

УДК 581.1:633/635

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

И.И. СУПРУН¹, С.В. ТОКМАКОВ¹, О.П. МАЛЮЧЕНКО^{2,3},
Я.В. УШАКОВА¹, А.В. БАБАКОВ²

(¹ ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии;
² ГНУ ВНИИСБ Россельхозакадемии;³ ЗАО «Синтол»)

Анализ генетического полиморфизма 12 сортов яблони отечественной селекции проводили посредством изучения аллельного состояния шести микросателлитных локусов: CN03a04, CN581493-SSR, CN04e03, CN03a02, Nil6d02, CN01F03b. Было установлено, что все сорта обладают уникальным аллельным набором. Оценка степени генетического сходства сортов была проведена с помощью кластерного анализа. Получены исходные данные для ДНК-паспортизации изученных генотипов яблони.

Ключевые слова: яблоня, генотипирование, микросателлитные ДНК-маркеры, генетическое разнообразие.

Развитие методов молекулярного ДНК-маркирования радикально изменило подходы к 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 растений: 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 и межвидовых отношений; анализ родства видов и генотипов для наиболее эффективного подбора родительских пар при гибридизации;
- 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 регистрация источников и доноров ценных признаков, решение спорных вопросов авторства сортов и образцов растений [1].

Среди методов молекулярного ДНК-маркирования широкое распространение нашли ДНК-маркеры, основанные на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома (SSR-simple sequence repeat).

Источник полиморфизма микросателлитных последовательностей (SSR)-сайт — специфическое варьирование длины повтора, что, в свою очередь, обуслов-

лено различием в числе единиц повтора [5]. 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, 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 яблони построены детальные молекулярно-генетические карты с использованием SSR ДНК-маркеров [4, 5]. С использованием полиморфизма SSR-локусов был выполнен ряд работ по оценке генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов яблони и ДНК-паспортизации сортов [2, 3].

В задачи наших исследований входило выполнение ДНК-фингерпринтинга и анализа генетического полиморфизма ряда сортов яблони отечественной селекции с применением анализа микросателлитных локусов.

Материал и методы исследований

Объектом исследований послужили 12 районированных и перспективных для Северо-Кавказского и Центрально-Черноземного региона сортов яблони отечественной селекции.

В работе изучали полиморфизм шести микросателлитных маркеров: CH03a04, CN581493-SSR, CH04e03, CH03a02, H16d02, CH01F03b. Данные о нуклеотидных последовательностях праймеров, фланкирующих указанные микросателлитные локусы, а также информация о типе повтора, входящего в их структуру, известны из работ [4, 5].

Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 1 мин при 94°C для начальной денатурации; следующие 30 циклов: денатурация 30 с при 94°C; 30 с отжиг праймеров при температуре 60°C; 30 с синтез при 72°C. Финальный цикл синтеза при 72°C — 5 мин.

ПЦР-смесь включала следующие компоненты: 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси (производство ЗАО «Синтол»; Кат. № М-428), содержащей Taq ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеозидтрифосфаты, MgCl₂, по 10 пкмоль прямого и обратного праймера (прямой праймер с флуоресцентной меткой на 5' конце), 50 нг геномной ДНК в общем реакционном объеме 25 мкл. ПЦР проводили в ДНК-амплификаторе 2720 TermalCycler.

Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили в автоматическом секвенаторе ABI prism 3130x1 по стандартным методикам.

Для проведения статистической обработки использовали пакет статистических программ Statistica 6.0.

Результаты

В результате работы был выявлен уровень полиморфизма от 4 (маркер H16d02) до 11 аллелей (маркер CH03a04) на локус в изученной выборке сортов. При этом все сорта обладали уникальным аллельным набором, позволяющим идентифицировать их среди сортов изученной выборки.

Данные об аллельных комбинациях SSR-маркеров у изученных сортов яблони представлены в таблице. Размер амплифицированных фрагментов указан в парах оснований.

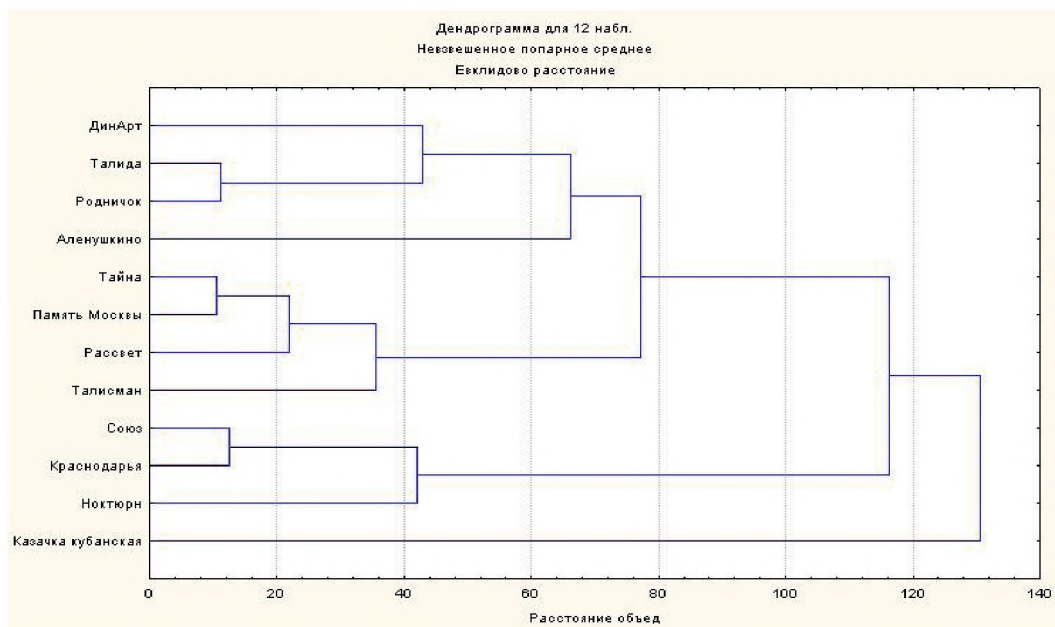
Аллельный полиморфизм SSR-маркеров

SSR-локус Сорт	CH03a04	CN581493-SSR	CH04e03	CH03a02	Hi 16d02	CH0ШЗЬ
Дин Арт	95/97	200/204	190	141	143/164	167
Аленушкино	97/103	192/200	190	84	143/160	166
Казачка кубанская	116/118	200/217	84	126/127	143	167
Талида	101/103	200/208	190	141	143	167
Родничок	107	192/214	201	141	143	167
Тайна	103	200/208	190	141	143	163/167
Талисман	114/118	192/208	183	126/127	143	163/167
Союз	93/103	198	183	129	143/163	167
Рассвет	103	192/200	184	123	143	167/175
Память Москвы	97/103	192/200	200	141	143	166/167
Краснодарья	103/112	206	192	127	143/164	167
Ноктюрн	97/103	207	190	127	143	167

Как видно из представленных в таблице данных, гетерозиготность, характеризующаяся одновременным присутствием двух амплифицированных фрагментов разного размера, также значительно варьирует. Максимальный уровень гетерозиготности был выявлен по SSR-локусам CH03a04 и CN581493-SSR. Меньшую степень гетерозиготности выявили по локусам CH03a02, Hi16d02, CH01f03b. По локусу CH04e03 у всех изученных сортов было идентифицировано гомозиготное состояние.

На основании комплекса данных о частоте встречаемости аллелей и о размере амплифицированных последовательностей для каждой аллели была проведена оценка степени генетического сходства изученных сортов яблони. Для этой цели использовали кластерный анализ. Результаты кластеризации представлены на дендрограмме.

Анализ полученного в результате кластеризации иерархического дендрита позволяет выделить в выборке исследованных сортов две основные группы (кластера). В кластер 1 отнесены сорта Дин Арт, Талида, Родничок, Аленушкино, Тайна, Память Москвы, Рассвет, Талисман, в то время как кластер 2 включает сорта Союз, Краснодарья, Ноктюрн. Сорт Казачка Кубанская выделен в отдельную ветвь дендрита. Данный сорт, полученный в результате гибридизации сортов Джонаред и Кубань спур, имеет одну общую родительскую форму (Кубань спур) с сортом Краснодарья. Помимо сорта Краснодарья, ни один из изученных сортов не имеет с ним общих родительских форм. Три сорта — Талисман, Рассвет и Союз — происходят из гибридной комбинации Редфри/Папировкатетраплоидная. По результатам кластеризации два из них (Талисман и Рассвет) отнесены в один кластер. Отнесение сорта Союз в другой кластер может быть объяснено высоким уровнем рекомбинации в гибридной популяции, из которой были отобраны указанные сорта. Из четырех сортов: Ноктюрн, Тайна, Талида и Родничок, имеющих одну общую родительскую форму — сорт Уэлси тетраплоидный, три отнесены в состав кластера 1. В целом, по результатам анализа



**Дендрограмма степени генетического сходства,
полученная по данным SSR-анализа сортов яблони**

генеалогии сортов можно говорить об объективности разделения кластеров и информативности SSR-маркеров при оценке степени генетического родства образцов.

Таким образом, результаты проведенного исследования, выполненного с использованием 6 микросателлитных маркеров, позволяют однозначно идентифицировать изученные сорта яблони и объективно характеризовать степень их генетического родства. Возможно, что при увеличении выборки сортов появится вероятность совпадения индивидуальных геномных отпечатков. Это можно исключить за счет увеличения количества используемых ДНК-маркеров.

В целом результаты работы говорят о высокой перспективности дальнейшего использования SSR-маркеров CN03a04, CN581493-SSR, CN04e03, CN03a02, Hn16d02, CN01F03b в исследованиях по оценке генетического разнообразия отечественной генплазмы яблони и подтверждают эффективность применения ДНК-маркерных систем, основанных на анализе полиморфизма микросателлитных последовательностей генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

Исследования выполнены при поддержке РФФИ: грант № 11-04-90777-моб_ст.

Библиографический список

1. *Конарев А.В.* Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // Сельскохозяйственная биология, 1998. №5. С. 3-25.
2. *Garkava-Gustavsson L., Kolodinska-Brantestam A. et al.* Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis // Hereditas, 2008. V 03. P. 1-14.

3. *Goulao I., Oliveira C.M.* Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers // *Euphytica*, 2001. V. 122. P. 81-89.
4. *Liebhart R, Gianfranceschi L. et al* Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) // *Molecular Breeding*, 2002. V. 10(4). P. 217-241.
5. *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.
6. *Si I/verb erg-1 ji I worth E., Matasci C.L. et al* Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh) genome // *Tree Genetics & Genomes*, 2006. V. 2(4). P. 202-224.

Рецензент — д. б. н. Л.И. Хрусталева

SUMMARY

Genetic polymorphism of 12 apple varieties of domestic selection was analyzed by studying the allelic state of six microsatellite loci: CH03a04, CN581493-SSR, CH04e03, CH03a02', Hil6d02, CH01F03b. It has been established that all varieties have a unique set of alleles. Evaluation of the genetic relationships is conducted by using cluster analysis. Data for DNA-fingerprinting of studied apple's genotypes were obtained.

Key words: apple, genotyping, microsatellite DNA markers, SSR, genetic diversity.

Супрун Иван Иванович — к. б. н., зав. сектором ГНУ СКЗНИИСиВ.

Тел. (499) 977-74-55. Эл. почта: ivan-SN@rambler.ru.

Токмаков Сергей Вячеславович — мл. науч. сотр. ГНУ СКЗНИИСиВ.

Малюченко Олег Петрович — ст. науч. сотр. ГНУ ВНИИСБ, ст. науч. сотр. ЗАО «Синтол».

Ушакова Яна Владимировна — асп. ГНУ СКЗНИИСиВ.

Бабаков Алексей Владимирович — д.б.н., зав. лабораторией ГНУ ВНИИСБ.