

УДК 634.11:631.524.86

О. Ю. УРБАНОВИЧ¹, П. В. КУЗМИЦКАЯ¹, З. А. КОЗЛОВСКАЯ²ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ СЛИВ
С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ SSR-ТИПА

(Представлено академиком Л. В. Хотылёвой)

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск²Институт плодоводства, Самохваловичи

Поступило 15.09.2014

Введение. Слива домашняя и слива диплоидная относятся к роду *Prunus* (Rosaceae) подсемейства Prunoideae Focke (сливовые). Они адаптированы ко многим климатическим условиям и получили распространение в Европе, Азии и Америке. Успешно выращиваются сливы и в Беларуси [1].

Сливы диплоидные имеют базовое число хромосом $8 (2n = 16)$. Среди слив есть тетраплоидные виды, например, терн – $2n = 32$. Слива домашняя (*P. domestica* L.) является гексаплоидом – $2n = 48$. В диком виде она не встречается. Вопрос о ее происхождении окончательно не решен. Предполагается, что слива домашняя появилась в результате гибридизации алычи (*P. cerasifera* Ehrh) и тетраплоидного терна (*P. spinosa* L.). Данные анализа хлоропластной ДНК показывают, что *P. domestica* ближе к *P. cerasifera*, чем к *P. spinosa* [2].

Так называемые диплоидные сливы составляют особую группу. В последнее время они все больше используются в питании человека и успешно конкурируют с сортами сливы домашней. Их еще называют гибридными, так как в формировании сортов принимают участие разные виды. Современные сорта диплоидных слив созданы на основе гибридизации алычи (*P. cerasifera*), сливы китайской (*P. salicina* Lindl.) и ее подвидов – сливы уссурийской или маньчжурской (*subsp. mandschurica* или *ussurialis*), американской (*P. Americana* Marsh.) и других видов слив. Некоторые гибридные сорта диплоидных слив объединяют под названием русские сливы.

Геном сливовых достаточно консервативен. Сравнительное картирование геномов диплоидных видов показало их высокую коллиниарность [3; 4]. Многие специфичные молекулярные маркеры, выделенные из генома одного вида *Prunes*, находят аналогичные сайты связывания в геноме других представителей этого рода и даже подсемейства сливовых [3; 5]. При этом молекулярные маркеры оказываются расположены в гомологичных областях. Данное свойство расширяет возможность изучения геномов представителей рода *Prunes* молекулярными методами.

Цель исследования – анализ генетического разнообразия сортов слив, выращиваемых в Беларуси, и сравнение степени генетической удаленности видов друг от друга. Работу проводили с привлечением молекулярных маркеров SSR-типа.

Материалы и методы исследования. Исследование осуществляли среди сортов и видов слив, выращиваемых в Беларуси. В коллекцию были включены сорта, внесенные в Государственный реестр, а также образцы, представляющие интерес для селекционного процесса. Подбирались генотипы как близкие по происхождению, так и генетически отдаленные. В общей сложности сформированная коллекция была представлена 50 образцами.

Для анализа были использованы SSR-маркеры серии EMPA, разработанные для генома черешни сорта Наполеон и серии ВРРСТ, первоначально разработанные для персика [6; 7]. В общей сложности в исследовании были использованы 20 пар маркеров. SSR-маркеры были выбраны на основании их расположения в геноме черешни, сливы и персика таким образом, чтобы были охвачены разные хромосомы.

Маркеры были сгруппированы в наборы по 4 пары с учетом имеющихся сведений об их размерах в геноме видов, для которых они первоначально были получены. В каждом наборе праймеры были мечены разными красителями таким образом, чтобы можно было проводить анализ продуктов амплификации, полученных в результате реакции мультиплекса.

Препараты ДНК были получены из фрагментов листьев каждого отдельного растения. Выделение ДНК проводили с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Thermo scientific (ЕС) согласно рекомендованному протоколу.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 40 нг ДНК, 75 мМ трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween 20, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 200 мкМ каждого праймера, 1 ед. Таq-полимеразы.

Амплификацию с праймерами серии EMPA проводили в следующих условиях: 1-й этап: 1 цикл: 94 °С – 90 с; 2-й этап: 10 циклов: 94 °С – 30 с; 60 °С – 90 с (–1 °С на цикл); 72 °С – 60 с; 3-й этап: 25 циклов: 94 °С – 30 с; 50 °С – 90 с; 72 °С – 60 с; 1 цикл: 72 °С – 8 мин.

Амплификацию с праймерами серии ВРРСТ проводили в условиях: 1-й этап: 1 цикл: 94 °С – 90 с; 35 циклов: 94 °С – 45 с; 57 °С – 45 с; 72 °С – 2 мин; 1 цикл: 72 °С – 4 мин.

Продукты амплификации разделяли на секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Синтол, Россия).

Дискриминационная сила маркера (PD) была рассчитана по формуле:

$$PD = 1 - \sum(g_i)^2$$

где g_i – частота встречаемости i -го генотипа [8].

Доля уникальных генотипов была рассчитана как отношение количества уникальных генотипов к общему количеству исследованных генотипов. При этом под уникальными считались генотипы, содержащие уникальный состав SSR-аллелей.

Дендрограмма генетического сходства сортов была получена с помощью программы Treescop методом UPGMA, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li [9; 10].

Результаты и их обсуждение. Состав аллелей локусов микросателлитных последовательностей определяли для 26 образцов сливы домашней, 24 образцов сливы диплоидной и тетраплоидных видов из коллекционного сада РУП «Институт плодородства».

Т а б л и ц а 1. Размер и количество SSR-аллелей, количество уникальных генотипов, доля уникальных генотипов, дискриминационная сила маркера (PD), рассчитанные для генотипов сливы диплоидной

Название праймера	Размер аллелей в п. н.	Количество аллелей	Количество уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов	PD
EMPA001	116–180	13	19	0,795	0,9311
EMPA005	215–307	15	19	0,795	0,9311
EMPA018	99–129	7	13	0,542	0,8925
EMPA026	184–238	17	22	0,917	0,9522
EMPA004	163	1	1	0,042	0,0
EMPA006	104–149	4	3	0,125	0,5838
EMPA010	125–163	9	11	0,458	0,7468
EMPA007	171–216	12	11	0,458	0,7886
EMPA015	172–281	19	12	0,5	0,8199
EMPA019	105–152	13	13	0,542	0,8269
ВРРСТ039	118–180	16	18	0,75	0,9347
ВРРСТ016	87–102	5	9	0,375	0,5794
ВРРСТ040	96–162	17	20	0,833	0,9417
ВРРСТ004	175–209	13	15	0,625	0,9033
ВРРСТ017	166–227	14	19	0,792	0,9191
ВРРСТ025	152–196	19	21	0,875	0,9452
ВРРСТ032	164–214	10	13	0,542	0,8529
ВРРСТ005	129–132	2	2	0,083	0,0865
ВРРСТ026	134–186	17	20	0,833	0,9452
ВРРСТ027	239–245	3	4	0,167	0,2293
Среднее значение		11,3	13,3	0,552	0,7405

Все 20 SSR-маркеров, отобранных для исследования, имели сайты связывания в геноме исследуемых видов. Количество и размер выявляемых аллелей представлен в табл. 1 и 2. Как видно из представленных данных, диапазон длины SSR-аллелей, детектируемый с помощью 20 маркеров, колебался от 58 п. н. для маркера ВРРСТ016 до 335 п. н. для маркера ЕМРА005. Размер аллелей, выявляемый с помощью одного маркера, не различался значительно в геноме разных видов слив. Например, в локусах маркера ЕМРА001 длина аллелей среди сортов как сливы диплоидной, так и сливы домашней находилась в пределах 116–180 п. н. Наличие сайтов связывания для выбранных SSR-маркеров в геноме всех анализируемых видов и соответствие размеров идентифицированных аллелей указывает на то, что виды слив генетически близки. Дивергенция отдельных областей генома среди видов низкая.

Т а б л и ц а 2. Размер и количество SSR-аллелей, количество уникальных генотипов, доля уникальных генотипов, дискриминационная сила маркера (PD), рассчитанные для генотипов сливы домашней

Название маркера	Размер аллелей в п. н.	Количество аллелей	Количество уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов	PD
ЕМРА001	116–180	20	25	0,962	0,9585
ЕМРА005	226–335	13	13	0,5	0,8639
ЕМРА018	58–158	20	24	0,923	0,9556
ЕМРА026	188–242	21	24	0,923	0,9556
ЕМРА004	163	1	1	0,038	0,0
ЕМРА006	101–149	6	7	0,269	0,6657
ЕМРА010	125–201	16	20	0,769	0,9260
ЕМРА007	167–228	14	23	0,885	0,9527
ЕМРА015	211–287	32	26	1,0	0,9615
ЕМРА019	77–137	10	11	0,423	0,8535
ВРРСТ039	128–179	26	25	0,962	0,9585
ВРРСТ016	87–102	5	10	0,385	0,7119
ВРРСТ040	96–159	20	25	0,962	0,9585
ВРРСТ004	177–201	12	22	0,846	0,9552
ВРРСТ017	155–231	22	21	0,808	0,9493
ВРРСТ025	155–213	23	23	0,885	0,9522
ВРРСТ032	161–232	24	25	0,962	0,9585
ВРРСТ005	127–132	3	3	0,115	0,5742
ВРРСТ026	127–171	17	25	0,962	0,9585
ВРРСТ027	239–245	2	3	0,115	0,1420
Среднее значение		15,4	17,7	0,681	0,8106

SSR-маркеры различались по информативности. Как диплоидные сорта сливы, так и сорта сливы домашней оказались не полиморфны по маркеру ЕМРА004. Среди сортов сливы диплоидной и сливы домашней с помощью маркера ВРРСТ005 было обнаружено только 2 и 3 полиморфных аллеля соответственно. Но в целом количество полиморфных аллелей, детектируемых среди образцов слив, велико. Максимальное количество полиморфных аллелей составило 26 среди 26 сортов сливы домашней. Среднее значение количества аллелей среди образцов сливы домашней и сливы диплоидной было определено как 15,4 и 11,3 соответственно.

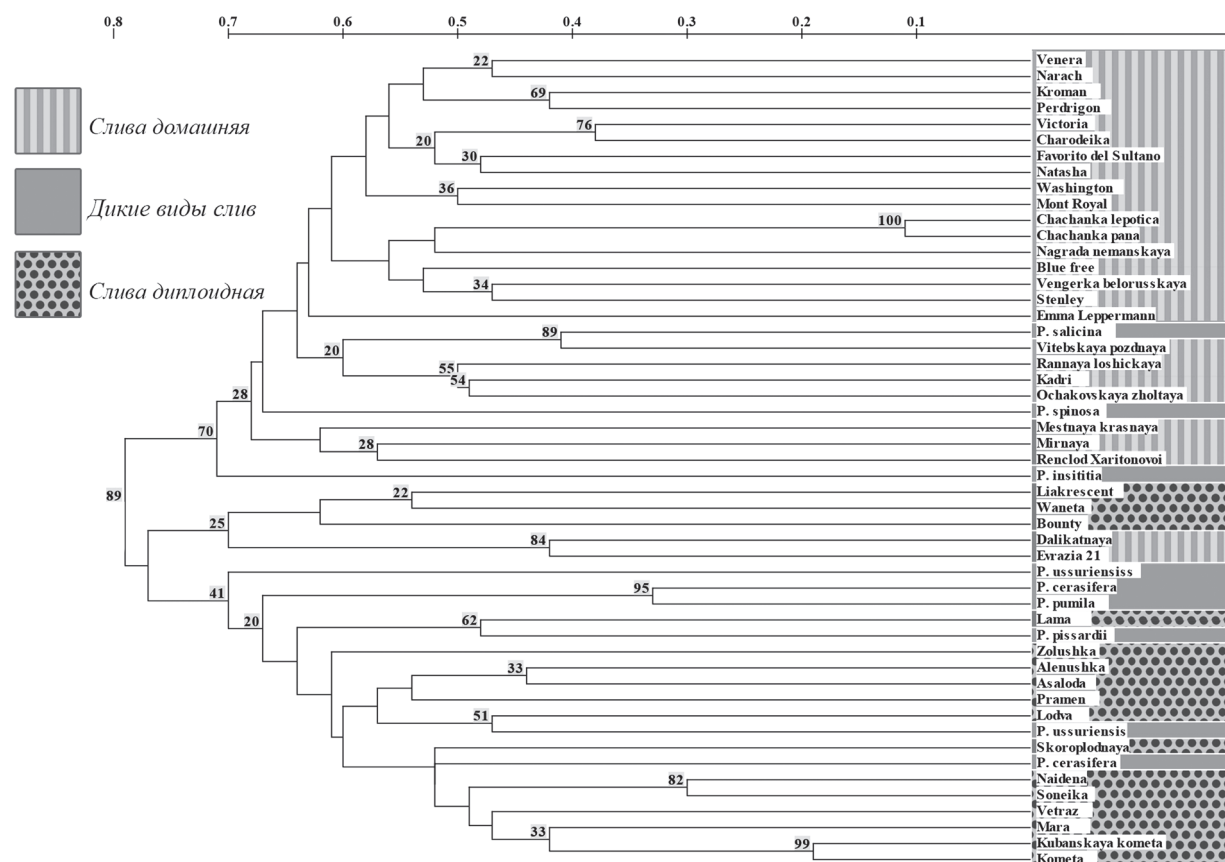
Результаты, полученные другими авторами, также указывают на большое генетическое разнообразие локусов макросателлитных последовательностей среди сортов слив. Среднее значение количества аллелей на локус, выявляемых с помощью SSR-маркеров, среди 29 сортов сливы диплоидной составило 12,1 [11]. Ahmad с соавт. обнаружили среди 20 сортов слив в среднем 4,3 аллеля [12]. Мпејја с соавт. среди 8 сортов диплоидных слив выявили в среднем 5,7 аллелей [13]. У сливы домашней аналогичный показатель составил 8,25 [14]. На среднее значение аллелей оказывают влияние не только видовая принадлежность сортов, но и несколько других факторов. Среди них количество использованных в исследовании маркеров, уровень информативности и полиморфизма отдельного маркера, который может значительно различаться для каждого локуса и зависеть от типа повтора. Немаловажное значение имеет объем выборки анализируемых

генотипов. Чем она больше, тем выше вероятность обнаружения новых аллелей. Значение имеет также степень генетической удаленности или близости образцов.

Среди исследованных образцов наблюдался высокий уровень генетического разнообразия. В частности, у сливы диплоидной при амплификации с маркером EMPA026 обнаружено 22 уникальных генотипа из 24. Интересный результат был получен для сливы домашней. Маркер EMPA015 позволил получить уникальный набор аллелей для всех сортов этого вида. В данном случае большое значение имела и гексаплоидная природа сливы домашней. У многих сортов одновременно детектировалось до 6 аллелей. Среди сортов сливы домашней выявлено максимальное среднее количество уникальных генотипов – 17,7. Соответственно доля уникальных генотипов и дискриминационная сила маркеров также была выше у этого вида – 0,681 и 0,8106 соответственно. Сорта сливы диплоидной уступали по данным показателям гексаплоидным сортам сливы домашней. Среднее количество уникальных генотипов среди них составило 13,3. Доля уникальных генотипов среди диплоидных слив была равна 0,552, PD – 0,7405.

В целом представленные нами результаты, равно как и литературные данные, говорят о том, что виды слив характеризуются большим генетическим разнообразием [11; 13]. Например, высокий уровень генетической вариабельности сливы диплоидной был отмечен для 29 сортов, среди которых были и межвидовые гибриды [11]. В этом отношении сорта, выращиваемые в Беларуси, не уступают сортам мирового генофонда. Поддержанию генетического разнообразия способствует перекрестное опыление, характерное для этих видов. Кроме того, в селекции косточковых культур широко используется межвидовая гибридизация, что благоприятствует увеличению генетического разнообразия сортов [11].

Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 20 SSR-маркеров, были использованы для построения дендрограммы генетического сходства видов косточковых культур (рисунок). Сорта, относящиеся к сливе домашней и сливе диплоидной, в основном разделились на два от-



Дендрограмма генетического сходства образцов слив. Цифры на дендрограмме отражают значения бутстрэпа. На шкале сверху отмечено генетическое расстояние между образцами

дельных кластера. Генетические расстояния между сортами слив как диплоидных, так и гексаплоидных, находятся в пределах около 0,34–0,75. Только два близких по происхождению чешских сорта сливы домашней Чачанска лепотика и Чачанска рана расположены на минимальном расстоянии 0,1. Они получены от одной комбинации скрещивания – Стенли × Ruth Gerstetter. Общий с ними кластер формируют родительский сорт Стенли и его потомки Блюффри (Стенли × Президент) и Венгерка белорусская (Стенли × Венгерка донецкая ранняя). В этот же кластер вошел белорусский сорт Награда Неманская, происхождение которого неизвестно. Возможно, в его формировании принимали участие генетически близкие к Стенли сорта или он сам.

В одну группу входят сорт Нарач и его потомок сорт Венера (Нарач × Вангенгейм). Вместе группируются также сорт народной селекции Очаковская желтая и его потомки – белорусский сорт Ранняя Лошицкая (Очаковская желтая св. оп) и эстонский сорт Кадри (Очаковская желтая × Suhkruploom). Другие сорта сливы домашней не связаны общим происхождением и распределены в разных кластерах.

В общий кластер с сортами сливы домашней вошел вид тетраплоидного терна *P. spinosa*, который, как предполагается, вместе с алычой *P. cerasifera* сформировал ее генотип. Имеющиеся в литературе сведения, полученные при изучении хлоропластной ДНК, говорят о том, что сорта сливы домашней могут формировать общий кластер с образцами *P. cerasifera* [2; 15]. В результате анализа региона хлоропластной ДНК было показано, что гексаплоидные виды слив генетически удалены от видов с другим уровнем пloidности [15]. В представленном исследовании образцы, относящиеся к *P. cerasifera*, вошли в состав кластера диплоидных слив. Они оказались ближе к ним по составу аллелей микросателлитных последовательностей. В общий с диплоидными сливами кластер вошли также следующие виды: алыча краснолистная *P. pissardii* (*P. cerasifera* var. *pissardii*), слива карликовая *P. pumila*, слива уссурийская *P. ussuriensis*. Генетически близок этим видам белорусский сорт Лама, полученный в результате свободного опыления сеянца 9-250.

Полученный результат говорит о слабой дифференциации видов диплоидных слив. Считается, что в ботаническом отношении сливовые являются очень молодым родом, и процессы формообразования продолжают у него и в настоящее время. Виды диплоидных слив не только близки по составу аллелей локусов микросателлитных последовательностей, но и достаточно хорошо скрещиваются между собой. Происхождение ряда видов связано с межвидовой гибридизацией. Не исключается образование межвидовых гибридов в естественных условиях. Большую роль в образовании новых форм играет человек. Он целенаправленно получает межвидовые гибриды сливовых в результате селекции, существенно улучшая мировой сортимент. Появились сорта, в родословных которых представлены несколько видов сливовых. В частности, генетически близок видовым сливам сорт Евразия 21 (рисунок). Это сложный межвидовой гибрид, полученный от спонтанной гибридизации диплоидного сорта Лакресцент, выведенного в США профессором Ольдерменом. Сорт был отобран из сеянцев гексаплоидной группы от свободного опыления ($6x = 48$). В формировании генотипа Евразия 21 принимали участие диплоидные виды ($2x = 16$) восточно-азиатской, американской сливы, сливы Симона, китайской сливы, алыча и домашняя слива ($6x = 48$). Сорт Лакресцент вошел в ту же группу. В ней представлен также американский сорт Ванета, относящийся к сливе китайской *P. salicina*, американский сорт Баунти и сорт, отнесенный к сливе домашней Даликатная, полученный в результате скрещивания Евразия 21 × Венгерка ажанская.

Минимальное генетическое расстояние наблюдается между сортами диплоидной сливы Комета и Кубанская комета, которые были получены от одной комбинации скрещивания – Скороплодная × Пионерка. Важно, что при этом удалось различить по составу SSR-аллелей такие близкородственные сорта. Общую группу с ними образует родительский сорт Скороплодная и другие сорта, полученные на его основе – Найдена (Скороплодная × Десертная) и Ветразь (18-1 × Скороплодная). В эту же группу вошел сорт Мара, полученный в результате свободного опыления гибридного сеянца F_2 (*P. cerasifera* × *P. salicina* var. *ussuriensis*) и Сонейка, полученный в результате свободного опыления сорта Мара. Возможно, опылителем сорта Мара был сорт Скороплодная либо близкий к нему сорт.

В целом можно заключить, что генофонд слив, выращиваемых в Беларуси, достаточно разнообразен. Сорты как сливы домашней, так и сливы диплоидной характеризуются высоким уровнем полиморфизма локусов микросателлитных последовательностей. При этом между видами наблюдается высокая гомология отдельных регионов SSR-локусов. Эти свойства генома можно использовать для разработки методов ДНК-идентификации сортов и видов слив.

Литература

1. Самусь В. А. // Наука и инновации. 2012. Т. 112. С. 4–6.
2. Horvath A., Balsemin E., Barbot J.-C. et al. // *Scientia Horticulturae*. 2011. Vol. 129. P. 283–293.
3. Dirlwanger E., Graziano E., Joobeur T. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101, N 26. P. 9891–9896.
4. Jung S., Jiwan D., Cho I. et al. // *BMC Genomics*. 2009. Vol. 10, N 76. P. 1–17.
5. *Genome Mapping and Breeding in Plants: Fruits and Nuts*. Berlin; Heidelberg, 2007. – 370 p.
6. Dirlwanger E., Cosson P., Tavaud M. et al. // *Theor. Appl. Genet.* 2002. Vol. 105. P. 127–138.
7. Clarke J. B., Tobbutt K. R. // *Mol. Ecol. Notes*. 2003. Vol. 3. P. 578–580.
8. Kloosterman A. D., Budowle B., Daselaar P. // *Int. J. Leg. Med.* 1993. Vol. 105. P. 257–264.
9. Nei M., Li W. H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol. 76. P. 5269–5273.
10. Van de Peer Y., De Wachter R. // *Comput. Applic. Biosci.* 1993. Vol. 9. P. 177–182.
11. Carrasco B., Diaz C., Moya M. et al. // *Ciencia Investigation Agrara*. 2012. Vol. 39, N 3. P. 533–543.
12. Ahmad D. D., Potter D., Southwick S. M. // *Hort. Science Biotech*. 2004. Vol. 79. P. 164–169.
13. Mnejja M., Garcia-Mas J., Howad W. et al. // *Molecular Ecology Notes*. 2004. Vol. 4. P. 163–166.
14. Öz M. H., Vurgun H., Bakir M. et al. // *Genetics and Moleculr Research*. 2013. Vol. 12, N 4. P. 5310–5320.
15. Reales A., Sargent D. J., Tobbutt K. R. et al. // *Tree Genet. and Genom*. 2010. Vol. 6. P. 37–45.

O. Yu. URBANOVICH, P. V. KUZMITSKAYA, Z. A. KAZLOUSKAYA

O.Urbanovich@igc.bas-net.by

INVESTIGATION OF PLUM VARIETY DIVERSITY USING SSR MARKERS

Summary

Genetic diversity of the 50 plum accessions (species and varieties) cultivated in Belarus was studied by the SSR analysis using 20 markers. On the average 17.7 and 13.3 alleles were identified among domestic and diploid plum accessions respectively. Percentage of the unique genotypes were 0.681 and 0.552 and discrimination power levels were 0.811 and 0.741 for domestic and diploid plum accessions respectively. Cluster analysis allowed division of almost all accessions into two big groups according to their ploidy level. Genetic distances between the diploid plum varieties belonging to different species or interspecific hybrids were similar to the distances between intraspecific ones that indicates on low interspecific differentiation of diploid plum.