

ПРОФІЛЮВАННЯ ГЕНОМУ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ IRAP-ПЛР ТА REMAP-ПЛР МАРКЕРІВ

Я. І. ІВАНОВИЧ, Н. В. ТРЯПЦІНА

*Інститут садівництва НААН, відділ вірусології, оздоровлення і розмноження плодових та ягідних культур, Київ-27, 03027, с. Новосілки, вул. Садова, 23, Україна;
e-mail: ivanovych.yar@gmail.com*

Використання однорідного садивного матеріалу з підтвердженою генетичною ідентичністю – одна з головних вимог при створенні садів інтенсивного типу. Ефективність методу ідентифікації та аналізу генетичних відмінностей між різними сортами плодових культур за допомогою традиційних фенотипових ознак є недостатньою, оскільки значним чином залежить від впливу факторів зовнішнього середовища. Профілювання геномів з використанням молекулярно-генетичних маркерів є найбільш точним та надійним способом вивчення генетичного різноманіття еукаріотичних геномів. Використання ретротранспозонних генетичних маркерів є потужним засобом для генетичного профілювання еукаріотичних геномів, оскільки вони є найбільш численною групою мобільних елементів в геномі рослин та відіграють важливу роль в його реорганізації у відповідь на дію природного та штучного добору. Проблема пошуку найбільш інформативних маркерних систем для генетичного профілювання геномів сортів черешні є особливо актуальною з огляду на досить низький рівень генетичного поліморфізму у цієї культури. Це є відображенням обмеженої генетичної мінливості геноплазми сортів черешні внаслідок системи гаметофітної самонесумісності. В роботі досліджено 13 сортів черешні української селекції та два сорти закордонної селекції в якості контролю. Загальну геномну ДНК виділяли ЦТАБ-методом з деякими модифікаціями. ПЛР проводили методами IRAP та REMAP. Продукти ампліфікації розділяли в поліакриламідному гелі. Дискримінаційні можливості використаних маркерних систем оцінювали за допомогою різних показників поліморфізму для порівняння їх інформативності. Проведена робота дозволила оцінити дискримінаційні можливості та технічні особливості застосування декількох систем генетичного профілювання геномів сортів черешні української селекції з використанням IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів та виявити серед них найбільш перспективні для рутинного аналізування. Використання п'яти праймерів (IRAP-ПЛР) та двох комбінацій праймерів (REMAP-ПЛР) дозволило в сумі отримати 63 маркери, з яких 23.8 % виявилось поліморфними. Було показано, що для генетичного профілювання сортів черешні перспективним є застосування комбінації праймерів TRIM K002 +8565 й окремих праймерів TRIM K002, iPBS 2272 та iPBS 2077.

Ключові слова: IRAP-ПЛР маркери, REMAP-ПЛР маркери, генетичний поліморфізм, генетичне профілювання, сорти черешні.

Вступ. Черешня (*Prunus avium* L.) – зазвичай диплоїдна ($2n = 2x = 16$; $3x = 24$; $4x = 32$) плодова порода, походження якої пов'язують з Близько-Східним центром та Кавказьким регіоном (Ganopoulos, 2011). Черешня як плодова культура культивується у помірному кліматичному поясі та високо ціниться через плоди. В Україні за даними FAOSTAT в 2012 р. черешня вирощувалась на площі в 12500 га, а продукція цієї культури склала 72600 т (FAOSTAT). Створення сучасних інтенсивних насаджень черешні потребує використання однорідного садивного матеріалу сортів з підтвердженою генетичною ідентичністю. Існує необхідність захисту прав селекціонерів. Сорти черешні української селекції створювалися передусім з огляду на високий рівень адаптивності до умов вирощування в різних зонах плідництва в Україні. До цих пір їх генетичне різноманіття та селекційний потенціал практично не вивчалися на молекулярно-

генетичному рівні, що певним чином обмежує права вітчизняних селекціонерів та можливості маркерно-опосередкованої селекції нових сортів черешні.

Для ідентифікації та аналізу генетичних відмінностей між різними сортами черешні традиційно використовують фенотипові ознаки, на які значним чином впливають фактори навколишнього середовища. Такий вплив може підвищувати мінливість агрономічно-цінних ознак, що погіршує надійність методу (Ganopoulos, 2011).

Профілювання геномів з використанням молекулярно-генетичних маркерів є найбільш точним та надійним способом вивчення генетичного різноманіття еукаріотичних геномів. Сьогодні для генетичної паспортизації сортів плодових та ягідних культур в тому числі і черешні застосовується широкий спектр маркерів, зокрема: RAPD-, AFLP-, SSR-, ISSR-, SNP-маркери та ін. Вибір маркерної системи

залежить від конкретного завдання. Зокрема для генетичного профілювання геномів сортів черешні проблема пошуку найбільш інформативних маркерних систем є завжди актуальною, оскільки відомо, що рівень міжсортового поліморфізму більшості типів генетичних маркерів у цієї культури є досить низьким, що є відображенням обмеженої генетичної мінливості геноплазми сортів черешні (Kappel, 2012) та наслідком системи гаметофітної самонесумісності (Iezzoni, 2008).

Завданням даної роботи була перевірка придатності декількох типів IRAP- (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) та REMAP (REtrotransposon-Microsatelite Amplified Polymorphism) - маркерів для генетичного профілювання сортів черешні вітчизняної селекції, створених на Артемівській дослідній станції розсадництва та на Дослідній станції зрошуваного садівництва в м. Мелітополь.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал сортів черешні відбирався в насадженнях Мелітопольської ДСС ім. М.Ф. Сидоренка, Артемівської ДСР та Інституту садівництва НААН (табл. 1). Використано 13 сортів української селекції та два сорти закордонної селекції в якості контролю.

Загальну геномну ДНК виділяли ЦТАБ-методом (Doyle, 1987) з деякими модифікаціями. Концентрацію препаратів ДНК визначали електрофоретично.

Реакцію ампліфікації з використанням IRAP-праймерів проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 50 нг геномної ДНК, 0.8 мкМ праймера, 0.1-0.3 мМ кожного дНТФ, 2-2.25 мМ MgCl₂, 1.5 мкл 10× Taq ДНК полімеразного буферу та 0.5 ОА Taq ДНК полімерази (СибЭнзим, Росія).

Таблиця 1.

Перелік проаналізованих сортів черешні

Table 1.

List of analyzed sweet cherry cultivars

Сорт	Оригігатор	Місце збору
Анонс	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Крупноплідна	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Валерій Чкалов	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Сказка	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Талісман	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Мелітопольська чорна	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Мелітопольська мирна	Мелітопольська ДСС	ІС НААН
Темпоріон	Мелітопольська ДСС	ІС НААН
Прошальна	Артемівська ДСР	Артемівська ДСР
Василіса прекрасна	Артемівська ДСР	Артемівська ДСР
Отрада	Артемівська ДСР	Артемівська ДСР
Донецька красавиця	Артемівська ДСР	ІС НААН
Аннушка	Артемівська ДСР	ІС НААН
Регіна	Німеччина	ІС НААН
Бігарро Хатіф Бурлат	Франція	Мелітопольська ДСС

ПЛР проводили на ампліфікаторі Терцик за наступною схемою: первинна денатурація – 5 хв., 32-36 циклів, що включали 30 с при 94°C для денатурації, 60 с при 40-60°C (залежно від праймера) для анелювання, 2 хв. 30 с при 72°C для елонгації; кінцева елонгація 5 хв. при 72°C.

В роботі використано два праймери до довгих кінцевих повторів мініатюрних ретротранспозонів TRIM (Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature) (Antonius-Klemola, 2006) та три праймери до сайту зв'язування зворотньої транскриптази - iPBS (Primer Binding Site) LTR-вмісних ретротранспозонів (Kalendar, 2010). Для REMAP-ПЛР використано ISSR-праймер 8565 з якірними 5' послідовностями (Antonius-Klemola, 2006) (табл.2).

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР здійснювали в 2% агарозному та 10% поліакриламідному гелі. Забарвлення обох типів гелів проводили з використанням бромистого етидію. В якості маркера молекулярних мас використовували 100 п.н. або 1 т.п.н. (Thermo Scientific) ДНК-маркер.

Таблиця 2

Використані комбінації праймерів

Table 2

Combinations of primers used

Назва	T _a , °C	Послідовність (5' – 3')
TRIM K002	59.4	AGCTCCCAAAAGGCCTCGTGC
TRIM K008	59.1	GCGGACAATATCGTGCTACGGTG
TRIM K002 +8565	59.4	8565:
TRIM K008 +8565	59.1	GTCACCACCACCACCACCACCAC
iPBS 2272	40	GGCTCAGATGCCA
iPBS 2077	34.7	CTCACGATGCCA
iPBS 2237	56	CCCCTACCTGGCGTGCCA

Електрофореграми продуктів ампліфікації аналізувалися за допомогою програми TotalLab. Кожна реакція проводилася у трьохкратному повторенні для перевірки відтворюваності ампліфікаційних фрагментів. При створенні бінарних матриць відтворювані фрагменти в спектрах ампліфікації оцінювалися як наявні (1) чи відсутні (0). В аналіз було включено лише ті спектри, в яких було виявлено поліморфні маркери.

Для порівняння інформативності використаних маркерних систем їх дискримінаційні можливості оцінювали з використанням декількох показників поліморфізму: відсоток поліморфних локусів P (%), кількість відмінних алелів (N_a), кількість ефективних алелів (N_e), індекс інформативності Шеннона (I), очікувана гетерозиготність (H_e) та гетерозиготність, що спостерігається (H_o).

Обрахунки первинних бінарних даних проводили в програмі GenAlEx 6.501 для домінантних маркерів.

Результати та їх обговорення. Використання п'яти праймерів (IRAP-ПЛР) та двох комбінацій праймерів (REMAP-ПЛР) дозволило в сумі отримати 63 маркери, з яких 23.8 % виявилося поліморфними (табл. 3). В більшості ампліфікаційних спектрів переважали амплікони середньої довжини – від 400 до 1000 п.н. Лише в ампліфікаційних спектрах, отриманих при застосуванні праймерів TRIM K002 та TRIM K008+8565, були виявлені високомолекулярні ампліфікаційні фрагменти з розмірами вище за 2000 п.н.

IRAP-ПЛР та REMAP-ПЛР маркери є анонімними ділянками геному, що фланковані повторюваними послідовностями, зокрема в нашій роботі IRAP-ПЛР маркери - це геномні ділянки, що знаходяться між інвертованими специфічними сайтами ампліфікації на довгих кінцевих повторях двох мініатюрних ретротранспозонів (праймери TRIM K002 та

TRIM K008) та між двома інвертованими сайтами зв'язування зворотньої транскриптази у прикорових ділянках також двох мініатюрних ретротранспозонів (праймери iPBS 2272, iPBS 2077 та iPBS 22037). Потенційно використання другої групи праймерів може бути більш універсальним способом генетичного маркування рослинних геномів завдяки високій консервативності цих ділянок у всіх типах ретротранспозонів, оскільки відомо, що ретротранспозони завдяки їх інсерційній активності відіграють важливу роль в структурній еволюції геному багатьох видів рослин (Kalendar, 2010). Для отримання REMAP-ПЛР маркерів були використані комбінування праймерів TRIM K002 +8565 та TRIM K008 +8565 (рис. 1, Б, В). Відповідно отримані у такий спосіб молекулярно-генетичні маркери – це ділянки анонімної ДНК фланковані з одного боку транспозонними послідовностями, а з іншого – мікросателітними, а також ділянки між двома інвертованими транспозонними або двома інвертованими мікросателітними повторами.

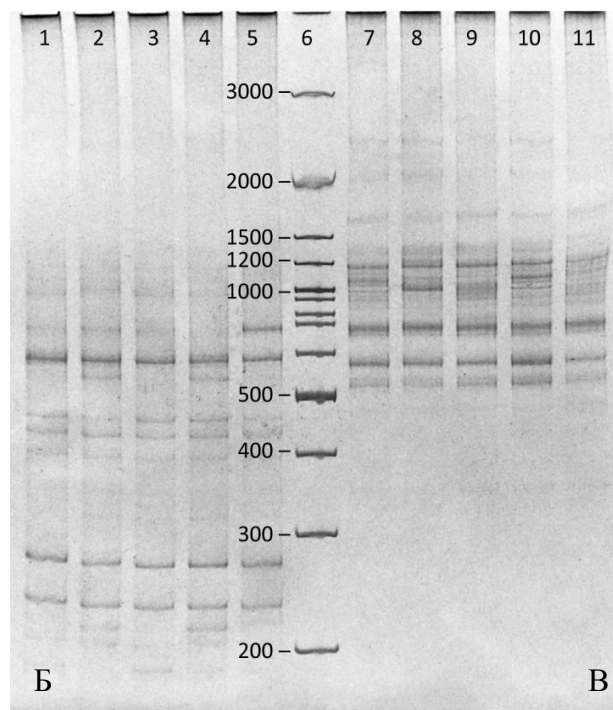
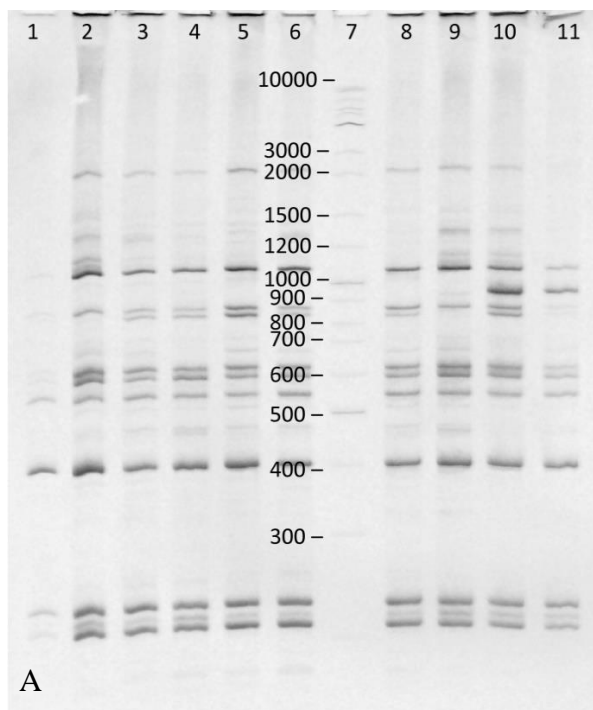


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікації.
Примітка: А – праймери TRIM K002 та геномної ДНК сортів черешні: 1 – Валерій Чкалов, 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Крупноплідна, 4 – Темпоріон, 5 – Сказка, 6 – Анонс, 7 – маркер молекулярних мас 1 т.п.н. (Thermo Scientific), 8 – Талісман, 9 – Донецька красавиця, 10 – Регіна, 11 – Прощальна; Б – пари праймерів TRIM K002+8565, В – TRIM K008+8565 та геномної ДНК: 1, 7 – Валерій Чкалов, 2, 8 – Мелітопольська чорна, 3, 9 – Анонс, 4, 10 – Талісман, 5, 11 – Чудо-вишня (дюк), 6 – маркер молекулярних мас 100 п.н. (Thermo Scientific).

Pic. 1. Electrophoregrams of PCR-products.
Note: A – primer TRIM K002 and genomic DNA of sweet cherry cultivars: 1 – Valeriy Chkalov, 2 – Melitopol's'ka chorna, 3 – Krupnoplidna, 4 – Temporian, 5 – Skazka, 6 – Anons, 7 – molecular weight marker 1 kbp (Thermo Scientific), 8 – Talisman, 9 – Donetsk'ka krasavytsia, 10 – Regina, 11 – Proshal'na; B – primers TRIM K002+8565 and C – TRIM K008+8565 and genomic DNA: 1, 7 – Valeriy Chkalov, 2, 8 – Melitopol's'ka chorna, 3, 9 – Anons, 4, 10 – Talisman, 5, 11 – Chudo-vyshnia (duke), 6 – molecular weight marker 100 bp (Thermo Scientific).

Таблиця 3.

Дискримінаційні характеристики перевірених маркерних систем для генетичного профілювання 13 сортів черешні української селекції

Table 3.

Discriminative characteristics of tested marker systems for fingerprints of 13 Ukrainian sweet cherry cultivars

Маркерна система	Розмір фрагментів, п.н.	Кількість виявлених локусів	P (%)	N _a	N _e	I	H _e	H _o
TRIM K002	210-2100	12	25.00	1.250	1.136	0.123	0.081	0.084
TRIM K002 +8565	175-990	12	33.33	1.333	1.236	0.202	0.138	0.158
TRIM K008 +8565	535-2460	19	21.05	1.211	1.164	0.132	0.092	0.105
iPBS 2272	545-1300	9	22.22	1.222	1.137	0.114	0.076	0.079
iPBS 2077	635-1420	8	25.00	1.250	1.250	0.173	0.125	0.143

За використання праймера TRIM K008 взагалі не було отримано чітких спектрів при ампліфікації ДНК черешні, хоча відомо, що цей праймер дозволяє виявляти маркери з високими дискримінаційними можливостями при генетичному профілюванні інших представників родини Розові (Rosaceae) (Antonius-Klemola, 2006) в тому числі і сортів яблуни вітчизняної селекції (Кисельов, 2011; Тряпціна, 2012). Використання цих праймерів у комбінації з ISSR праймером 8565 дозволило отримати значно більш інформативні спектри ампліфікації. Хоча ISSR-ПЛР маркери, отримані за допомогою одного праймера 8565 у перевірених сортах виявилися виключно мономорфними. За використання пари праймерів TRIM K008+8565 виявлено найбільшу кількість локусів (19), але дискримінаційні характеристики цієї маркерної системи поступалися характеристикам маркерів, отриманих при застосуванні комбінації праймерів TRIM K002+8565, яка виявилася найбільш вдалою серед проаналізованих. Крім того, переважна більшість (>80%) генетичних маркерів при електрофоретичному розділенні утворювали в спектрі для пари праймерів TRIM K008+8565 досить щільний кластер в границях від 500 до 1000 п.н. (рис. 1, В). Така згрупованість маркерів в спектрах технічно досить ускладнює оцінку кожного окремого амплікону як у автоматичному так і у ручному режимі і при генетичному профілюванні геномів є небажаною.

Праймер iPBS 2237, застосований окремо дозволив виявити лише 3 мономорфні локуси, які не було враховано при створенні бінарних матриць. За використання двох інших праймерів із цієї групи отримано спектри з меншою кількістю ампліфикаційних фрагментів. Тим не менше рівень дискримінаційних можливостей цих маркерних систем виявився співставним з системами маркування за допомогою праймерів TRIM K008+8565 та TRIM K002. В цілому, у порівнянні з вищезгаданими системами

маркування, для ампліфикаційних спектрів праймерів iPBS 2272 та iPBS 2077 більш характерною є структурна рівномірність при електрофоретичному розділенні, що спрощує їх аналіз. Отже, для можливості рутинного генетичного профілювання геномів сортів черешні ці маркерні системи заслуговують на увагу.

Висновки. Проведена робота дозволила оцінити дискримінаційні можливості та технічні особливості аналізу декількох систем генетичного профілювання геномів сортів черешні вітчизняної селекції з використанням IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів та виявити серед них найбільш перспективні для рутинного застосування, зокрема, для генетичного профілювання сортів черешні перспективним є застосування комбінації праймерів TRIM K002 +8565 та окремих праймерів TRIM K002, iPBS 2272 та iPBS 2077.

Список літератури:

1. Кисельов Д.О., Тряпціна Н.В. Використання *Malus* TRIM ретротранспозона для аналізу міжсортного ДНК-поліморфізму яблуни // Зб. н. пр. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – №10. – С.194-197.
2. Тряпціна Н.В., Кисельов Д.О. Оцінка дискримінаційних характеристик різних за походженням IRAP-маркерів для генетичного профілювання геному яблуни // Садівництво. – 2012. – №66. – С. 313-321.
3. Antonius-Klemola K. et al. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports // Theor Appl Genet. – 2006. – Vol. 112. – P. 999-1008.
4. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.
5. FAOSTAT. [Online Database]. <http://faostat3.fao.org/> (10 March 2014)
6. Ganopoulos I.V. et al. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR)

- and morpho-physiological markers // Euphytica. – 2011. – Vol. 181, № 2. – P. 237-251.
7. Iezzoni A.F. Cherries // Temperate Fruit Crop Breeding [Ed. by J.F. Hancock]. – Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media B.V., 2008. – P. 151-175.
8. Kalendar R. et al. iPBS: a universal method for DNA Fingerprinting and retrotransposon isolation // Theor Appl Genet. – 2010. – Vol. 121. – P. 1419-1430.
9. Kappel F. et. al. Cherry // Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding 8 [Ed. M.L. Badenes, D.H. Byrne]. – Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media LLC, 2012. – P. 459-504.

FINGERPRINTING GENOMES OF UKRAINIAN-BREED CULTIVARS OF SWEET CHERRY BY USING IRAP AND REMAP MARKERS

Y. I. Ivanovych, N. V. Triapitsyna

The using of uniform plant material with confirmed cultivar identity is the most critical factor for creating gardens of intensive type. The efficiency of identification method and analysis of genetic diversity between different fruit cultivars with traditional phenotypical traits are insufficient taking into account its high dependence from environmental factors. Genomes fingerprinting with molecular-genetic markers is a most accurate and reliable method of eukaryotic genomes studying. Retrotransposon markers have been demonstrated to be powerful tools for genetic fingerprinting of eukaryotic genomes because they are the most abundant mobile elements in the plant genome and seem to play an important role in genome reorganizations induced by natural and artificial selection. The problem of searching of most informative marker systems for genetic fingerprinting genomes of sweet cherry cultivars is always actual due to rather low level of genetic polymorphism in this culture. This is a reflection of limited genetic variability of sweet cherry germplasm due to system of gametophytic self-incompatibility. In our investigation 13 Ukrainian sweet cherry cultivars and two foreign cultivars as a control were analyzed. Total genomic DNA was extracted by CTAB-method with some modification. PCR was conducted in IRAP- and REMAP- modifications. Amplification products were separated in PAAG. A discriminative possibility of marker systems used was assessed by different indices of polymorphism for comparing their informative content. This study allowed to evaluate discriminative possibilities and technical peculiarities of some systems for molecular-genetic fingerprinting of Ukrainian sweet cherry cultivars using IRAP- and REMAP-PCR markers and to select among them the most perspective ones for routine analysis. Applying of five primers (IRAP-PCR) and two combinations of primers (REMAP-PCR) allowed to obtain 63 markers, among which 23.8 % were polymorphic. It was demonstrated that for genetic fingerprinting of sweet cherry cultivars the application of primers combination TRIM K002 +8565 and single primers TRIM K002, iPBS 2272 and iPBS 2077 are perspective.

Key words: genetic fingerprinting, genetic polymorphism, IRAP-PCR markers, REMAP-PCR markers, sweet cherry cultivars.

Одержано редколегією 17.04.2014