

УДК 575.22: 634.22

UDC 575.22: 634.22

03.00.00 Биологические науки

Biology

АПРОБАЦИЯ SSR-МАРКЕРОВ ВИДА PRUNUS PERSICA ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ СЛИВЫ ДОМАШНЕЙ¹

APPROBATION OF SSR MARKERS DEVELOPED FOR THE SPECIES OF PRUNUS PERSICA, IN RELATION TO DISCHARGE PLUM

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

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci., head of the laboratory
SPIN-code: 7124-5304
supruni@mail.ru

Степанов Илья Владимирович
младший научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ): 3968-1982

Степанов Илья Владимирович
младший научный сотрудник
SPIN-code: 3968-1982

Токмаков Сергей Вячеславович
к.б.н., научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ):3196-9049
Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39

Tokmakov Sergei Vyacheslavovich
Cand. Biol. Sci., staff scientist
SPIN-code:3196-9049
North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy street, 39

Микросателлитные ДНК-маркеры в настоящее время эффективно используются при изучении генетического разнообразия генофонда плодовых культур и при ДНК-паспортизации сортов. Для сливы домашней в настоящее время достаточно лимитирован перечень работ, посвященных разработке ДНК-маркеров такого типа. Чаще всего поиск новых SSR-маркеров для данного вида осуществляется путем оценки кросс-воспроизводимости маркеров, разработанных на других видах рода Prunus. В ходе исследования, для 18 SSR-маркеров, ранее разработанных на персике, была выполнена апробация и оценка перспективности использования для генотипирования вида слива домашняя. Апробация, выполненная на 4-х генетически удаленных сорта, принадлежащих к 4-м разным подвидам сливы домашней, показала эффективность их использования. В ходе исследования все апробированные ДНК-маркеры были сгруппированы в мультиплексные наборы, включающие 3-4 маркера. Это позволяет проводить генотипирование одновременно по 3-4 локусам при постановке одной реакции. Данные мультиплексные наборы предлагаются для использования в изучении генетического полиморфизма вида *Prunus domestica* L

Microsatellite DNA markers are currently used effectively in the study of the genetic diversity of the gene pool of fruit crops and DNA certification of varieties. For plum now there is rather limited list of works on the development of this type of DNA markers. Most often, the search for new SSR-markers for this species is carried out by checking of cross-reproducibility of SSR-markers developed in other species of the genus Prunus. In this study, for the 18 SSR-markers previously developed on a peach, there was performed testing and evaluation of the prospects for the use of the genotyping of plum cultivars. Testing was made on the 4 varieties of genetically distant, belonging to the 4 different subspecies of Prunus domestica L., showed the effectiveness of their use. During the study, all tested DNA-markers were grouped together in multiplex sets comprising 3-4 markers. This allows simultaneous genotyping of 3-4 loci in a single PCR reaction. These multiplex kits are available for use in the study of genetic polymorphism of species *Prunus domestica* L

Ключевые слова: СЛИВА ДОМАШНЯЯ, SSR-МАРКЕРЫ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, КРОСС - ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ, ДНК-

Keywords: PLUM, SSR-MARKERS, GENOTYPING, CROSS-TRANSFERABILITY, DNA-FINGERPRINTING

¹Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-48-230260 p_a)

ПАСПОРТИЗАЦИЯ

Doi: 10.21515/1990-4665-124-098

На данный момент наиболее востребованным методом оценки генетического разнообразия плодовых культур, в частности косточковых, остается SSR-генотипирования.

Ряд положительных особенностей характерных для данного метода определяют его стабильную популярность в генетических исследованиях.

Высокая воспроизводимость полученных результатов является одной из принципиально значимых характеристик маркерных систем. В исследовательских работах достаточно распространены такие маркерные системы как RAPD, ISSR, AFLP, IRAP, RFLP. Однако, перечисленные методы чувствительны к минимальным изменениям условий опыта. В связи с чем сведения, полученные на основе этих маркерных систем, находятся в сильной зависимости от параметров проведения анализа. Таким образом, без детального учета всех параметров и недопущения малейшего их отклонения, достоверное сопоставление результатов, полученными в разных лабораториях оказывается затруднительным. В работе с использованием SSR маркеров не возникает таких проблем. При определении размера аллелей микросателлитных локусов отклонения в результатах минимальны и во многом связаны со способом визуализации данных, определяющим точность анализа.

Также к важнейшей характеристике молекулярных маркеров можно отнести их полиморфизм в исследуемой выборке генотипов. Полиморфизм или аллельное разнообразие того или иного локуса связаны с скоростью накопления в нем мутации в процессе филогенеза. Микросателлиты мутируют в тысячи раз чаще структурных генов благодаря специфической мутации вставки и выпадения повторяющихся мотивов. В связи с чем SSR относятся к высокополиморфным маркерным системам.

Существует еще одна особенность SSR-маркеров, делающая их весьма перспективным инструментом в различных генетических исследованиях. Микросателлитные маркеры кодоминантны по своей природе, этот факт позволяет успешно отслеживать преемственность аллелей SSR локусов в череде поколений, а, следовательно, служит решающим фактором в выборе маркерной системе в работах по проверке достоверности родословных.

Обобщая выше изложенный материал можно заключить, что SSR генотипирование является эффективным методом для проведения генетического анализа. Создание SSR маркеров и последующее расширение списка видов для их потенциального использования остаются актуальными задачами по сей день. Особо важное значение приобретают работы по созданию и/или апробации микросателлитных маркеров на генетически слабо исследованных объектах.

Относительно других видов рода *Prunus* генетика сливы домашней довольно плохо изучена, это частично обусловлено сложным аллополиплоидным геномом вида. Тем не менее, по изучению генетического разнообразия ядерной и цитоплазматической наследственной информации *Prunus domestica* было проведено несколько исследований [1, 2, 3, 4]. Наиболее раннее изучение ядерного генома сливы домашней основывалось на использовании RAPD [3] (Random Amplified Polymorphic DNA) и RFLP [2] маркеров.

В сравнение с другими основными культурами рода *Prunus*, такими как персик, черешня, абрикос и миндаль, [5, 6, 7] в исследованиях вида слива домашняя было задействовано незначительное количество SSR маркеров. Первое исследование с использованием микросателлитных маркеров было проведено на 5 балканских сортах и 10 наиболее известных сортах мировой селекции. Десять микросателлитов, использованных в данной работе, были изолированы из ядерного и хлоропластного генома

абрикоса [8]. Не смотря на малую выборку сортов и количество задействованных маркеров, в исследовании была продемонстрирована перспективность дальнейшего использования SSR маркеров в изучении мирового генофонда сливы домашней.

Подобные исследования на трех видах сливы (*P. domestica*, *P. cerasifera* и *P. spinosa*) были проведены с помощью SSR в сочетании с хлоропластными ДНК-маркерами [9]. В работе были использованы SSR маркеры ВРРСТ007, ВРРСТ014, ВРРСТ025, UDP 98-407 и СРSCT026. Все маркеры кроме последнего были разработаны на персике, маркер СРSCT026 создан на японской сливе. Исследование было проведено на значительной выборке включающей 80 сортов сливы домашней, в основном традиционные французские сорта. В 2014 году была опубликована работа, в которой микросателлитные маркеры были успешно использованы в филогенетической оценке 24 генотипов в рамках подвида *P. domestica subsp. italic* [10]. В том же году осуществлен анализ сортов сливы домашней, возделываемых в Белоруссии, по 20 SSR маркерам [11]. В свою очередь в 2016 году нами были проделана работа по предварительной генетической оценке сортов из коллекций МОС ВИР и КОСС ВИР по 8 SSR маркерам [12, 13].

Так же следует отметить, что SSR-генотипирование сливы домашней проводилось в работе направленные на исследование кросс-трансферабельности SSR маркеров на различных видах *Prunus* [14].

Очевидно, что идентификация информативных SSR-маркеров для сливы домашней, основанная на оценке кросс-воспроизводимости ДНК-маркеров, разработанных для других видов рода *Prunus*, может быть эффективным методом в научной практике. Однако, несмотря на это, на сегодняшний день для искомого вида был апробирован достаточно ограниченный перечень SSR-маркеров.

В связи с тем, что для вида *Prunus domestica* L. в настоящее время не разработано значительного количества ДНК-маркеров, позволяющих оценивать геномный полиморфизм с учетом равномерного покрытия всех групп сцепления в геноме, а также с перспективностью оценки кросс воспроизводимости SSR-маркеров, изначально разработанных на других видах рода *Prunus*, нами были поставлены следующие задачи:

- апробировать применительно к виду слива домашняя SSR-маркеры, разработанные ранее для персика (*Prunus persica*) с использованием гетерогенной выборки, представляющей известные подвиды вида *Prunus domestica*;

- разработать мультиплексные наборы SSR-маркеров, позволяющие эффективно проводить генотипирование образцов сливы домашней.

Материал и методы исследования

Апробация SSR маркеров проводилась на 4 контрастных (генетически удаленным друг от друга) генотипах, относящихся к четырем подвидам сливы домашней. Для работы были отобраны широко распространенный в садоводческой практике американский сорт Стэнлей относящийся к венгеркам (*Prunus domestica subsp. domestica*), стародавний европейский сорт Ренклюд зеленый (*Prunus domestica subsp. italica*), типичная тернослива (*Prunus domestica subsp. institia*) Керасий кислая и Мирабель маленькая, относящаяся к подвиду мирабелей (*Prunus domestica subsp. syriaca*). Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев в фазу распускания. Для экстракции использовали метод ЦТАБ [15]. Постановку ПЦР проводили по общепринятым методикам, но с оптимизацией таких параметров как температура отжига праймеров, концентрация праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов. Окончательный состав ПЦР смеси и программа амплификации были следующие: в состав ПЦР смеси, общем объемом 25 μ L, входили 50 нг ДНК, 0,25мМ dNTPs, 0,2 μ M каждого

праймера; 2,5 μ L 10-кратного реакционного буфера (ООО «Сибэнзим»), 1 единица Taq-полимеразы. ПЦР-программу проводили по следующей схеме: 3 минут при 94°C – начальная денатурации, следующих 35 циклов: 45 секунд денатурации при 94°C, 45 секунд отжиг праймеров при 58°C, 45 секунд синтез при 72°C; последний цикл синтеза 4 минуты 30 секунд при 72°C. Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1. В работе использовали SSR-маркеры, разработанные для персика: UDP98-412, ВРРСТ037, ВРРСТ023, ЕРРСУ3117, RPPG1 - 032, RPPG1 - 026, RPPG3 - 026, RPPG4 - 059, RPPG1 - 017, RPPG1 - 041, RPPG6 - 033, RPPG1 - 037, RPPG2 - 011, RPPG4 - 059, СРРСТ004, ВРРСТ007, СРРСТ044, СРРСТ040 [7, 16].

Результаты

Одним из важнейших критериев при составлении мультиплексных наборов является размер амплифицируемых фрагментов микросателлитных ДНК-маркеров. В один мультиплексный набор необходимо включать SSR-маркеры с неперекрывающимися диапазонами размеров ПЦР-продуктов. В противном случае возможно перекрытия диапазонов продуктов ПЦР различных маркеров, что затрудняет дальнейшую интерпретацию полученных результатов. Не менее важным критерием является сходная температура отжига праймеров, включенных в мультиплексный набор.

При составлении мультиплексных наборов для каждого маркера был использован специфичный для него флуоресцентный краситель: карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбоксиродамин (R6G), карбокси-X-родамин (ROX), тетраметилкарбоксиродамин (TAMRA). Для каждого из перечисленных красителей характерен свой оптический спектр

флуоресценции. Это позволяет безошибочно идентифицировать. В таблице 1 приведена информация о разработанных в ходе исследования мультиплексных наборах SSR-маркеров.

Таблица 1 Мультиплексные наборы SSR-маркеров, сформированные в результате выполнения исследований

№	SSR-локус	Флуорофор	Диапазон размера фрагментов
1	RPPG1-032	ROX	225-231
	RPPG1 - 026	FAM	230-235
	RPPG3-026	R6G	255-355
2	RPPG6 - 033	R6G	101-119
	RPPG4 - 059	ROX	155-178
	RPPG1 - 017	FAM	172-184
	RPPG1 - 041	TAMRA	219-247
3	RPPG2 - 011	R6G	196-232
	RPPG1 - 037	FAM	234-237
	RPPG4 - 059	ROX	226-258
4	CPSC004	ROX	124-128
	BPPCT007	TAMRA	129-145
	CPPCT044	FAM	149-174
	CPPCT040	ROX	189-229
5	UDP98-412	ROX	89-129
	BPPCT037	FAM	101-128
	BPPCT023	R6G	249
	EPCCU3117	TAMRA	164-174

В таблице представлена информация о типе флуоресцентного красителя, использованного для маркера, диапазон длин амплифицированных фрагментов, согласно с полученными нами данными. Как видно, диапазон размеров амплифицируемых фрагментов в большинстве случаев не перекрывается, что способствует более эффективному проведению оценки результатов генотипирования.



Рисунок 1 Генотипирование сортов сливы домашней по мультиплексному набору, включающему SSR-маркеры RPPG1 - 032, RPPG1 - 026 и RPPG3 - 026

Условные обозначения: 1- Стэнлей, 2- Мирабель маленькая, 3 - Ренклюд зеленый, 4 - Керасий кислая

На электрофореграммах, что для каждого SSR-маркера, входящего в мультиплексный набор, идентифицируются пики специфичного для него цвета. Название соответствующего маркера обозначено, цветом, идентичным цвету пика. В связи с тем, что слива домашняя имеет гексаплоидный геном, количество аллелей по локусу может достигать шести у одного генотипа. В связи с этим по некоторым SSR-макрерам идентифицируется до 4-5 пиков (маркер RPPG3-026-рисунок 1, RPPG6-033, RPPG1-07 – рисунок 2). Это соответствует числу аллельных вариантов, предстваленных в геноме сорта по данному SSR-локусу.



Рисунок 2 Генотипирование 2 контрастных сортов сливы домашней по мультиплексному набору, включающему SSR-маркеры RPPG6-033, RPPG4-059, RPPG1-017, RPPG1-041.

Условные обозначения: 1- Мирабель маленькая, 2 - Керасий кислая

По результатам генотипирования были получены четкие, достоверно идентифицируемые SSR-фингерпринты для всех изученных сортов. Сочетания в мультиплексных наборах позволили эффективно проводить генотипирование одновременно по нескольким локусам. Данные мультиплексные наборы могут быть в дальнейшем использованы в изучении генетического полиморфизма вида *Prunus domestica* L.

Таким образом, в результате работы была выполнена оценка кросс-воспроизводимости SSR-маркеров, разработанных для персика, на виде слива домашняя и определена их дальнейшая перспективность для генотипирования сортов сливы домашней. Разработанные мультиплексные наборы дополняют методическую базу для генотипирования сортов данной культуры.

Литература

- 1 Malusa, E. A new method to study genetic variation of vegetals for breeding purposes. Note I : Study on Prunus. / E. Malusa, A. Marchesini // *Fitoterapia*. 1993, - №64 - P.427-432
- 2 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, - №90 – P.1035-1041.
- 3 Casas, A.M. Genetic diversity of Prunus rootstocks analysed by RAPD markers / A.M. Casas, E. Igartua, G. Balaguer, M.A. Moreno // *Euphytica*. 1999, - №110 - P.139-149
- 4 Shimada, T. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA analysis. / T. Shimada, H. Hayama, T. Haji, M. Yamaguchi et al // *Euphytica* 1999. - №109 - P.143-147
- 5 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.
- 6 Sosinski, B. Characterisation of microsatellite markers in peach Prunus persica L Batsch. / B. Sosinski, M. Gannavarapu, L.D. Hager, L.E. Beck et al // *Theoretical and Applied Genetics*. 2000, - №101 - P.421-428.
- 7 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.
- 8 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
- 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 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
- 11 Урбанович О.Ю., Исследование генетического разнообразия сортов слив с помощью молекулярных маркеров SSR-типа / О.Ю.Урбанович, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2014 - 58(5) – С.92-97.
- 12 Степанов, И.В. Анализ SSR-полиморфизма Северо-Кавказских сортов сливы домашней / И.В. Степанов, И.И. Супрун, Е.В. Лободина // Научные труды СКЗНИИСИВ. - 2016. - Т.9. - С.78-84.
- 13 Степанов И. В. Оценка генетического разнообразия сортов сливы домашней селекции МОС ВИР с использованием SSR-маркеров / И. В.Степанов, И.И. Супрун, С.В. Токмаков // Международный саммит молодых ученых материалы конф. 2016 - С.193-197
- 14 Wunsch, A., Cross-transferable polymorphic SSR loci in Prunus species. *Sci. Hort.* - 2009.- V120, P.348-352.
- 15 Murray, M. G., Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*, 1980. V. 10. P. 4321-4325.
- 16 M. T. Dettori, S. Micali, J. Giovannini Mining microsatellites in the peach genome: development of new long core SSR markers for genetic analyses in five Prunus species Springer Plus - 2015 - 4:337

References

- 1 Malusa, E. A new method to study genetic variation of vegetals for breeding purposes. Note I : Study on Prunus. / E. Malusa, A. Marchesini // *Fitoterapia*. 1993, - №64 - P.427-432
- 2 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, - №90 – P.1035-1041.
- 3 Casas, A.M. Genetic diversity of Prunus rootstocks analysed by RAPD markers / A.M. Casas, E. Igartua, G. Balaguer, M.A. Moreno // *Euphytica*. 1999, - №110 - P.139-149
- 4 Shimada, T. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA analysis. / T. Shimada, H. Hayama, T. Haji, M. Yamaguchi et al // *Euphytica* 1999. - №109 - P.143-147
- 5 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.
- 6 Sosinski, B. Characterisation of microsatellite markers in peach Prunus persica L Batsch. / B. Sosinski, M. Gannavarapu, L.D. Hager, L.E. Beck et al // *Theoretical and Applied Genetics*. 2000, - №101 - P.421-428.
- 7 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.
- 8 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
- 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 Gharbi, O. Characterization of accessions of 'Reine Claude Verte' plum using Prunus SRR and phenotypic traits / O. Gharbi, A. Wünsch, J. Rodrigo // *Scientia Horticulturae*, 2014. - №169 - P.57-65

11 Urbanovich O.Ju., Issledovanie geneticheskogo raznoobrazija sortov sliv s pomoshh'ju molekuljarnyh markerov SSR-tipa / O.Ju.Urbanovich, P.V. Kuzmickaja, Z.A. Kozlovskaja // Doklady Nacional'noj akademii nauk Belarusi. – 2014 - 58(5) – С.92-97.

12 Stepanov, I.V. Analiz SSR-polimorfizma Severo-Kavkazskih sortov slivy domashnej / I.V. Stepanov, I.I. Suprun, E.V. Lobodina // Nauchnye trudy SKZNIISiV. - 2016. - T.9. - S.78-84.

13 Stepanov I. V. Ocenka geneticheskogo raznoobrazija sortov slivy domashnej selekcii MOS VIR s ispol'zovaniem SSR-markerov / I. V.Stepanov, I.I. Suprun, S.V. Tokmakov // Mezhdunarodnyj sammit molodyh uchenyh materialy konf. 2016 - S.193-197

14 Wunsch, A., Cross-transferable polymorphic SSR loci in Prunus species. Sci. Hort. - 2009.- V120, P.348-352.

15 Murray, M. G., Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research, 1980. V. 10. P. 4321-4325.

16 M. T. Dettori, S. Micali, J. Giovinazzi Mining microsatellites in the peach genome: development of new long-core SSR markers for genetic analyses in five Prunus species Springer Plus - 2015 - 4:337