

УДК 634.222

АНАЛИЗ SSR-ПОЛИМОРФИЗМА СЕВЕРО-КАВКАЗСКИХ СОРТОВ СЛИВЫ ДОМАШНЕЙ

Степанов И.В., Супрун И.И., канд. биол. наук.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»
(Краснодар)

Лободина Е.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»,
ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»
(Краснодар)

Реферат. Целью настоящей работы являлась оценка генетического разнообразия и филогенетического родства отечественных сортов сливы домашней по микросателлитным маркерам с последующим сопоставлением результатов с данными по зарубежным сортам. В статье изложены результаты, полученные в ходе SSR-анализа шести Северо-Кавказских сортов сливы домашней и четырех сортов зарубежной селекции. Восемь из десяти микросателлитов продемонстрировали свою эффективность в качестве инструментов для молекулярно-биологической оценки генофонда сливы домашней.

Ключевые слова: SSR-маркеры, слива домашняя, ДНК-анализ

Summary. This study directed on assessment of the genetic diversity and phylogenetic relationship of North Caucasian varieties of plums with using microsatellite markers, the results is comparing with data on foreign varieties. The article presents the results obtained during the SSR-analysis of six North Caucasian plum varieties and four varieties of foreign breeding. Eight forms from ten microsatellites have demonstrated their effectiveness as the tools for molecular biological assessment of domestic plums gene found.

Key words: SSR-markers, domestic plum, DNA-analysis

Введение. Род *Prunus* состоит из приблизительно 400 видов деревьев и кустарников [1]. Многие виды рода возделываются как плодовые (косточковые) и декоративные культуры. Среди косточковых культур широкое распространение в зоне умеренного климата получили настоящие сливы, терносливы, ренклоды и мирабели, объединенные в один вид слива домашняя. Таксономически, слива домашняя (*Prunus domestica* L.) относится к подроду *Prunophora*, рода *Prunus*, семейства *Rosaceae*. Данный вид сливы является гексоплоидом ($2n=6x=48$), предположительно возникшим как результат межвидового скрещивания терна (*P. spinosa*) и алычи (*P. cerasifera*) [2].

Результаты цитогенетических исследований способствовали расширению представлений о процессе видообразования сливы домашней. Накопление новых сведений о видах слив привело к возникновению ряда альтернативных гипотез происхождения этого вида. В частности возникло предположение о наличии у сливы домашней трех геномов, принадлежащих диплоидным и полиплоидным формам алычи. Таким образом, выдвинутая гипотеза утверждает, что единственным предком сливы домашней является алыча [3, 4, 5].

D. Zohary обосновывает свое предположение об аутоплоидном происхождении сливы домашней от алычи отсутствием у мирабели, ренклодов и тернослив признаков терна. Данное утверждение является весьма спорным аргументом, особенно в отношении тернослива.

Выявление общего предка для всех представителей *P. domestica* осложняется отсутствием диких форм, предшествующих культурной сливе домашней. В связи с чем, единственным возможным вариантом решения данной проблемы являются попытки искусственного моделирования гипотетического скрещивания видов, повлекшего за собой процесс образования сливы домашней.

В.А. Рыбин впервые провел экспериментальное скрещивание между алычей и терном, которое в одном из случаев дало в потомстве полиплоидную сливу, напоминающую тернослив. Так гибриды, полученные при скрещивании алычи и терна, проводимого Endlich и Murawski (1962), обладали признаками свойственными сливе домашней. Этот факт служит подтверждением основной гипотезы о гибридном происхождении культуры.

Более частным вопросом, возникшим в процессе исследования, является выяснение видовой принадлежности тернослива. На данный момент общепринято рассматривать *Prunus L. insititia* как подвид *P. domestica* [6, 7, 8]. Однако существует мнение, что тернослива таксономически следует повысить до ранга вида [9]. Данный автор ссылается на наличие устойчивых переходных форм между терном и терносливой, подтверждающих их близкое генетическое родство. Причем формы тернослива с преобладанием признаков, характерных для терна, являются более фертильными, нежели формы с признаками, свойственными алыче.

Генетика сливы домашней довольно плохо изучена относительно других видов рода *Prunus*, что частично связано с полиплоидностью культуры. Тем не менее, было проведено несколько исследований, направленных на изучение генетического разнообразия ядерной и цитоплазматической наследственной информации *Prunus domestica* [4; 8; 14, 18]. Первые исследования ядерного генома сливы базировались на применении RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) и RFLP [11] маркеров.

Хорошие результаты были получены с использованием ISSR маркеров в оценке китайской коллекции косточковых культур, включая различные виды слив. Однако эффективные маркеры, особенно при работе с полиплоидными формами, должны быть высокополиморфными, обладать большим количеством аллельных вариаций, позволяющих различать генетически близкие генотипы. Результаты, полученные с применением маркеров, должны быть легко и однозначно интерпретируемы. Подобными характеристиками обладают маркеры на основе коротких tandemных повторов SSR или микросателлитов.

SSR маркеры были получены для многих важнейших косточковых культур, некоторые из них уже использованы в построении карт сцепления *Prunus*, и часть находятся в стадии разработки [14, 15, 16]. Микросателлиты, выделенные из ядерного и хлоропластного генома абрикоса, были использованы для изучения происхождения и генетического разнообразия европейских сортов сливы домашней [17]. Подобные исследования на трех видах сливы (*P. domestica*, *P. cerasifera* и *P. spinosa*) были проведены с помощью SSR в сочетании с хлоропластными ДНК-маркерами [18].

Разработанные на ряде косточковых культур микросателлиты послужили надежной маркерной системой в филогенетической оценке генотипов в рамках подвида *P. domestica* *asubsp. italic* [19]. Работы, основанные на применении микросателлитных (SSR) маркеров, продемонстрировали их высокую эффективность в качестве инструментов для молекулярно-генетической характеристики сортов различных плодовых культур. Тем не менее, исследований, направленных на изучение генофонда сливы домашней с помощью SSR локусов, в настоящее время относительно мало. Накоплению сведений о генетическом разнообразии и родстве сортов сливы домашней мировой селекции способствуют локальные исследования местных сортов и сортоформ.

Целью настоящей работы является оценка генетического разнообразия и филогенетического родства отечественных сортов сливы домашней по микросателлитным маркерам с последующим сопоставлением результатов с данными по зарубежным сортам.

Объекты и методы исследований. Для исследования были отобраны молодые листья 10 сортов сливы домашней из коллекции Крымской опытно-селекционной станции: Баллада, Дебют, Синяя птица, Кабардинская ранняя, Венгерка кавказская, Большой приз, Исполинская, Анна шпет, Ренклод зеленый, Президент. Из 10 сортов 6 были созданы на Северном Кавказе [20], 4 - стародавние сорта, выведенные в Европе и Северной Америке (табл. 1).

Таблица 1 - Происхождение анализируемых в работе сортов сливы домашней

Сорт	Происхождение/Родительские пары
Баллада	Крымская опытно-селекционная станция, Россия/ Венгерка кавказская x Кабардинская ранняя
Дебют	Крымская опытно-селекционная станция, Россия/ Кабардинская ранняя x гибрид П- 21-32
Синяя птица	Крымская опытно-селекционная станция, Россия/ Венгерка кавказская x Кабардинская ранняя
Кабардинская ранняя	Институт горного и предгорного садоводства, Россия/ Свободное опыление x Анна Шпет
Большой приз	Крымская опытно-селекционная станция, Россия/ Соперница x Кабардинская ранняя
Венгерка кавказская	Крымская опытно-селекционная станция, Россия/ Сочинская юбилейная x Ренклод Альтана
Исполинская	США/Венгерка ажанская x сеянец Понда
Анна Шпет	Сорт выведен в Германии Л. Шпетом
Президент	Сорт выведен в Великобритании
Ренклод зеленый	Стародавний европейский сорт

ПЦР проводили с выполнением предварительной оптимизации ряда параметров, таких как температура отжига праймеров, длительность циклов отжига праймеров и элонгации, общее количество циклов, концентрация дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, праймеров.

ПЦР SSR маркеров: Для SSR были отобраны наиболее полиморфные маркеры, разработанные на персике: ВРССТ002, ВРРСТ017, ВРРСТ025, UDP98-407, UDP98-409, UDP98-410, UDP98-022, UDP96-018, СРРСТ022 и на черешне: Ps12a02a, EMPaS06.

Информация о применении маркера Ps12a02a в генетическом картировании видов *Prunus* отсутствует. Для обнаружения продуктов амплификации на отобранных маркерах использовались флуоресцентные метки.

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 минуты при 94°C – начальная денатурация, следующие 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 GeneMapper 4.1.

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства.

Обсуждение результатов. Из десяти апробированных маркеров 8 дали полиморфные продукты по всем исследованным сортам сливы – ВРССТ002, ВРРСТ025, UDP98-407, UDP98-409, UDP98-410, UDP98-022, СРРСТ022, Ps12a02a, ЕМРaS06 (табл. 2).

Таблица 2 - Мультиплексы SSR для анализа сортов сливы домашней

№ мультиплекса	Маркер	Количество аллелей	Диапазон размеров аллелей (п.н.)
1	UDP98-407	7	169-201
	ВРССТ002	13	172-224
	UDP98-410	13	122-156
	UDP98-409	8	127-152
2	ЕМРaS06	15	204-257
	UDP98-022	7	101-139
	ВРРСТ025	14	134-198
	Ps12a02a	13	157-197

Два маркера, разработанных на персике, показали отсутствие продуктов у всех анализируемых сортов (в случае UDP96-018) и у большей части образцов (в случае ВРРСТ017), в дальнейшей работе они не будут использоваться при составлении мультиплексных реакций. Остальные отобранные маркеры продемонстрировали высокий уровень полиморфизма для выборки из 10 сортов сливы домашней. Так, количество выявленных аллелей варьировало в значениях от 7 до 15 аллелей на локус. Наиболее высокополиморфными маркерами оказались два локуса, впервые выявленные у персика ВРРСТ025 (13 аллелей), UDP98-410 (14 аллелей) и два локуса, впервые обнаруженные у черешни Ps12a02a (13 аллелей) и ЕМРaS06 (15 аллелей). SSR локусы UDP98-407 и UDP98-022 обладали наименьшим в наборе маркеров полиморфизмом (7 аллелей). В среднем у отобранных для работы микросателлитных маркеров было обнаружено 11,25 аллелей на локус.

Диапазон различий аллелей по размеру продуктов варьировался от 25 пар нуклеотидов у маркера UDP98-409 до 64 пар нуклеотидов (п.н.) у маркера ВРРСТ025. Значительная вариабельность в размерах у маркера ВРРСТ025 особенно ощутима при её сопоставлении с общим размером данного локуса, так разница между наиболее контрастными аллелями составляет 40% от размеров всего микросателлита. Таким образом, по всем использованным в работе маркерам было получено 90 аллелей, из которых лишь одна была мономорфной (аллель размером 101 п.н. у маркера UDP98-022), то есть присутствовала у всех изученных сортов сливы домашней.

Число полиморфных аллелей равно 89 является приемлемым для оценки выборки из 10 генотипов. Каждый из пяти наиболее полиморфных маркеров (ВРССТ002, UDP98-410, ЕМРaS06, ВРРСТ025 и Ps12a02a) позволяет идентифицировать все 10 сортов в рамках данной выборки. В свою очередь, остальные три маркера демонстрируют различное количество генотипов с идентичными аллельными наборами.

По локусу UDP98-022 идентичным аллельным набором обладают сорта Кабардинская ранняя, Президент, Дебют, Большой приз, Ренклод зеленый. По маркеру UDP98-407 не выявлено различий между сортами Кабардинская ранняя, Дебют, Большой приз. Применение маркера UDP98-409 не дает возможности отличить сорт Венгерку кавказскую от сорта Анна Шпет и сорт Президент от сорта Исполинская. Исходя из полученных сведений о полиморфизме микросателлитных локусов, два апробированных мультиплексных набора обладают высоким потенциалом для идентификации отдельных генотипов сливы домашней на значительно более широкой выборке сортов.

В ходе подсчета аллелей у каждого проанализированного сорта было установлено, что наибольшим количеством уникальных аллелей в выборке по всем маркерам обладает

американский сорт Исполинская. У данного сорта было выявлено 9 аллелей, не встречающихся у остальных девяти изученных сортов. У сортов Синяя Птица и Большой Приз, аллелей отсутствующих у других исследованных генотипов, не обнаружено. В остальных случаях количество уникальных аллелей варьируется от 2 до 4 в зависимости от сорта. Генетическая удаленность генотипа сорта сливы Исполинская относительно остальных сортов выборки подтверждается также методом K-means кластеризации (метод k-средних). K-means кластеризация была проведена на программе Past при значении $k=2$. В ходе распределения сортов по двум кластерам все сорта за исключением Исполинской были отнесены в один кластер.

Данную генетическую обособленность сорта Исполинская можно объяснить отсутствием общих сортов в родословной с остальными генотипами, приведенными в работе. В родителях у Исполинской присутствуют два западноевропейских сорта: французский стародавний сорт сливы Венгерка ажанская и сеянец Понди британского происхождения.

На основании полученных в процессе генотипирования данных по полиморфизму SSR локусов, была проведена кластеризация десяти сортов сливы домашней. Кластеризация проводилась с помощью программы Past. При формировании матрицы генетических расстояний, и последующего построения дендрограммы на её основе, применялся коэффициент Dice. Результаты кластеризации отражены на дендрограмме (рис.).

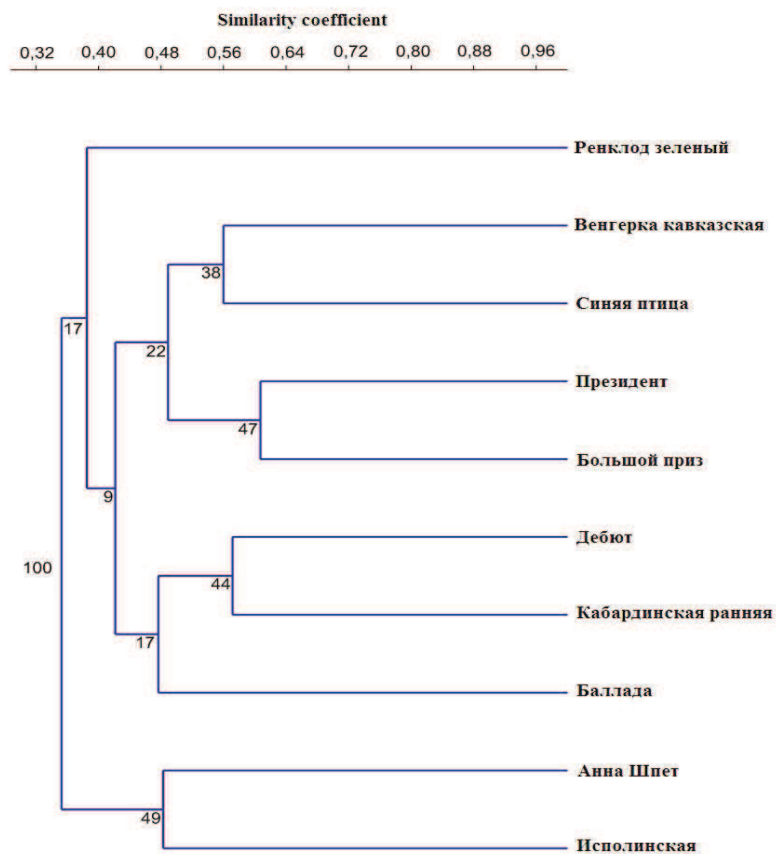


Рис. Дендрограмма сортов сливы домашней на основе данных SSR анализа

Были обозначены основные кластеры. Наиболее отдаленный кластер включает сорта зарубежной селекции – Исполинская и Анна Шпет. В основном кластере отдельно стоит другой европейский сорт – Ренклюд зеленый. В одну большую группу включены все отечественные сорта, представленные в выборке, и один английский сорт сливы Президент,

ближайшим генотипом к которому является сорт Большой приз. Группа отечественных сортов сливы разделяется на два кластера с низким значением бутстрепа (bootstrap) – равным 9 при общем значении 100.

В первый кластер входят сорта Венгерка кавказская, Синяя птица, Президент и Большой приз. Венгерка кавказская является родительской формой для сорта Синяя птица [21], что подтверждается их расположением на дендрограмме. Во второй кластер входят сорта Дебют, Кабардинская ранняя и Баллада. Генетическую близость образцов, входящих во второй кластер, можно объяснить тем, что одним из родителей сортов Дебют и Баллада выступает Кабардинская ранняя [22].

Несмотря на то, что результаты кластеризации частично отражают родословные сортов, возникает ряд вопросов, вызванных наличием спорных моментов в интерпретации полученных данных. В частности два сорта – Синяя птица и Баллада, имеющие общие родительские формы, представленные сортами Кабардинская ранняя и Венгерка Кавказская, были определены в отдельные кластеры. Также труднообъясним факт распределения сортов Венгерка кавказская и Большой приз в два ближайших кластера. При анализе их родословных был обнаружен единственный общий предок в третьем поколении – Венгерка итальянская [23].

Определенную сложность в интерпретации результатов распределения генотипов внутри группы отечественных сортов можно объяснить наличием общих сортов в родословной и близостью генофонда. Подтверждением данного предположения являются низкие значения бутстрепа, свидетельствующие о присутствии значительного количества общих аллелей в выборке отечественных сортов.

Следует отметить, что из всех зарубежных сортов, представленных в работе, наиболее близким к отечественному генофонду оказался английский сорт Президент. Данный факт примечателен тем, что в работе были использованы сорта Ренклад зеленый и Анна Шпет, оказавшие влияние на формирование генофонда анализируемых Северо-Кавказских сортов. Однако, в отличие от сорта Президент, сорта Анна Шпет и Ренклад зеленый определены в аутгруппы по отношению к исследуемым отечественным сортам.

Выводы. Используемые в работе микросателлитные локусы, собранные в две мультиплексные смеси, выявили высокие значения генетического полиморфизма как у отечественных, так и у зарубежных сортов сливы домашней.

В свою очередь результаты, полученные при филогенетической оценке данных, подтверждают близкое родство всех изученных отечественных генотипов. Большое разнообразие аллелей у отечественных сортов сочеталось с их общностью.

Таким образом, если интерпретировать генетический полиморфизм использованных в работе нейтральных SSR маркеров на весь геном исследуемых образцов, то можно предположить, что анализируемые в работе сорта Северо-Кавказской селекции обладают селекционным потенциалом, обусловленным генетическим разнообразием.

Однако, несмотря на высокий селекционный потенциал отечественных сортов, пополнение местного генофонда новыми генетически отдаленными формами остается важной актуальной задачей селекции.

В исследованной выборке наиболее генетически отдаленным зарубежным сортом выступает слива Исполинская, обладающая крупными плодами высокого качества, однако уступающая по адаптивности к условиям Кубани Северо-Кавказским сортам.

Восемь из десяти микросателлитов продемонстрировали свою эффективность в качестве инструментов для молекулярно-биологической оценки генофонда сливы домашней. Они могут быть использованы в последующих работах как в предложенных мультиплексных смесях, так и в заново составленных.

Литература

1. Black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.). / C.K. Maynard, K. Havanagh, H. Fuernkranz, A. Draw // *Biotechnol. Agr. For.* 1991, - №16 - P.3-22
2. Crane M.B., Lawrence W.J.C. Studies in sterility Crane M.B., Lawrence W.J.C. *Intern. Hort. Congress.* 1930, - №9 - P.100-116
3. Salesses G. Some data on the cytogenetics of plums and the origin of plums / G. Salesses // *Acta Horticulturae*, 1975 - №48 - P.59-65
4. Bajashvili E.I. Studies of some species of *Prunus* Mill. genus. / E.I. Bajashvili // *Acta Horticulturae*. 1990, - №283 – P.31-34.
5. Zohary D. Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* Ehrh x *P. spinosa* L. allopolyploid / D. Zohary // *Euphytica*, 1992. - №60 - P.75-77
6. Bailey L.H. The standard encyclopedia of horticulture / L.H. Bailey // *Macmillan*, New York. 1925
7. Browicz K. Flora of Turkey and the East Aegean islands / K. Browicz // *Edinburgh University Press*, Edinburgh. 1972, - №4 - P.8-12
8. Pignatti S. Flora d'Italia / S. Pignatti // *Edagricole*, Bologna, 1982 - vol 1
9. Woldring H. On the origin of plums: a study of sloe, damson, cherry plum, domestic plums and their intermediates / H. Woldring // *Palaeohistoria* 2000, - №39/40 - P.535-562
10. 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
11. 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.
12. 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
13. 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
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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
18. 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
19. 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
20. Заремук, Р.Ш. Результаты селекции сливы домашней на Юге России / Р.Ш. Заремук, С.В. Богатырева // *Плодоводство и виноградарство Юга России* [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2015. – №31(01). – С. 32-40. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/04.pdf>
21. Еремин Г.В. Совершенствование сортимента сливы на юге России / Г.В. Еремин // *Субтропическое и декоративное садоводство*. 2009. – Т.42 – № 2. – С.180-186.
22. Еремин Г.В. Новые сорта сливы домашней для интенсивных технологий возделывания / Г.В. Еремин // *Научные Труды ГНУ СКЗНИИСИВ*. 2013. – Т.1 – С.101-104
23. Еремин Г.В. Генеалогический анализ исходного материала для его использования в селекции сливы на юге России // *Современное садоводство*. – 2014. – №2. – С.25-33