

4 Zohary D, Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* EHRH. × *P. spinosa* L. allopolyploid? Euphytica, – 1992. – V60, – P75-77.

5 Sangtae L. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA / L. Sangtae, W. Jun // American Journal of Botany, – 2001 – V88(1) – P150-160.

6 Badenes M. L. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation / M. L. Badenes, D. E. Parfitt // Theor Appl Genet – 1995 – V90 – P1035-1041

7 Vitovskiy V.L. Plodovie rasteniya mira SPb: Izdatelstvo «Lan'», 2003, 592 s.

8 Kalendar R, J. Tanskanen, W. Chang , et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. / R Kalendar, J. Tanskanen, W. Chang et al. // Proc Natl Acad Sci U S A., – 2008 – V.105 – P.5833-5838.

9 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.01-07