

УДК 634.11:631.524.86

О. Ю. УРБАНОВИЧ¹, П. В. КУЗМИЦКАЯ¹, З. А. КОЗЛОВСКАЯ², А. А. ТАРАНОВ²**РАЗНООБРАЗИЕ SSR-АЛЛЕЛЕЙ СОРТОВ ВИШНИ ОБЫКНОВЕННОЙ
(*PRUNUS CERASUS*)**¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by,²Институт плодоводства, Минская обл., пос. Самохваловичи, e-mail: zoya-kozlovskaya@tut.by

(Поступила в редакцию 10.10.2013)

Введение. Вишня обыкновенная (*Prunus cerasus* L.) является важной плодовой культурой, выращиваемой в странах умеренного климата. Ее плоды употребляются населением в свежем и переработанном виде. В Беларуси вишня повсеместно выращивается в любительских садах, а в настоящее время положено начало закладке промышленных вишневых садов, предназначенных главным образом для производства сырья в перерабатывающей промышленности. Такие сады уже заложены в Витебской, Минской, Гродненской областях, подготовлен и реализуется крупный проект в Брестской области. Расширяется количество сортов вишни, выращиваемых в республике. В Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород нашей страны в 2013 г. внесено 8 сортов этой культуры.

Вишня обыкновенная относится к тетраплоидным видам, $2n=32$. Размер ее генома составляет 599 Мб [1]. Считается, что она произошла в результате межвидовой гибридизации в естественных условиях черешни (*C. avium*, $2n=16$) и вишни степной (*C. fruticosa*, $2n=32$). В пользу этого предположения говорит тот факт, что при искусственной гибридизации черешни и вишни степной получались растения, очень похожие по целому ряду морфологических признаков на вишню обыкновенную [2]. Гибридное происхождение вишни обыкновенной было подтверждено изотимным анализом, методом гибридизации *in situ*, кариотипическим анализом [3–5]. Вероятно, благодаря особенностям своего происхождения вишня обыкновенная отличается большим разнообразием форм. Она занимает промежуточное положение между родительскими видами по проявлению ряда фенотипических признаков. Вишня не потеряла способность к образованию межвидовых гибридов и в настоящее время. Это ее свойство используется в селекции при создании новых сортов.

Геном вишни, как видно из ее происхождения, имеет много общего с геномом черешни, а также других представителей рода *Prunus*. Общность структурной организации представителей рода позволяет применить для анализа генетического разнообразия вишни обыкновенной молекулярные маркеры к локусам микросателлитных последовательностей, разработанные для других видов *Prunus*.

Целью данного исследования был анализ генетического разнообразия SSR-аллелей сортов вишни обыкновенной, выращиваемых в Беларуси, а также выбор набора молекулярных маркеров для их идентификации.

Материалы и методы исследования. Объектом изучения служила коллекция сортов вишни обыкновенной РУП «Институт плодоводства». Сформированная выборка представлена 17 образцами различного происхождения селекции Беларуси, России, Украины, Польши, Венгрии, США. Название образцов и их происхождение указаны в табл. 1.

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.

Т а б л и ц а 1. Название и происхождение образцов вишни

| Название | Происхождение | Страна |
|---------------------------|---|----------|
| Вишня степная | <i>Prunus fruticosa</i> | — |
| Вянок | Новодворская, св.оп. | Беларусь |
| Гриот белорусский | Гриот остгеймский × Новодворская | Беларусь |
| Гриот Серидко | Местный сорт | Украина |
| Жывица | Гриот Остгеймский × Денисенa желтая | Беларусь |
| Заранка | Новодворская × Владимирская | Беларусь |
| Ласуха | Молодежная × Норт стар | Беларусь |
| Лотовка | Местный сорт | Польша |
| Любская | Местный сорт | Россия |
| Молодежная | Любская × Владимирская | Россия |
| Новодворская | Сеянец № 1, св.оп. | Беларусь |
| Норт стар | Schattenmorelle, св.оп | США |
| Памяти Еникеева | Жуковская × Коринка | Россия |
| Панди | Местный венгерский сорт | Венгрия |
| Превосходная Колесниковой | (Жуковская × Заря Поволжья (<i>P. cerasus</i> × <i>P. fruticosa</i>) + Золушка (<i>P. cerasus</i>)) | Россия |
| Сеянец № 1 | Сеянец местной вишни | Беларусь |
| Тургеневка | Жуковская, свободное опыление | Россия |

Для оценки генетического разнообразия сортов вишни обыкновенной применяли молекулярные маркеры SSR-типа, выявляемые в результате ПЦР. Названия маркеров представлены в табл. 2. Примеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь).

Т а б л и ц а 2. Название праймеров, использованных для анализа сортов вишни обыкновенной

| Название праймера | Размер аллелей, п.н.* | Тип повтора* | Размер аллелей, п.н. | Количество аллелей |
|-------------------|-----------------------|---|----------------------|--------------------|
| EMPA001 | 149–163 | (AG) ₄ GGGT(AG) ₂₆ | 133–165 | 13 |
| EMPA005 | 237–253 | (CT) ₃ CAT(CT) ₁₂ T(AC) ₂₃ | 244–282 | 7 |
| EMPA018 | 94–106 | (GA) ₁₈ | 88–123 | 8 |
| EMPA026 | 201–215 | (CT) | 184–238 | 10 |
| EMPA004 | 180–188 | (GA) ₄ AA(GA) ₄ AA(GA) ₁₅ | 169–192 | 9 |
| EMPA006 | 94–98 | (GA) ₁₀ | 106 | 1 |
| EMPA010 | 127–133 | (GA) ₃ GTAACG(GA) ₁₄ | 134–142 | 4 |
| EMPA027 | 219–223 | (AG) ₂₄ GGAGACG(AG) ₃ | — | — |
| EMPA007 | 172–174 | (GA) ₁₀ | 174–178 | 3 |
| EMPA015 | 216–239 | (GA) ₃₂ | 198–228 | 5 |
| EMPA019 | 101–119 | (GA) ₃ GG(GA) ₁₂ | 127–137 | 4 |
| EMPA022 | 154–162 | (AG) ₄ -(AG) ₇ AAG(AG) ₃ | — | — |
| ВРРСТ039 | 122–180 | (GA) ₂₀ | 128–148 | 7 |
| ВРРСТ016 | 96 | (AG) ₁₃ | 94–96 | 2 |
| ВРРСТ040 | 132–148 | (AG) ₂₁ | 127–152 | 8 |
| ВРРСТ004 | 182–216 | (CT) ₂₂ | 182–200 | 3 |
| ВРРСТ017 | 134–168 | (GA) ₂₈ | 196–204 | 3 |
| ВРРСТ022 | 132 | (AG) ₂₂ | — | — |
| ВРРСТ025 | 203 | (GA) ₂₉ | 152–194 | 14 |
| ВРРСТ032 | 201–215 | (AG) ₁₀ CG(AG) ₁₃ | 162–199 | 8 |
| ВРРСТ005 | 143 | (AG) ₁₀ | 132–201 | 11 |
| ВРРСТ026 | 134 | (AG) ₈ GC(AG) ₆ | 132–153 | 6 |
| ВРРСТ027 | 249 | (GA) ₁₁ | 248–253 | 2 |
| ВРРСТ033 | 201–215 | (AG) ₃₂ | — | — |

* Согласно E. Dirlewanger et al. [6] и J. B. Clarke, K. R. Tobbutt [7].

Для анализа генетического разнообразия сортов вишни обыкновенной 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 24 пары маркеров. SSR-маркеры для исследования генома вишни были выбраны на основании их расположения в геноме черешни, сливы и персика таким образом, чтобы были охвачены разные хромосомы [6, 8, 9].

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.

Амплификацию с праймерами серии EMPA проводили в следующих условиях: I этап, 1 цикл, 94 °C – 90 с; II этап, 10 циклов: 94 °C – 30 с; 60 °C – 90 с (–1 °C на цикл), 72 °C – 60 с; III этап, 25 циклов: 94 °C – 30 с; 50 °C – 90 с; 72 °C – 60 с; 1 цикл: 72 °C – 8 мин.

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

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

Дендрограмма генетического сходства образцов была получена с помощью программы Treescan на основании коэффициента генетического сходства Nei и Li [10, 11].

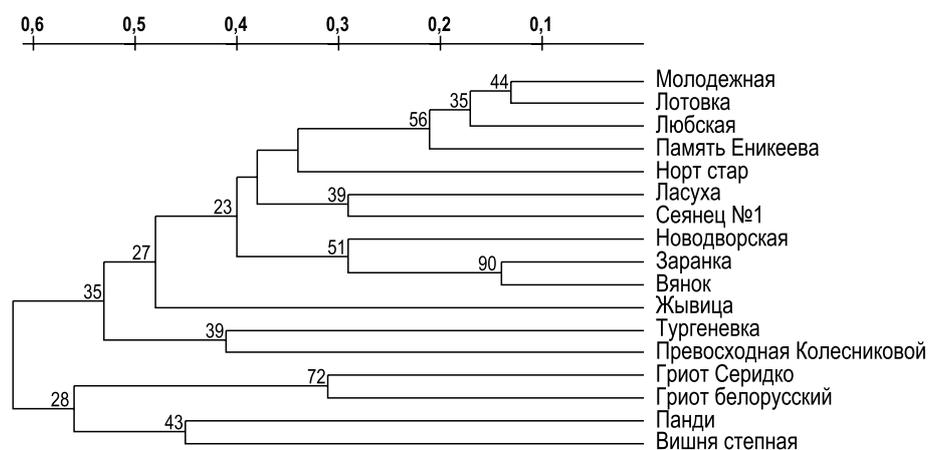
Результаты и их обсуждение. SSR-маркеры, использованные в данном исследовании, как разработанные к геному черешни, так и разработанные к геному персика, имели сайты связывания в геноме вишни обыкновенной. Качество фрагментов амплификации было разным. Так, в результате реакции с маркерами EMPA027 и ВРРСТ022 наблюдалось большое количество пиков, которые плохо поддавались анализу, что делало неудобным их применение для оценки генетического разнообразия исследуемых образцов. Данные маркеры были исключены из дальнейшего исследования. Маркеры EMPA006 и ВРРСТ022 оказались неполиморфны. В геноме тестируемых сортов вишни с их помощью удалось обнаружить только один аллель. Низкий уровень полиморфизма был отмечен для маркеров ВРРСТ016, ВРРСТ017 (табл. 2).

Маркеры EMPA001, EMPA004, EMPA005, EMPA015, EMPA018, EMPA026, разработанные к геному ближайшего родственного вида вишни обыкновенной – черешни, позволяли получить четкие пики, пригодные для идентификации сортов. Хорошие результаты показывали маркеры ВРРСТ039, ВРРСТ040, ВРРСТ025, ВРРСТ032, ВРРСТ005, ВРРСТ026, разработанные при исследовании генома персика. С помощью этих маркеров в геноме тестируемых образцов удалось выявить от 5 до 14 полиморфных аллелей. Для сравнения в геноме 14 сортов черешни маркеры серии EMPA выявляли от 2 до 7 полиморфных аллелей на локус [7]. Маркеры серии ВРРСТ позволяли обнаружить до 9 полиморфных аллелей в геноме 27 образцов персика и до 6 аллелей в геноме 21 образца черешни [6].

Размер выявляемых аллелей представлен в табл. 2. Длина SSR-аллелей, детектируемых в геноме вишни обыкновенной, мало отличается от длины соответствующих аллелей в геноме черешни и персика. Наличие сайтов связывания в геноме этих видов и соответствие размеров идентифицированных аллелей указывает на то, что эти виды генетически близки. При этом большая часть полиморфных маркеров выявляет в геноме вишни обыкновенной одновременно более двух аллелей, следовательно, они имеют более одного сайта связывания в геноме, т. е. являются полилокусными. В отличие от этого вида, в геноме черешни и персика эти же маркеры характеризуются как монолокусные. Причина наблюдаемого явления кроется в тетраплоидном происхождении вишни обыкновенной. Как было сказано выше, вишня обыкновенная произошла в результате гибридизации двух видов *C. avium* и *C. fruticosa*. Соответственно, один локус мог быть унаследован от черешни, а другой – от вишни степной. С другой стороны, вишня степная также является тетраплоидным видом. Нельзя исключить, что два локуса в некоторых случаях могут быть унаследованы от этого предкового вида. И в том и в другом случае, в геноме вишни обыкновенной могут присутствовать два гомологичных локуса. Соответственно, количество выявляемых аллелей

может доходить до 4. Только три маркера из всех полиморфных маркеров, использованных в представленном исследовании, а именно EMPA007, BPPCT016 и BPPCT004, обнаруживают в геноме не более двух аллелей одновременно. Однако однозначно отнести их к монолокусным нельзя, так как они демонстрируют очень низкий уровень полиморфизма. Есть вероятность, что у сортов вишни обыкновенной локусов два, и длина аллелей в них одинакова. Важно также, что виды *Prunus* генетически очень близки. Дивергенция их нуклеотидных последовательностей незначительна. Это затрудняет поиск монолокусных маркеров к геному вишни обыкновенной. С другой стороны, низкая дивергенция нуклеотидных последовательностей представителей *Prunus* позволяет успешно использовать для их изучения общие геномспецифичные маркеры [6].

Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 17 SSR-маркеров, характеризующихся наибольшим уровнем полиморфизма, были использованы для построения дендрограммы генетического сходства сортов вишни (рисунок). Как видно из представленной дендрограммы, сорта вишни обыкновенной значительно отличаются друг от друга по составу SSR-аллелей. Внутри вида выявляется значительное генетическое разнообразие. Максимальное генетическое расстояние между сортами находится на уровне 0,6.



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

Более близкими в генетическом отношении оказались сорта белорусской селекции Заранка (Новодворская × Владимирская) и Вянок (Новодворская, св.оп.). Сорт Новодворская, потомками которого они являются, тесно связан с ними генетически. На близком генетическом расстоянии находятся старые местные сорта Любская, Лотовка, а также потомок сорта Любская сорт Молодежная. Примечательно, что полученный в результате межвидовой гибридизации сорт Превосходная Колесниковой (Жуковская × Заря Поволжья (*P. cerasus* × *P. fruticosa*) + Золушка (*P. cerasus*), а также образец вишни степной не выделяются в самостоятельный кластер и демонстрируют тесную связь по составу SSR аллелей с сортами вишни обыкновенной. Этот результат дополнительно подтверждает генетическую близость видов вишни и черешни.

На основании анализа полиморфизма SSR-аллелей в геноме вишни обыкновенной был выбран набор маркеров, позволяющий проводить ДНК идентификацию ее сортов. В набор были включены 2 комплекта маркеров. В первый комплект входят маркеры EMPA001, EMPA005, EMPA018, EMPA026, во второй – маркеры BPPCT005, BPPCT025, BPPCT026, BPPCT039. Для идентификации SSR-аллелей можно использовать две реакции мультиплекса с 4 маркерами одновременно, каждый из которых мечен разным красителем, что позволяет одновременно детектировать все аллели. Такой подход существенно упрощает и удешевляет метод ДНК-идентификации сортов, что важно для практического применения. Состав аллелей образцов вишни, выявляемый с помощью предложенного набора маркеров, представлен в табл. 3. В таблице указан относительный размер аллелей. Он был определен с помощью внутреннего стандарта S450. При изменении стандарта или системы мечения праймеров относительная длина аллелей может быть другой.

Т а б л и ц а 3. Состав SSR-аллелей в геноме образцов вишни

| Название сорта | Название маркера, длина аллелей | | | |
|---------------------------|---------------------------------|-------------|-----------------|------------------|
| | EMPA001 | EMPA005 | EMPA018 | EMPA026 |
| Вишня степная | 133,141,147,159 | 259, 280 | 88 | 184,208,214, 222 |
| Вянок | 145,151,155 | 246,248,259 | 88 | 208,212,226 |
| Гриот белорусский | 147,155,159 | 259 | 103,115,123 | 208,214 |
| Гриот Серидко | 147,153,155,163 | 244,259 | 97,123 | 202,208,214 |
| Жывица | 147,155,157,165 | 246,250,259 | 103,115 | 208,212,230 |
| Заранка | 135,145,155 | 246,248,259 | 103,115 | 208,222 |
| Ласуха | 147,155,159 | 246,259 | 107,115 | 208,212,236,238 |
| Лотовка | 147,155,159 | 246,259 | 88,103 | 208,212,226 |
| Любская | 147,155,159 | 246,259 | 88,103 | 208,212 |
| Молодежная | 147,155,159 | 246,259 | 115 | 208,212,226 |
| Новодворская | 145,155 | 246,250,259 | 103 | 208,212 |
| Норт стар | 147,155 | 246,259 | 103 | 208,226 |
| Память Еникеева | 145,155,159 | 246,259 | 103,115 | 208,212,226 |
| Панди | 141,155,165 | 259 | 103 | 208,222 |
| Превосходная Колесниковой | 145,155 | 246,248 | 88,115 | 208,214 |
| Сеянец № 1 | 147,155 | 245,259 | 103,115 | 208,212,238 |
| Тургеневка | 143,145,155 | 246,259 | 88,111 | 208,212,214 |
| Название сорта | Название маркера, длина аллелей | | | |
| | ВРРСТ005 | ВРРСТ025 | ВРРСТ026 | ВРРСТ039 |
| Вишня степная | 144,146,155,163 | 152,165,169 | 147,168 | 128,130,142 |
| Вянок | 144,163,201 | 159,196 | 147,182,188 | 130,140,142,148 |
| Гриот белорусский | 142,144,155 | 159,170,196 | 147,168 | 130,132,142,148 |
| Гриот Серидко | 142,144,155,165 | 157,174,183 | 147,168 | 130,132 |
| Жывица | 144,155,161,163 | 157,172,183 | 153,168,180,188 | 132,142,146,148 |
| Заранка | 155,163 | 152,159,174 | 147,182,188 | 130,140,142,148 |
| Ласуха | 144,147,163 | 159,172 | 147,168,188 | 142,148 |
| Лотовка | 132,144,163 | 159,174,196 | 132,142,168,188 | 140,142 |
| Любская | 144,163 | 157,162 | 142,168,186 | 140,142 |
| Молодежная | 144,163 | 159,162,172 | 142,188 | 142 |
| Новодворская | 144,155,163 | 159,174,196 | 142,164,188 | 130,140,142,148 |
| Норт стар | 144,155,163 | 159,174 | 142,174,188 | 128,140,142,148 |
| Память Еникеева | 144,163 | 162,167 | 142,168 | 142 |
| Панди | 144,146,155,197 | 159,174 | 147,174 | 128,142,148 |
| Превосходная Колесниковой | 144,146,163 | 155,157,164 | 144,182,190 | 128,142 |
| Сеянец № 1 | 144,163 | 157,159,165 | 152,188,190 | 142,148 |
| Тургеневка | 144,146,163 | 162,196 | 144,168 | 142,148 |

П р и м е ч а н и е. Длина аллелей указана в п.н.

Как видно из табл. 3, все образцы имеют уникальный состав аллелей в рассмотренных локусах. Следовательно, предложенный метод можно успешно использовать для сортовой идентификации вишни. При необходимости предложенный набор маркеров может быть дополнен.

Относительно небольшое количество SSR-маркеров для ДНК-идентификации сортов вишни можно использовать потому, что представители рода *Prunus* характеризуются, как правило, высоким генетическим разнообразием. Так, при разработке метода ДНК-идентификации близкого родственника вишни – миндаля (*Prunus dulcis*) было использовано 12 SSR маркеров, в том числе 5 из серии ВРРСТ [12]. При исследовании генетического разнообразия сортов персика, выращиваемого в Испании, было отобрано 6 маркеров из 15, которые позволяют проводить их идентификацию [13]. Из них 3 маркера относятся к серии ВРРСТ.

SSR-маркеры позволяют достаточно надежно определить сортовую принадлежность образцов. Так, например, два образца вишни обыкновенной, анализ которых был проведен в данном исследовании, а именно образцы сорта Панди, полученные из Польши и Донецка, показали полную идентичность по составу SSR-аллелей, причем не только при использовании 8 маркеров, предложенных для идентификации сортов, но и по составу аллелей, выявляемых с помощью 17 SSR-маркеров.

Заключение. Исследование коллекции сортов вишни обыкновенной, проведенное с помощью 24 SSR-маркеров, показало, что они характеризуются высоким генетическим разнообразием. Выбран набор из 8 SSR-маркеров, позволяющий проводить идентификацию сортов. Метод может быть использован в селекции вишни обыкновенной для охраны авторских прав селекционных учреждений, сохранения уникального коллекционного материала.

Литература

1. Genome Mapping and Breeding in Plants / Fruits and Nuts. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 370.
2. Olden E. J., Nybom N. // *Hereditas*. 1968. Vol. 70. P. 3321–3323.
3. Hancock A. M., Iezzoni A. F. // *Hort. Science*. 1988. Vol. 23, №2. P. 381–383.
4. Santi F., Lemoine M. // *Annales des Sciences Forestières*. 1990. Vol. 47. P. 219–227.
5. Schuster M., Schreiber H. // *Acta Hortic*. 2000. Vol. 538. P. 375–379.
6. Dirlewanger 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. Clarke J. B., Sargent D. J., Bošković R. I. et al. // *Tree Genet. and Genom*. 2009. Vol. 5. P. 41–51.
9. Aranzana M. J., Pineda A., Cosson P. et al. // *Theor Appl Genet*. 2003. Vol. 106. P. 819–825.
10. Nei M., Li W. H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol. 76. P. 5269–5273.
11. Van de Peer Y., De Wachter R. // *Comput. Applic. Biosci*. 1993. Vol. 9. P. 177–182.
12. Dangi G. S., Yang J., Golino D. A., Gradziel, T. // *Euphytica*. 2009. Vol. 168. P. 41–48.
13. Bouhadida M., Moreno M. A., Gonzalo M. J. et al. // *Tree Genet. and Genom*. 2013. Vol. 7. P. 257–270.

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

DIVERSITY OF SSR-ALLELIES THE SOUR CHERRY CULTIVARS (*PRUNUS CERASUS*)

Summary

The level of genetic differentiation among 17 sour cherry cultivars growing in Belarus was investigated with SSR markers previously identified in sweet cherry and peach. In total, 128 polymorphic alleles were detected by the 24 SSR markers with an average number of alleles of 6,4 per marker. The high degree of diversity between the pear sour cherry cultivars was shown. The set from 8 SSR markers was used for identification of cultivars.