

# Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 577.212.3:57.088.  
2:57.088.3: 634.1  
© 2010

*Д.О. Кисельов,  
К.М. Удовиченко  
Н.В. Тряпціна,*  
кандидат сільсько-  
господарських наук

*Інститут  
садівництва УААН*

*Т.М. Чеченєва,*  
доктор  
біологічних наук

*Національний  
університет біоресурсів  
та природокористування  
України*

## **МІЖСОРТОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЯБЛУНІ З ВИКОРИСТАННЯМ IRAP-МАРКЕРІВ**

*Проаналізовано придатність IRAP-маркерів,  
отриманих з використанням праймерів до  
соевого ретротранспозону SIRE-1, для  
дослідження міжсортowego поліморфізму яблуні.  
За результатами аналізу 8-ми сортів яблуні  
отримано попередні дані про їхні філогенетичні  
зв'язки.*

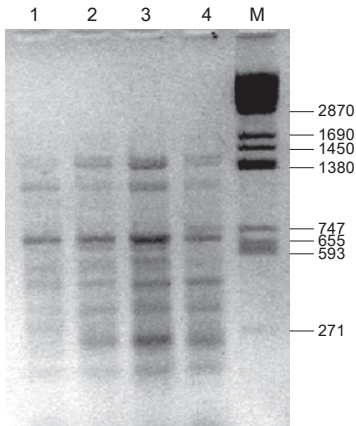
Нині в світі існує більше 8 тис. сортів яблуні. Таке різноманіття ускладнює процес їх диференціації за фенотиповими ознаками, які залежно від клімато-географічних умов і технологічних особливостей утримання насаджень цієї культури можуть широко варіювати в межах норми реакції [3]. Тому помологічна оцінка сортів навіть досвідченими спеціалістами не завжди може бути об'єктивною і має доповнюватися більш чутливими та достовірними методами.

У сучасному садівництві для ідентифікації сортів яблуні та інших плодівих культур дедалі більшого поширення набувають молекулярно-генетичні маркери, отримання яких базується на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Велика кількість модифікацій цього методу надає широкі можливості щодо маркування геномів залежно від мети дослідження. Зокрема, для паспортизації сортів та виявлення філогенетичних взаємовідносин між ними, що є важливою складовою селекційної роботи, зручними маркерними системами є такі, що дають змогу отримувати полілокусні ампліфікаційні спектри анонімної геномної ДНК, фланкованої інвертованими повторюваними послідовностями. Для рослин такі методи особливо перспективні з огляду на значну наявність

у їхніх геномах повторюваних послідовностей різних класів.

Однією з таких модифікацій ПЛР є метод виявлення поліморфізму ампліфікованих між-транспозонних послідовностей — IRAP (inter retrotransposone amplified polymorphism) [5]. Найчастіше для нього використовують ретротранспозони, що мають довгі кінцеві повтори — LTR (long terminal repeats) — ділянки, які найбільш консервативні та зручні для підбору праймерних послідовностей. Саме до такого класу, зокрема *Ty1/Copia-like* ретротранспозонів, належить соєвий ретротранспозон SIRE-1 [6], використаний у нашій роботі. Ретротранспозони, або мобільні елементи, є відносно молодими складовими еукаріотичних геномів. Здатність до копіювання та розповсюдження у геномі робить їх зручною моделлю для отримання молекулярно-генетичних маркерів, що дають можливість диференціювати саме найбільш генетичні події у геномах, зокрема міжсортові відмінності в рослин та міжпородні — у свійських тварин.

**Мета досліджень** — оцінка рівня міжсортowego генетичного поліморфізму сортів яблуні, різних за походженням та фенотиповими ознаками (форма крони, сила росту, форма та забарвлення плодів тощо) з використанням мо-



**Рис. 1.** Електрофореграма продуктів ампліфікації сорту яблуні Арбат з праймером до LTR соєвого ретротранспозону SIRE-1. Доріжки 1—4 — сорт Арбат, М — маркер молекулярної ваги (ДНК бактеріофага  $\lambda$ , рестрикована EcoRV)

лекулярно-генетичних маркерів, отриманих методом IRAP-ПЛР.

**Матеріали досліджень.** Як вихідний матеріал використовували пагони помологічно перевірених сортів яблуні, відібраних у колекційному саду селекційно-технологічного відділу Інституту садівництва УААН: колоноподібні — Арбат, Вертикаль, Трайдент, Болеро та неколоноподібні — Фіеста, Голден Делішес, Ямба, Рубінове Дуки [2].

ДНК виділяли з молодих свіжих листків з використанням гексадецилтриметил амоніум броміду (ЦТАБ) [4].

Для проведення IRAP-ПЛР використовували праймер до консервативної ділянки довгих кінцевих повторів (LTRs) соєвого ретротранспозону SIRE-1 з нуклеотидною послідовністю: 5'-GCA-CTT-ATG-CAA-GTG-GGA-TCA-GC-3'[5].

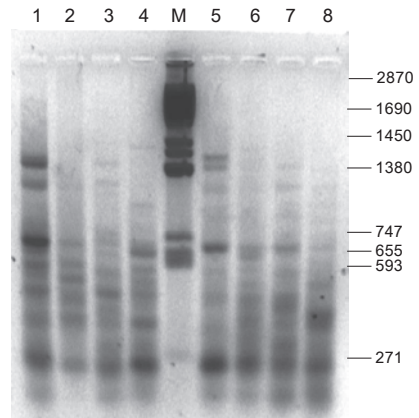
Ампліфікацію проводили в реакційній суміші (15 мкл), що складалася з 10 mM TRIS-HCl, 50 mM хлориду калію (KCl), 2,2 mM хлориду магнію (MgCl<sub>2</sub>), 2 mM кожного з 4-х дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP), 0,2 мкМ праймера, 1 од. акт. Taq ДНК полімерази та 100—120 нг геномної ДНК. Умови ПЛР включали початкову денатурацію 95°C — 5 хв і 35 послідовних циклів: 95°C — 30 с, 58°C — 30 с, 72°C — 2 хв 30 с. Кінцева елонгація 72°C — 7 хв. ПЛР зі зразком кожного сорту проводили в 4-разовій повторності. Продукти ампліфікації геномної ДНК сортів аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному 2%-му гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію у триацетатному буфері при напрузі електричного поля 2 В/см упродовж 7—8 год.

Опрацьовували результати електрофорезу за допомогою пакета програмного забезпечення TotalLab v2.01. При цьому кожен ампліфікаційний фрагмент, який є анонімною геномною послідовністю, фланкованою інвертованими фрагментами довгих кінцевих повторів соєвого ретротранспозону SIRE-1, або молекулярно-генетичний IRAP-маркер, вважали домінантним алелем окремого локусу. Ампліфікаційні фрагменти однакової молекулярної ваги, що відтворювалися у спектрах різних сортів, оцінювали як ідентичні. Відсутність такого фрагмента розцінювали як рецесивний алель відповідного локусу.

**Результати досліджень.** Використання праймеру до довгих кінцевих повторів ретротранспозону SIRE-1 у сумі для 8-ми сортів яблуні дало змогу отримати 20 ампліфікаційних фрагментів. Розміри продуктів ампліфікації варіювали в межах 120—1900 п.н. Електрофоретичні спектри мали компактну та рівномірну структуру без виразної кластеризації ампліфікаційних фрагментів з близькою молекулярною вагою.

Кожну реакцію ампліфікації проводили в 4-х повтореннях для визначення рівня відтворюваності методу (рис.1).

Проблеми з відтворенням спектрів ампліфікації було зафіксовано лише в одного сорту з 8-ми — Арбата. В одному зі спектрів був відсутній фрагмент довжиною 630 п.н. (доріжка 4), наявний у всіх 3-х інших (доріжки 1, 2, 3). Натомість у ньому було ідентифіковано фрагмент довжиною 725 п.н., нехарактерний для решти повторів.

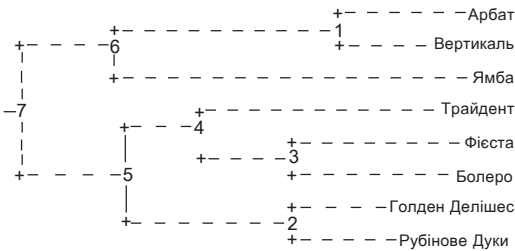


**Рис. 2.** Електрофореграма продуктів ампліфікації сортів яблуні з праймером SIRE-1: 1 — Арбат, 2 — Вертикаль, 3 — Трайдент, 4 — Фіеста, 5 — Голден Делішес, 6 — Ямба, 7 — Рубінове Дуки, 8 — Болеро, М — маркер молекулярної ваги (ДНК бактеріофага  $\lambda$ , рестрикована EcoRV)

**1. Коефіцієнти генетичних дистанцій між досліджуваними сортами яблуні**

Сорт	Арбат	Вертикаль	Трайдент	Фієста	Голден Делішес	Ямба	Рубінове Дуки	Болеро
Арбат		0,8500	0,6000	0,4000	0,6500	0,5500	0,6500	0,5000
Вертикаль	0,1625		0,4500	0,4500	0,6000	0,7000	0,6000	0,5500
Трайдент	0,5108	0,7985		0,7000	0,6500	0,5500	0,7500	0,7000
Фієста	0,9163	0,7985	0,3567		0,5500	0,5500	0,5500	0,8000
Голден Делішес	0,4308	0,5108	0,4308	0,5978		0,6000	0,8000	0,6500
Ямба	0,5978	0,3567	0,5978	0,5978	0,5108		0,6000	0,4500
Рубінове Дуки	0,4308	0,5108	0,2877	0,5978	0,2231	0,5108		0,6500
Болеро	0,6931	0,5978	0,3567	0,2231	0,4308	0,7985	0,4308	

Примітка. Над діагоналлю показано міри генетичної спорідненості, під діагоналлю — генетичні дистанції Нея.



**Рис. 3. Дендродіаграма філогенетичних зв'язків між досліджуваними сортами яблуні**

Загальний рівень відтворюваності спектрів ампліфікації у проведеному експерименті становив 96,9%. Тому для максимальної достовірності даних, отриманих при використанні цього методу, необхідно проводити щонайменше 3 повторних ПЛР.

Серед 20 виявлених IRAP-маркерів лише 4 (125, 235, 480 і 710 п.н.) були наявні в спектрах усіх 8-ми сортів (рис. 2).

Загальний рівень міжсорттового поліморфізму становив 80%. Серед 16 поліморфних маркерів до високополіморфних належать 8. Зокрема, у спектрі сорту Болеро виявлено сортоспецифічний маркер з молекулярною вагою 1397 п.н. Рівень поліморфізму 3-х маркерів з молекулярною вагою 620, 1620 і 1770 п.н. становив 75%, ще 4-х маркерів (310, 650, 815 і 850 п.н.) відповідно — 62,5%. Слід зазначити, що всі маркери, наявні в спектрах ампліфікації усіх сортів, належать до категорії низькомолекулярних, водночас серед високополіморфних маркерів є маркери з низькою і високою молекулярною вагою.

На основі відмінностей між генотипами сортів яблуні, виявлених з використанням IRAP-маркерів, було розраховано міру генетич-

ної спорідненості та генетичні дистанції Нея [7] (табл. 1).

Значення генетичних дистанцій Нея варіюють від 0,1625 до 0,9163, що свідчить про широкий діапазон генетичного різноманіття серед досліджуваних сортів. За отриманими даними, найбільш генетично спорідненими є сорти Вертикаль та Арбат (0,1625), Болеро та Фієста (0,2231), Рубінове Дуки та Голден Делішес (0,2231), Рубінове Дуки і Трайдент (0,2877). Рівні генетичної спорідненості між сортами з ознакою колоноподібності, розраховані з використанням IRAP-маркерів, потрапляють у розряд середніх (0,4500—0,7000), за винятком зазначеної пари сортів Вертикаль та Арбат (0,8500).

Кластерний аналіз на основі обчислених генетичних дистанцій Нея, проведений методом UPGMA, дав змогу виявити 2 головні автономні кластери. До першого увійшли сорти Арбат, Вертикаль та Ямба, другого — Трайдент, Рубінове Дуки, Голден Делішес, Фієста і Болеро

**2. Бінарні формули сортів яблуні**

Сорт	Формула сорту
Арбат	11001010010100010100
Вертикаль	11001011010101010000
Трайдент	11111101011101101000
Фієста	11010111101110100001
Голден Делішес	11010010100101110110
Ямба	11101011101101010011
Рубінове Дуки	11110110100101010100
Болеро	11110110100101010100

(рис. 3). Кластеризація за ознакою колоноподібності має місце лише в одному випадку — між спорідненими сортами Вертикаль та Арбат, хоча вони отримані від різних батьківських форм [2]. Інший кластер об'єднує колоноподібні сорти Трайдент і Болеро разом з Фіестою. Усі сорти цієї групи є носіями гена Vf, який забезпечує резистентність яблуні до парші [8].

За результатами проведеного аналізу створено попередні робочі паспорти 8-ми сортів яблуні. Для цього отримані дані було представ-

лено у вигляді бінарної матриці альтернативних ознак, у якій наявності IRAP-маркера відповідає 1, відсутності — 0 [1]. Усі 8 паспортних формул виявилися унікальними (табл. 2). Але така форма паспорта не зовсім зручна для користування. Тому в подальшому при генотипуванні інших сортів з використанням IRAP-маркерів та розширенні бази даних планується оптимізувати паспортні формули з використанням переважно високополіморфних і сортоспецифічних маркерів.

## Висновки

Метод IRAP-ПЛР має досить високу відтворюваність при генотипуванні сортів яблуні, але для максимальної достовірності отриманих даних доцільно проводити ПЛР у 3-х повтореннях.

Найбільш консервативні IRAP-маркери здебільшого мають низьку молекулярну вагу.

Кластерний аналіз на базі використання IRAP-маркерів не виявив чіткої диференціації проаналізованих сортів яблуні за ознакою колоноподібності.

Метод IRAP-ПЛР є перспективним щодо можливості створення унікальних паспортних формул для сортів досліджуваної культури.

## Бібліографія

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях//Науч.-метод. руководство/Под. ред. Сиволапа Ю.М. — К.: Аграр. наука, 1998. — 156 с.
2. Кондратенко Т.С., Кузьмінець О.М. Морфологічні ознаки саджанців і живців яблуні районів та перспективних сортів. — К.: Поліграф-книга, 2008. — 120 с.
3. Лангенфельд В.Т. Яблоня: морфологическая эволюция, филогения, география, систематика. — Рига: Зинатне, 1991. — 234 с.
4. Edwards K., Jonstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis//Nucl. Acids Res. — 1991. — 19, № 6. — P. 1349.
5. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP

- for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting//Nature Protocols. — 2006. — № 5. — P. 2478—2484.
6. Laten H.M., Majumdar A., Gaucher E.A. SIRE-1, a copia/Ty1-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelop-like protein//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — 95(6). — P. 897—902.
7. Nei M. Molecular population genetics and evolution//Amsterdam: North-Holland, Publ. Comp, 1975. — 360 p.
8. Urbanovich O., Kazlovskaya Z. Identification of scab resistance genes in apple trees by molecular markers//Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. — 2008. — 27, № 2. — P. 347—357.