

ISSN 0558-1125

УДК 577.212.3:57.088.2:57.088.3: 634.1

Н.В. ТРЯПЦІНА, кандидат с.-г. наук

Д.О. КИСЕЛЬОВ

Інститут садівництва (ІС) НААН, Київ, Україна

**ОЦІНКА ДИСКРИМІНАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК РІЗНИХ ЗА ПОХОДЖЕННЯМ
IRAP-МАРКЕРІВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПРОФІЛЮВАННЯ ГЕНОМУ ЯБЛУНІ (*MALUS
DOMESTICA BORKH.*)**

N.V.TRYAPITSYNA, PhD

D.O.KYSELYOV

Institute of Horticulture, NAAS, Kyiv, Ukraine

**VALUATING THE DISCRIMINATIVE CHARACTERISTICS OF IRAP-MARKERS OF
DIFFERENT ORIGIN FOR THE APPLE (*MALUS DOMESTICA BORKH.*) GENETIC
FINGERPRINTING**

Оцінено інформативність IRAP-маркерів, отримання яких базується на проведенні полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до консервативних ділянок двох мобільних елементів, які належать до різних субкласів LTR-вмісних ретротранспозонів. Доведено високі дискримінаційні можливості маркерних систем із застосуванням ретротранспозонів: соєвого (SIRE-1) та яблуневого (Malus TRIM) для генетичного профілювання геному яблуні. Виявлено низький рівень кореляції між показниками генетичної спорідненості проаналізованих генотипів яблуні, обчисленими на базі кожної маркерної системи окремо. Для систематизації генетичного матеріалу яблуні показано доцільність консенсусного аналізу з залученням обох маркерних систем.

Оценена информативность IRAP-маркеров, получение которых базируется на использовании полимеразной цепной реакции с праймерами к консервативным участкам двух мобильных элементов, которые относятся к разным субклассам LTR-содержащих ретротранспозонов. Доказаны высокие дискриминационные возможности маркерных систем с применением ретротранспозонов: соевого (SIRE-1) и яблоневого (Malus TRIM) для генетического профилирования генома яблони. Выявлен низкий уровень корреляции между показателями генетического родства проанализированных генотипов яблони, рассчитанными на базе каждой маркерной системы отдельно. Для систематизации генетического материала яблони показана целесообразность консенсусного анализа с использованием обеих маркерных систем.

The authors have evaluated the informativity of IRAP-markers which are obtained on the basis of using polymerase chain reaction with primers to conservative parts of two mobile elements relating to different subclasses of LTR

retrotransposons. High discriminative possibilities of using marker system have been proved for the apple genome fingerprinting with the application of soybean (SIRE-1) and apple (Malus TRIM) retrotransposons. The low correlation level has been detected between genetic similarity values of the analyzed apple genotypes calculated on the basis of each markers system separately. The purposefulness of the consensus analysis with using the both apple marker systems has been shown for apple genetic material systematizing.

Вступ. Одним з найважливіших питань селекційної практики створення нових сортів яблуні є сортування вихідного та гібридного матеріалу за рівнем спорідненості і генетичними дистанціями для оптимізації схем схрещування. Залучення до такої типізації молекулярно-генетичних маркерів дає можливість проводити її вже на ювенільній стадії, що значно спрощує генетичну оцінку гібридних популяцій та скорочує час створення нового сорту. Вирішення такого завдання вимагає пошуку оптимізованих маркерних систем з високими дискримінаційними можливостями. З огляду на широку представленість у рослинних геномах повторюваних послідовностей різних класів зручними та перспективними маркерними системами для їх генетичної типізації є такі, що дозволяють отримувати полілокусні ампліфікаційні спектри анонімної геномної ДНК, фланкованої інвертованими повторюваними послідовностями. Зокрема, для сортування гібридного та вихідного селекційного матеріалу яблуні було проведено оцінку IRAP-маркерів (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) [5], отриманих з використанням праймерів до консервативних ділянок LTR-вмісних (Long Terminal Repeat) ретротранспозонів різних субкласів [2].

Матеріали та методи. Як вихідний матеріал були використані пагони сортів яблуні, помологічну ідентичність яких було підтверджено. Ці пагони відібрані у колекційному саду селекційно-технологічного відділу Інституту садівництва НААН України. ДНК виділяли з молодого листа за стандартною методикою із застосуванням гексадецилтриметил амоніум броміду (ЦТАБ) [3].

Для проведення IRAP-ПЛР було використано такі праймери до довгих кінцевих повторів (LTRs) ретротранспозонів: соєвого SIRE-1 з нуклеотидною послідовністю 5'-GCA CTT ATG CAA GTG GGA TCA GC-3' та яблуневого Malus TRIM - відповідно 5'- AGCTCCCAAAGGCCTCGTGC-3'.

Кінцевий об'єм реакційної суміші складав 25 мкл. Вона містила 10mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, 2,0 mM хлориду магнію (MgCl₂), 2 mM кожного дезокси-нуклеотид-трифосфату (dNTP), 0,2 мкМ праймера, 1 од. акт. Тақ ДНК полімерази та 100-120 нг геномної ДНК. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за таким температурним режимом: 95°C - 2 хв. і наступні 35 циклів : 94°C - 30 сек., 58°C (для Malus TRIM 55°) - 30 сек., 72°C - 2 хв. Кінцевий синтез 72°C - 7 хв.

Продукти ампліфікації геномної ДНК аналізували за допомогою електрофорезу у 2,0 %-му агарозному гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію у трис-ацетатному буфері при напрузі електричного поля 2 В/см протягом 7-8 годин. Результати електрофорезу опрацьовували за допомогою пакету програмного забезпечення TotalLab v2.01. При цьому кожен ампліфікаційний фрагмент, який є анонімною геномною послідовністю, фланкованою інвертованими консервативними ділянками ретротранспозонів 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 фрагменту розцінювали як рецесивний алель відповідного локусу. Розрахунки генетичних відстаней, коефіцієнтів спорідненості та дискримінаційних характеристик отриманих молекулярно-генетичних IRAP-маркерів виконували з використанням програмного пакету PopGen.32.

Результати і обговорення. У процесі досліджень було оцінено дискримінаційні можливості для генетичного профілювання геномів сортів та гібридних форм яблуні маркерів, отриманих методом IRAP-ПЛР, з праймерами, підібраними до довгих кінцевих повторів соєвого ретротранспозону SIRE-1 і до яблуневого ретротранспозону Malus TRIM, на довгих кінцевих ділянках якого знаходяться високо консервативні послідовності 5S РНК та РНК- полімерази III.

Для 16 проаналізованих генотипів за використання праймеру до соєвого ретротранспозону SIRE-1 було виявлено 25 продуктів ампліфікації, з яких 85% виявилися поліморфними (рис. 1), а для праймеру до Malus TRIM ретротранспозону – відповідно 18 продуктів, рівень поліморфізму яких склав 100% (рис. 2).

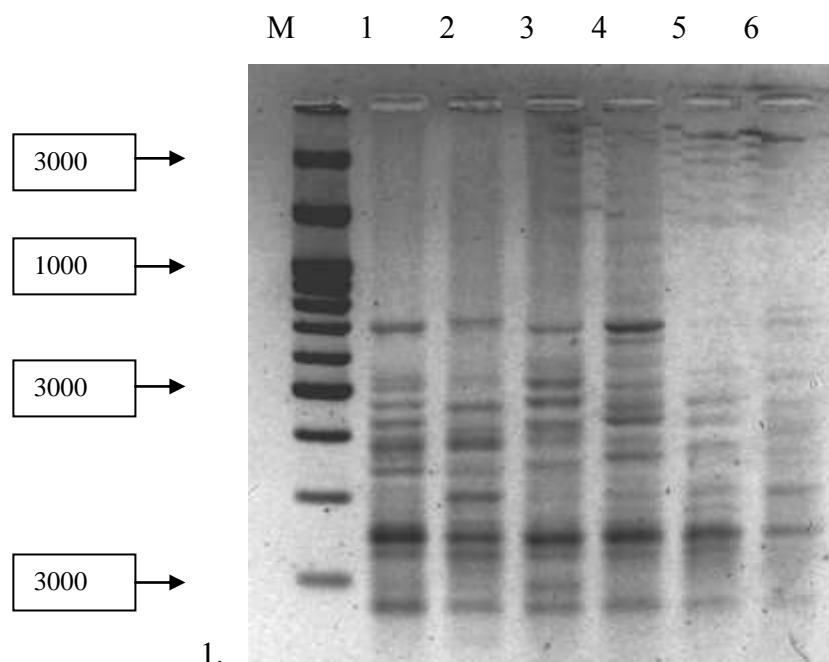


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гібридних форм яблуні з праймером до SIRE-1 елементів: М – маркер молекулярних ваг СібЕнзім 100 bp +1.5 kb +3kb, 1 -- Вертикаль, 2 - 16-100-182, 3 - 16-100-165, 4 - 16-101-176, 5 - 16-100-142, 6 – Айдаред

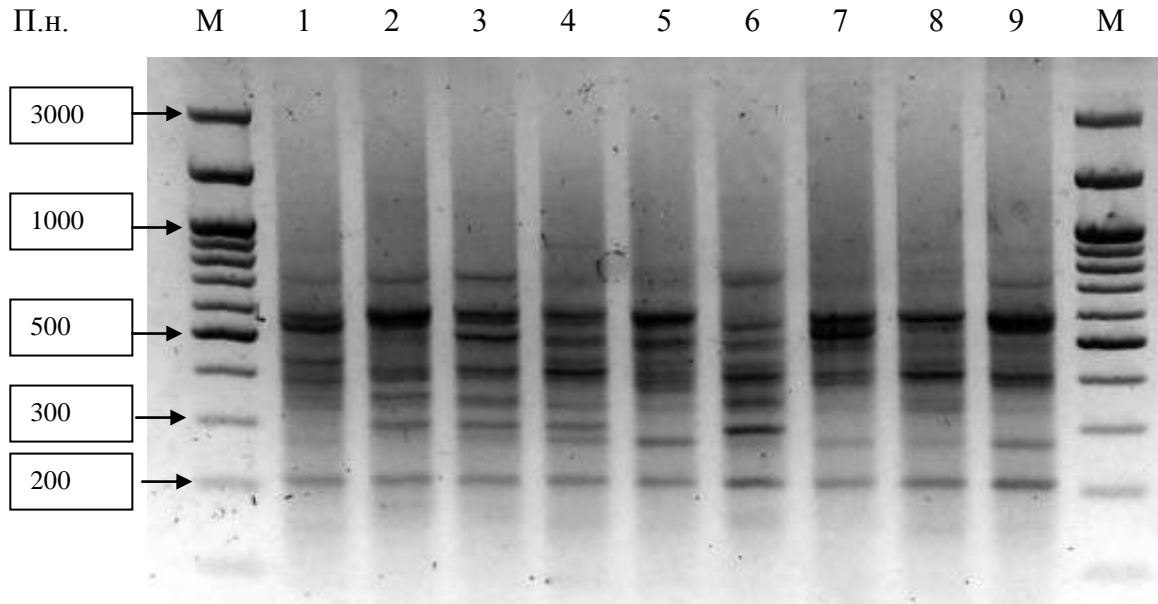


Рис 2. Спектр ампліфікації ДНК гібридних форм яблуні з праймером до Malus TRIM елементів: М – маркер молекулярних мас, 1 – 16-100-182 , 2- Вертикаль, 3-16-101-176, 4 – 16-100-142, 5- Мекінтош Важек, 6 – Антей, 7 – 16 – 100 – 135, 8 – 16 – 100 – 155, 9 - Айдаред

Обидві маркерні системи продемонстрували досить високий рівень інформативності, зважаючи на обчислені дискримінаційні показники (табл.1).

На основі різниці між генотипами сортів і гібридних форм яблуні, виявленої з використанням IRAP-маркерів, фланкованих послідовностями соєвого та яблуневого ретротранспозонів відповідно SIRE-1 і Malus TRIM, було визначено міру генетичної спорідненості і генетичні дистанції Нея [7]. Кластерний аналіз на їх основі, проведений методом UPGMA, дозволив побудувати дві дендрограми, кожна з яких мала по два основні кластери (рис. 3, 4).

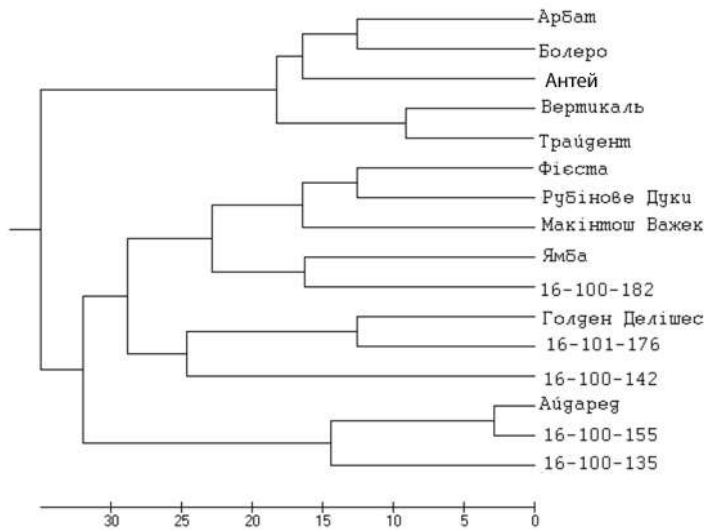


Рис. 3. Дендрограма філогенетичних зв'язків між досліджуваними генотипами яблуні, побудована з використанням IRAP-маркерів, фланкованих ділянками яблуневого ретротранспозону Malus TRIM

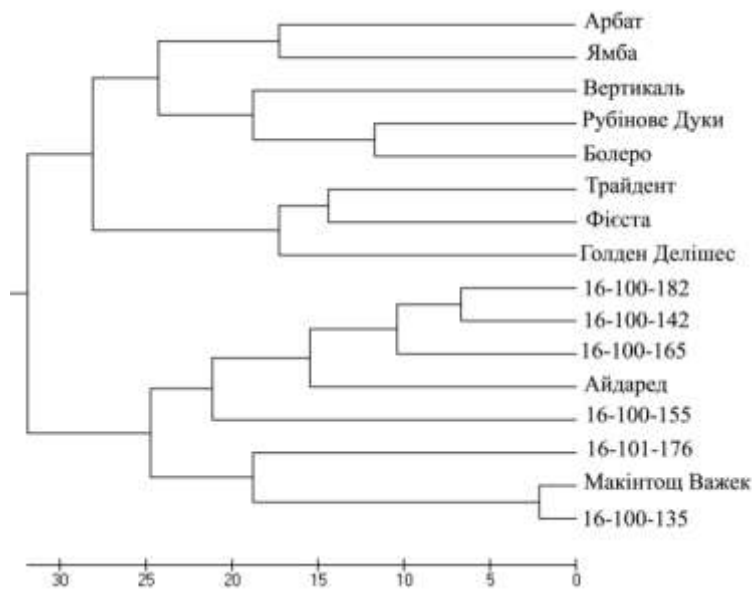


Рис. 4. Дендрограма філогенетичних зв'язків між досліджуваними генотипами яблуні, побудована з використанням IRAP-маркерів, фланкованих ділянками соєвого ретротранспозону SIRE-1

Для дендрограми, отриманої на основі використання IRAP-маркерів, фланкованих ділянками яблуневого ретротранспозону, перший кластер виявився моногенним за ознакою колоновидного габітусу. Зокрема, всі генотипи, які увійшли в нього, несуть домінантні алелі гену колоновидності. Другий кластер вказаної дендрограми та обидва кластери дендрограми, побудованої на базі використання маркерів, фланкованих соєвим ретротранспозоном, є досить

гетерогенними: до них увійшли як гібридні форми з ознакою колоновидності, так і сорти різного генетичного походження, контрастні за комплексом господарськоцінних ознак, у тому числі за наявністю домінантних генів колоновидності і стійкості проти парші.

Виконано також консенсусний (узагальнюючий) аналіз рівня генетичної спорідненості сортів і гібридів яблуні, залучених у схеми схрещування на отримання форм з колоновидною формою габітуса та резистентністю до парші яблуні з використанням усіх виявлених IRAP-маркерів. Усі три системи генетичного профілювання не різняться достовірно за показниками частоти та ефективної кількості алелів (табл.1).

Коефіцієнт інформативності Шеннона також свідчить про те, що інформативність усіх трьох систем співставна. Водночас показники актуальної та очікуваної гетерозиготності вказують на вищий розмах гетерозиготності у перевірених сортів та гібридних форм яблуні за маркерами, фланкованими консервативними ділянками соєвого ретротранспозону. Зокрема, від 39,16 до 49,8% таких маркерів знаходяться у гетерозиготному стані проти 40,8-41,8% маркерів, фланкованих консервативними ділянками *Malus TRIM* ретротранспозону, можливо тому, що на відповідні локуси меншою мірою впливає штучний добір. Крім того, *Ty1/Copia* - елементи, до яких належить соєвий ретротранспозон, у геномі яблуні представлені високогетерогенним сімейством ретроелементів [9].

1 . Дискримінаційні характеристики виявлених IRAP-маркерів

Показник	Malus TRIM	SIRE-1	Консенсусний аналіз
Коефіцієнт Шеннона	0.5928	0,5690	0,5757
Частота алелів (n_a)	2,00±0,000	1,958±0,2041	1,976±0.1543
Ефективна кількість алелів (n_e)	1.7275± 0.2401	1,6992±0,2807	1,6992 ± 0.2568
Середня актуальна гетерозиготність ($H_{e_{ob}}$)	0.4080	0,3916	0,3951
Середня очікувана гетерозиготність ($H_{e_{ex}}$)	0,418	0,498	0,409
Маркерний індекс (MI)	3,67	4,47	4,10

Кореляційний аналіз між коефіцієнтами спорідненості та генетичними відстанями, на основі яких було побудовано дендрограми (рис.1, 2), показав, що ці маркерні системи є взаємодоповнюючими. Адже коефіцієнти кореляції свідчать про дуже низьку гомологію

коефіцієнтів спорідненості ($\text{corr}=0,256$ $P=0,005$) і про відсутність гомології між генетичними відстаням ($\text{corr}=0,054$ $P=0,678$).

Консенсусний аналіз, проведений за всіма виявленими IRAP-маркерами, дозволив отримати узагальнюючу дендрограму (рис. 5), у відповідності з якою уточнено позиції майже всіх гібридних форм та сортів. Ця дендрограма включає також два гетерогенні кластери. Найбільш генетично віддаленою від решти гібридів та сортів виявилася форма 16-100-155.

Низький рівень кореляції між коефіцієнтами спорідненості та відсутність кореляції між генетичними відстанями, обчисленими з використанням двох маркерних систем для проаналізованих генотипів, очевидно, є наслідком різних геномної локалізації виявлених маркерів і копійності відповідних ретроелементів в геномі яблуні. Зокрема, відомо, що переважна більшість *Ty1/Copia*- елементів інтегрує у прицентромірні гетерохроматинові ділянки рослинних геномів [2]. Мініатюрні ретроелементи субкласу TRIM (terminal repeat retrotransposon in miniature), до яких належить ретротранспозон *Malus* TRIM, локалізовані, головним чином, у багатих на ТА і ТАА ділянках рослинних геномів. Ці мобільні елементи є важливим фактором утворення алельного різноманіття, оскільки локалізовані поблизу активних генів. Вони також можуть бути складовими частинами промоторів та інтронів [1, 4, 10].

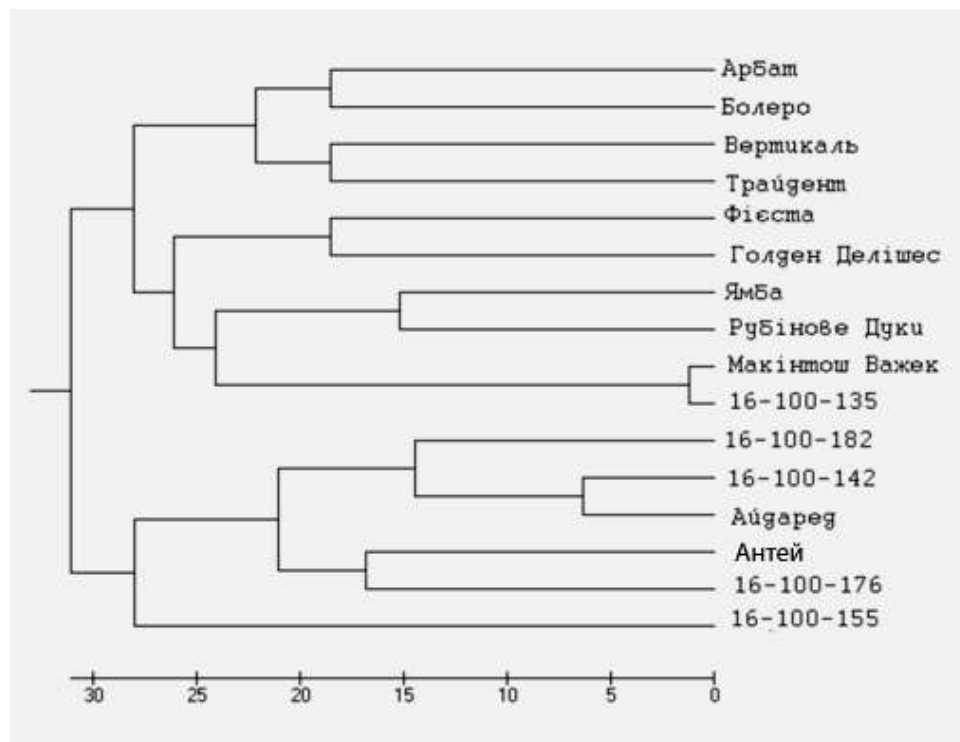


Рис. 5. Консенсусна дендрограма філогенетичних зв'язків між досліджуваними генотипами яблуні, побудована з використанням усіх IRAP-маркерів

Обидва ретротранспозони належать до класу LTR-вмісних геномних мобільних елементів, але якщо *Malus TRIM* є не автономний, тобто такий, що не може розповсюджуватися по геному самостійно [4], то *SIRE-1* належить до субкласу мобільних елементів *Pseudoviridae*, відомого також як субклас *Ty1/Copia*- елементів [6]. Вони здатні самостійно розповсюджуватися і є особливо активними та еволюційно молодими в геномах як одно-, так і дводольних рослин. Консервативні послідовності ретроелементу *SIRE-1* мають високий рівень гомології з консервативними послідовностями інших представників субкласу *Ty1/Copia*- елементів [2, 8], що обумовлює перспективність їх використання як цільових ділянок для підбору праймерів для генетичного типування геномів різних рослин, у тому числі й яблуні, в якій на LTR-вмісні мобільні елементи припадає 40% геномних послідовностей [9].

Висновки. Наші дослідження показали, що IRAP-маркери, фланковані консервативними ділянками LTR-вмісних ретротранспозонів *SIRE-1* та *Malus TRIM* відзначаються високими дискримінаційними характеристиками для генетичного профілювання сортів і гібридних форм яблуні.

Коефіцієнти спорідненості і генетичні відстані між проаналізованими генотипами, визначені з використанням двох різних класів IRAP-маркерів, характеризуються низьким рівнем гомології.

При сортуванні генетичного матеріалу яблуні доцільно проводити консенсусний аналіз із залученням різних класів IRAP-маркерів.

Список використаної літератури

1. Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A. H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports // *Theor Appl Genet.* – 2006. – №104. – P.704-714.
2. Du J., Tian Z., Hans CS., Laten HM., Cannon SB., Jackson SA., Shoemaker RC., Ma J. Evolutionary conservation, diversity and specificity of LTR-retrotransposons in flowering plants: insights from genome-wide analysis and multi-specific comparison // *Plant J.*- 2010. - №63(4). – P.584-598.
3. 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. - P.1349.
4. Kalendar R., Tanskanen J., Chang W., Antonius K., Sela H., Peleg O., Schulman A.H. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // *PNAS* . – 2008. - №105(15). – P.5833–5838.
5. Kalendar R., Schulman A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols.* - 2006. – №5.- P. 2478-2484.
6. Laten HM. Phylogenetic evidence for Ty1-copia-like endogenous retroviruses in plant genomes // *Genetica.*- 1999. - №107(1-3). – P. 87-93.
7. Nei M. *Molecular population genetics and evolution.* - Amsterdam: North-Holland Publ.Comp, 1975. - 360p.
8. Pearce SR. *SIRE-1, a putative plant retrovirus is closely related to a legume TY1-copia retrotransposon family* // *Cell Mol Biol Lett.*- 2007. - №12(1). – P. 120-126.

9. Sun HY., Dai HY., Zhao GL., Ma Y., Ou CQ., Li H., Li LG., Zhang ZH. Genome-wide characterization of long terminal repeat -retrotransposons in apple reveals the differences in heterogeneity and copy number between Ty1-copia and Ty3-gypsy retrotransposons // *J Integr Plant Biol.* – 2008. - №50(9). – P.1130-1139.
10. Witte CP., Le QH., Bureau T., Kumar A. Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. - №98. – P. 13778 – 13783.

Одержано редколегією 07.04.12