

УДК [634.11+634.13]:575.2

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМА ЯБЛОНИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК***

Шамшин И.Н.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Мичуринский государственный аграрный университет»
(Мичуринск)*

Кудрявцев А.М., д-р биол. наук

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
(Москва)*

Савельев Н.И., д-р с.-х. наук, академик РАСХН

*Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский
институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина
Россельхозакадемии (Мичуринск)*

Реферат. Проанализированы 15 SSR-локусов у сортов яблони селекции различных стран для выявления генетического полиморфизма.

Ключевые слова: яблоня, микросателлиты, генетический полиморфизм, SSR-анализ

Summary. The fifteen of SSR-loci of apple varieties, which were selected in the different countries, were analyzed to identify their genetic polymorphism.

Key words: apple, microsatellites, genetic polymorphism, SSR-analysis

Введение. Целенаправленный выбор родительских пар для скрещивания значительно сокращает работу селекционера и повышает ее эффективность. Одним из первоначальных этапов данной работы является оценка генетического разнообразия селекционного материала. В последнее время широкое применение на этом этапе находят молекулярные маркеры, позволяющие ускорить оценку. Одними из таких маркеров являются простые повторяющиеся последовательности – микросателлиты.

Анализ микросателлитных последовательностей (SSR-анализ) представляет собой универсальную систему для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используется в исследованиях генетического полиморфизма популяций растений.

В ходе работы нами был проанализирован полиморфизм ДНК сортов яблони селекции различных стран мира с использованием SSR-анализа.

Объекты и методы исследований. Биологическими объектами исследования послужили сорта из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина. Экстракция ДНК была проведена по методике Эдвардса [1] в собственной модификации с применением очистки от полифенольных соединений хлоридом лития. Амплификацию проводили в приборе GeneAmp 9700 производства фирмы «AppliedBiosystems» или ДТ-96 фирмы «ДНК-технология».

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМdNTP, 2,5 мМ MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 10x стандартного ПЦР-буфера.

* Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации ГК №16.М04.11.0023

Анализ генетического полиморфизма сортов проводили с использованием микросателлитных праймеров [2]. Реакцию проводили по следующей программе: 940С – 2 мин 30с; 4 цикла: 650С – 30с, 720С – 1 мин при этом температура отжига праймера с каждым циклом понижается на 10С; 30 циклов: 940С – 30с, 600С – 1 мин, 720С – 1 мин; 720С – 5 мин.

Разделение продуктов амплификации с микросателлитными праймерами проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камере (BIO-RAD). В качестве буферной системы использовали ТВЕ. Проявляли гель, используя многократный метод проявки (Benbouzaetal., 2006).

Обсуждение результатов. Культурные сорта яблони представляют собой сложные гибриды между несколькими дикими видами (*Malus silvestris*, *Malus sieversii*, *Malus orientalis*, *Malus baccata*), которые произрастают в различных природно-климатических зонах. Среди таких гибридов наибольшую роль в развитии культурного плодового дерева сыграли гибридные виды (*M x prunifolia*, *M x floribunda*, *M x zumi* и др.), которые возникли на границах ареалов и являются более устойчивыми и приспособленными, чем чистые виды [3].

Были проведены исследования по изучению генетического разнообразия отечественных и зарубежных сортов яблони.

Нами проанализированы 15 микросателлитных локусов на 56 растениях яблони. ПЦР продукты предварительно визуализировали на агарозном геле, чтобы подтвердить, что амплификация прошла успешно. После этого амплификат разделяли методом электрофореза в 40% полиакриламидном геле. Данный метод позволил разделить фрагменты, отличающиеся на 1 пару нуклеотидов. При амплификации был получен индивидуальный набор фрагментов для каждого из образцов. Все используемые в работе маркеры выявили высокий уровень межсортового полиморфизма (табл.).

Число фрагментов и уровень общего полиморфизма, выявляемый с помощью использованных SSR праймеров

Праймер	Последовательность праймера	Число фрагментов спектра		Уровень полиморфизма, %
		всего	поли-морфных	
CH05g03	ataaggatacaaaaa ccc tacaca g	15	15	100
CH03d11	acccca cag aaacctct cc	16	16	100
CH04e03	ttgaagatgtttggctgtgc	16	16	100
COL	aggagaaaggcgtttacctg	10	10	100
CH02c02b	tgcatg cat ggaaacgac	10	10	100
CH02g04	ttttaccttttacctgtactgagc g	18	18	100
CH03d12	gcc cag aagcaataagtaaac c	16	16	100
CH03d07	caatcaatgcaaaactgtca	20	20	100
CH03d01	cgcaccacaatcca act c	11	11	100
CH03d08	cat cag tctctgactggaa a	16	16	100
CH01f03b	gtaatggaaata cag tttcaca	15	15	100
CH05g08	ccaagaccaaggcaa cat tt	12	12	100
CH04c07	ggccttccatgtctcagaag	13	13	100
CH03a04	gacgcataacttcttccac c	18	18	100
Md-Exp7	caaaagtgtgtggccgtgacaa	11	11	100
	Всего:	217	217	100
	Среднее:	14,5	14,5	100

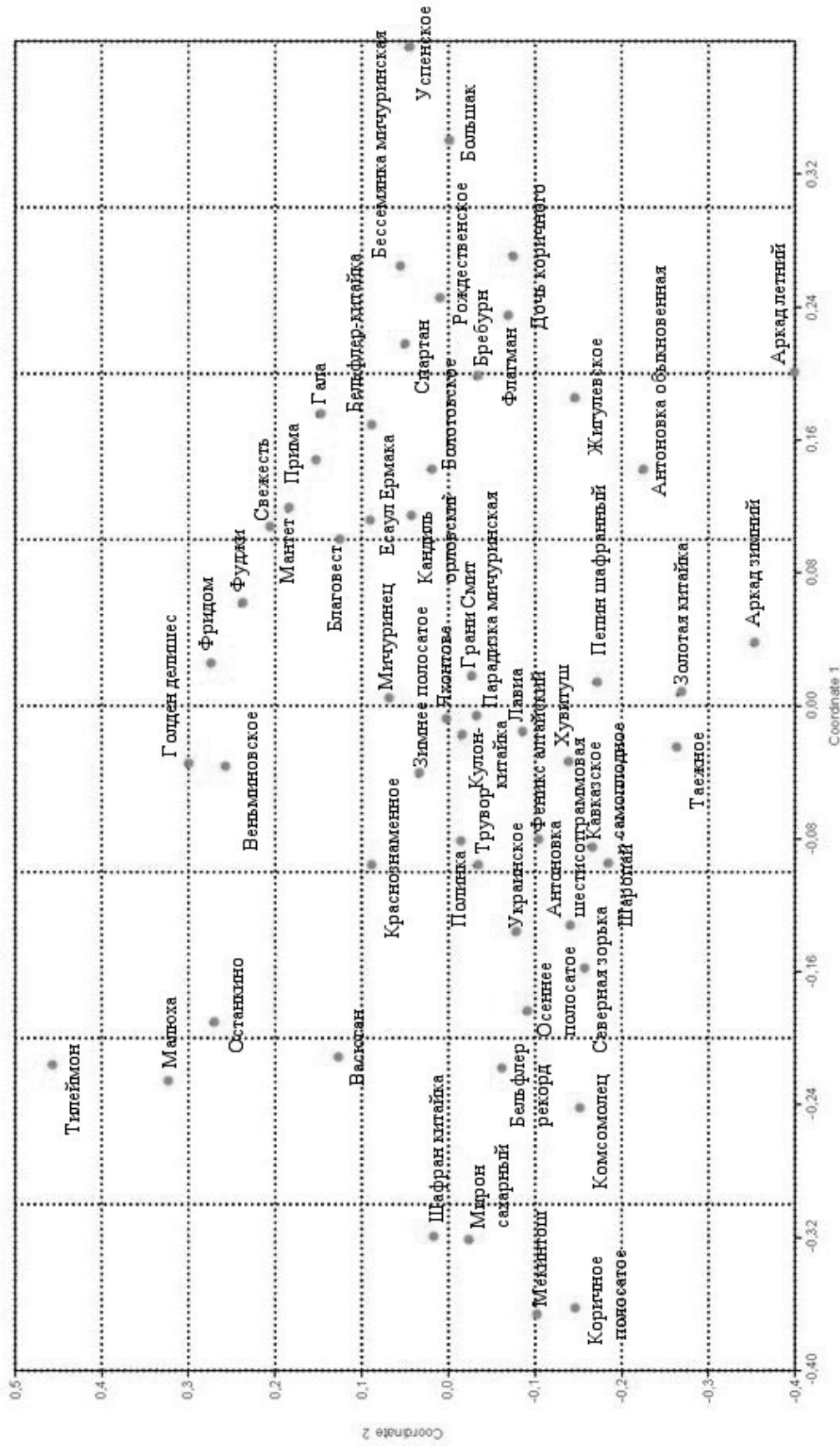


Рис. Разделение сортов и видов яблони по кластерам по данным анализа 15 микросателлитных локусов

На пятнадцати полученных электрофореграммах всего было выявлено 217 фрагментов размером от 76 до 250 п.н. Все амплифицированные фрагменты оказались полиморфными и выявляли различия между образцами. Число фрагментов, амплифицируемых одним праймером, варьировало от 10 (CH02c02b) до 20 (CH03d07) и в среднем в пересчете на праймер составило 14,5, что свидетельствует о высоком уровне полиморфизма рассматриваемых локусов микросателлитных последовательностей генома яблони. Такие высокие показания коэффициента полиморфности создают потенциал для использования простых повторяющихся последовательностей в качестве молекулярных маркеров для идентификации сортов.

На основании анализа электрофореграмм были рассчитаны генетические расстояния между образцами попарно. При этом проводится вычисление коэффициента сходства Дайсона между парами образцов. Было установлено, что у исследованных образцов значения коэффициентов генетических различий варьируют в пределах от 0 (между сортами Гала и Полинка) и 0,7 (между сортами Аркад летний и Аркад зимний).

С помощью SSR-анализа было получено достаточное количество полиморфных фрагментов для проведения статистической обработки. На рисунке изображено расположение сортов и форм яблони в главных координатах. Как видно из графика рассеяния, у исследуемых образцов полностью отсутствует какая-либо групповая дифференциация.

Анализ литературных данных показал, что формирование кластеров при оценке генетического разнообразия у сортов и видов яблони затруднено. Например, Урбанович и соавторами был проведен анализ 20 микросателлитных локусов у 40 образцов яблони, принадлежащих разным сортам и видам. При этом значения бутстрепа в некоторых кластерах были незначительными и снижались от 2 до 5 [3].

Значительное расхождение в распределении видов яблони, относительно их классификации, также отмечено в работах Хокансона [4]. Возможно, что это связано с большим объемом селекционной работы, которая ведется длительный период и в которую вовлечена значительная часть сортов и видов яблони. При этом высокий уровень полиморфизма, вероятно, связан и с наличием уникальных аллелей в анализируемых микросателлитных локусах генома, что вызывает затруднения при кластеризации.

Выводы. Проведенные исследования сортов яблони селекции различных стран по анализу 15 микросателлитных локусов показали высокое значение коэффициента полиморфизма. Статистический анализ не выявил кластеризации исследуемых образцов, что вероятно связано с продолжительной работой по созданию сортов, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам, в которую было включено значительное количество доноров хозяйственно-ценных признаков.

Литература

1. Edwards K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis / K. Edwards, C. Jonstone, C. Thompson // Nucl. Acids Res. – 1991. – V.19. – N6. – P. 1349.
2. Liebhard R. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) / R. Liebhard, L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg and C. Gessler // Molecular Breeding. – 2002. – V.10. – P. 217–241.
3. Урбанович О.Ю. Анализ полиморфизма SSR-локусов видов *Malus* / О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, А.А. Хацкевич, Н.А. Картель // Известия национальной академии наук Беларуси. – 2010. – №1. – С. 12–16.
4. Hokanson S.C. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. Core subset collection / S.C. Hokanson, W.F. Lamboy, A.K. Szewc-McFadden, J.R. McFerson // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V.97. – P.671–683.