

ПРИМЕНЕНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА RawS5 В КАЧЕСТВЕ ДНК-МАРКЕРА ПРИ
ГЕНОТИПИРОВАНИИ СОРТООБРАЗЦОВ АБРИКОСА ОБЫКНОВЕННОГО (*PRUNUS*
ARMENIACA L.) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВНИИСПК

Е.В. Безлепкина , к.б.н.

А.А. Гуляева, к.с.-х.н.

А.А. Галькова, м.н.с.

*ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район,
д. Жилина, ВНИИСПК, bezlepkina@vniispk.ru*

Аннотация

ДНК паспортизация сорта – это метод точной идентификации сорта на основе ДНК полиморфизма. ДНК паспортизация сорта является основанием для защиты авторских прав селекционеров, контроля качества продукции. Помимо этого, анализ ДНК полиморфизма позволяет оценить генетическое разнообразие коллекции, степень филогенетического родства между сортообразцами, а, следовательно, является высокотехнологичным методом селекции, способствует подбору родительских пар для гибридизации. ДНК-маркеры на основе ретротранспозонов являются одним из наиболее успешно используемых инструментов генотипирования ДНК сельскохозяйственных растений. Преимуществом ретротранспозонов семейства R173 является равномерное распределение по геному и численная представленность в геноме – на гаплоидный геном ржи их насчитывают около 15 000 копий. В данной работе представлены результаты анализа ДНК полиморфизма маркера ретротранспозона семейства R173 RawS5 у сортообразцов абрикоса обыкновенного отечественной селекции, а также двух сортообразцов селекции США и Украины. Был проведен анализ электрофореграмм RawS5 34 сортообразцов абрикоса обыкновенного, полученных из разных селекционных центров. По результатам для каждого сортообразца был получен уникальный электрофоретический профиль. На электрофореграммах были отмечены как повторяющиеся практически у всех образцов фрагменты (визуализированные продукты ПЦР близкого размера), так и редко встречающиеся, и уникальные. Были выделены сортообразцы обладающие наиболее уникальными электрофоретическими профилями – сорт Графиня и гибриды №4 Байкалова, №8 Байкалова, №9 Байкалова, 2-23 Байкалова, 3-2 Байкалова, 6-25 Байкалова. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности использования маркера на основе нуклеотидной последовательности ретротранспозона RawS5 для ДНК-типирования сортообразцов абрикоса.

Ключевые слова: ДНК-маркирование генома, паспортизация сортов, ретротранспозоны, RawS5, семейство R173, абрикос обыкновенный, коллекция генетических ресурсов

THE PAWS5 RETROTRANSPOSON BASED GENOTYPING OF APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L.) VARIETIES FROM COLLECTION OF THE RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF FRUIT CROP BREEDING (VNIISPK)

E.V. Bezlepkina , cand. biol. sci.

A.A. Guliaeva, cand. agr. sci.

A.A. Galkova, postgraduate student

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, bezlepkina@vniispk.ru

Abstract

DNA passport creation is a method of varieties identification on the basis of DNA polymorphism. DNA passport of variety may be foundation for copyright protection of plant breeders' rights, product quality control. Moreover, analysis of DNA polymorphism allows evaluate the genetic diversity of collection, the degree of phylogenetic relationships between varieties, is a high-technology method of breeding contributes to the selection of the parent varieties for hybridization. Retrotransposon based DNA markers are one of the more successfully used instruments for DNA genotyping of agricultural plants. The advantage of R173 retrotransposon family are in the high copy number (about 15 000 copies per diploid rye genome) and its dispersion over the entire length of all chromosomes. This study presents the results of the DNA polymorphisms analysis of PawS5 retrotransposon (belongs R173 retrotransposon family) marker of apricot varieties of domestic selection (excepting two varieties form USA and Ukraine). Gel electrophoresis analysis of 34 varieties from different breeding centers was done. By results no one repeated gel electrophoresis profile was identified. As bands (visualized PCR products of close size) presented almost in all samples, as rare and unique bands were detected. Varieties with more unique gel electrophoresis profile were identified. It was variety Grafinia and hybrids №4 Baykalova, №8 Baykalova, №9 Baykalova, 2-23 Baykalova, 3-2 Baykalova, 6-25 Baykalova. Received data shows high efficiency of PawS5 retrotransposon marker for DNA typing of apricot varieties.

Key words: DNA labeling of genome, varieties certification, retrotransposons, PawS5, R173 family, apricot, collection of genetic resources

Введение

Ретротранспозоны – мобильные элементы генома по структуре и механизму транспозиции сходные с ретровирусами. Подобно ретровирусам они используют обратную транскриптазу для синтеза ДНК, которая затем может быть встроена в геном. Ретротранспозоны широко представлены в геномах эукариот. Доля в геноме некоторых растений может составлять более 40%. (Жимулев, 2007).

Для картирования генома имеет значение как представленность последовательности в геноме, так и равномерность распределения по хромосомам.

В 1991 г. Guidet с коллегами выделили семейство умеренно повторяющихся последовательностей ржи – семейство ретротранспозонов R173 (identified in Rye with rAW173). Размер ретротранспозонов семейства R173 варьирует от 3 до 5 тпн. Они относительно равномерно распределены по геному в количестве около 15000 копий на

гаплоидный геном ржи как отдельные единицы, не собранные в tandemные повторы (Guidet et al., 1991; Rogowsky et al., 1991; Rogowsky et al., 1992a).

Благодаря такой организации в геноме их стали рассматривать как потенциально перспективный инструмент для ДНК картирования и были разработаны праймеры, как к фланкирующим ретротранспозоны последовательностям, так и к терминальным последовательностям (Rogowsky et al., 1992b).

Разработанная система праймеров была успешно использована для полилокусного генотипирования не только у растений, но и пород сельскохозяйственных животных (Глазко и др., 2012; Елькина и др., 2013; Бирюкова и др., 2006). У косточковых культур данный подход был применен для молекулярно-генетической идентификации сортов сливы, гибридной алычи, черешни и вишни (Романова, Высоцкий, 2007; Джигадло и др., 2010; Прудников, Джигадло, 2012).

В данной работе представлены результаты генотипирования ДНК сортов и сортообразцов абрикоса обыкновенного на основе полиморфизма маркера ретротранспозона RawS5. Было проанализировано 34 сортообразца абрикоса преимущественно отечественной селекции. Все полученные электрофоретические профили отличались между собой. Были выявлены как повторяющиеся фрагменты (визуализированные продукты ПЦР близкого размера), так и редко встречающиеся, и уникальные. Полученные данные ДНК типирования свидетельствуют об информативности данного подхода для ДНК паспортизации абрикоса обыкновенного.

Материалы и методика исследований

Объектом исследования стали сортообразцы абрикоса обыкновенного из коллекции лаборатории селекции и сортоизучения косточковых культур ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур г. Орёл.

Сорта: Кунач, Орловчанин (селекции ВНИИСПК, г. Орёл), Иноходец, Графиня, Лель (Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина, г. Москва), Амур, Хабаровский (Дальневосточный НИИСХ, Хабаровский край, с. Восточное), Восточный Саян (НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисовенко, г. Барнаул), Золотая косточка, Челябинский ранний (Южно-Уральский НИИ садоводства и картофелеводства, г. Челябинск), Полесский урожайный (Украинский НИИ садоводства), Десертный (Воронежский ГАУ, г. Воронеж), Альфред (США), Ульянихинский (автор Л.М. Ульянихин), Восточно-сибирский (автор И.Л. Байкалов).

А также 19 гибридов абрикоса полученных Байкаловым И.Л., Еремеевой Т.В. и Макаровым М.В.

Выделение ДНК проводили из молодых листьев, согласно протоколу, Porebski S., разработанному для выделения ДНК из растительной ткани с высоким содержанием полисахаридов и фенольных соединений (Porebski et al., 1997) с небольшими модификациями. Использовали 2×СТАВ (Cetyl trimethyl ammonium bromide) буфер, содержащий 2% PVP (polyvinylpyrrolidone) и 1% β-меркаптоэтанола с последующей 2-х кратной очисткой смесью хлороформа с изоамиловым спиртом (24V:1V) и осаждением холодным (+4°C) изопропиловым спиртом.

В качестве матрицы для реакции ПЦР брали 100 нг геномной ДНК. Реакцию амплификации проводили с праймером RawS5 (5'-AACGAGGGGTTTCGAGGCC-3') при температуре отжига 53°C, элонгации в течение 1 минуты, 40 циклах амплификации. Использовали набор реактивов для ПЦР «PCR biokom mix» (Биоком).

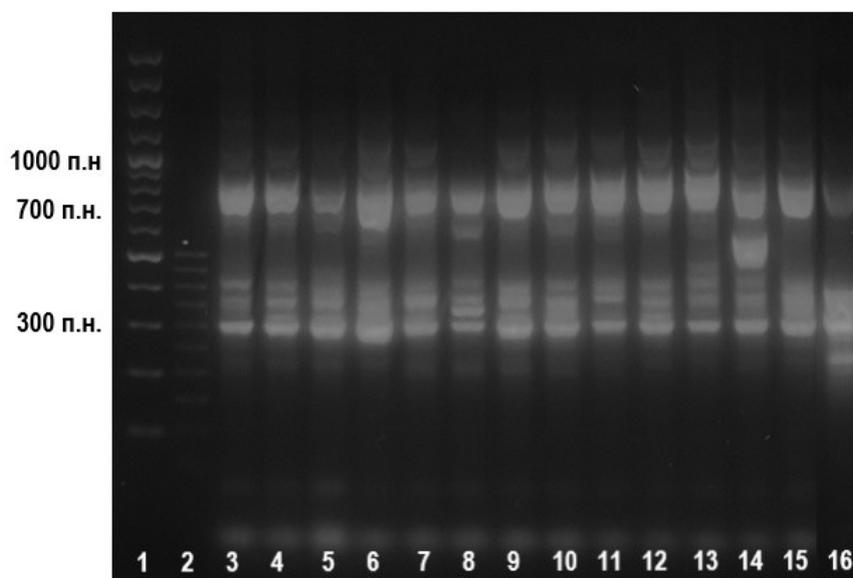
Разделение продуктов амплификации проводили электрофорезом в 1,5% агарозном геле в 0,5×ТАЕ буфере. Для определения размера продуктов ПЦР использовали маркеры

молекулярного веса GeneRuler 100 bp PlusDNA ladder (Thermo Scientific) и Gene Pak DNA Ladder M50 (Изоген).

Результаты и их обсуждение

Использование ДНК-маркеров на основе ретротраспозонов семейства R173 для ДНК-типирования сортообразцов является довольно широко применяемым и зарекомендовавшим себя подходом.

Размер продуктов амплификации определяли визуально, используя для сравнения два маркера молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific) и GenePak DNA Ladder M50 (Изоген). Размер и шаг ДНК фрагментов данных маркеров полностью перекрывает весь диапазон размеров, образующихся ПЦР продуктов (рисунок 1).



1 – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific),
2 – маркер молекулярного веса GenePak DNA Ladder M50 (Изоген), 3-16 сорта: 3 – Кунач,
4 – Амурский, 5 – Альфред, 6 – Восточно-Саянский, 7 – Восточно-Сибирский, 8 – Иноходец,
9 – Крупный Еремеевой, 10 – Орловчанин, 11 – Осенний Макарова, 12 – Хабаровский,
13 – Десертный, 14 – Лель, 15 – Самый лучший Еремеевой, 16 – Сладкоплодный
Еремеевой.

Рисунок 1 – Разделение продуктов амплификации с праймером PwS5 электрофорезом в 1,5% агарозном геле

При анализе электрофореграмм были выделены повторяющиеся, редко встречающиеся и уникальные фрагменты (визуализированные продукты ПЦР близкого размера), а также мажорные (интенсивно окрашенные на геле) и минорные (слабо окрашенные на геле) фрагменты. Учитывая природу ДНК маркера фрагменты представляют собой набор продуктов ПЦР близкого размера, поэтому размер продуктов далее по тексту указан приблизительно, на основе визуализации в геле. Однако такой тип анализа полностью удовлетворяет поставленным задачам по ДНК типированию образцов.

У всех генотипов в электрофореграмме присутствовал мажорный фрагмент размером около 300 п.н. (пар нуклеотидов).

Фрагмент присутствующий у большинства генотипов и как правило мажорный – около 730 п.н., отсутствует только у сортообразцов Графиня, Сладкоплодный Еремеевой и гибрида абрикоса 6-25 Байкалова.

Встречающиеся у большинства образцов фрагменты: около 220 п.н., 370 п.н., 420 п.н., 650 п.н.

Часто встречающиеся: около 270 п.н., 600 п.н., 800 п.н., 1000 п.н., 1100 п.н.

Редко встречающиеся: около 200 п.н., 320 п.н., 340 п.н., 400 п.н., 450 п.н., 500 п.н., 600 п.н., 1200 п.н.

Уникальные: около 330 п.н. (мажорный, у сорта Иноходец); около 350 п.н. (мажорный, у гибридов абрикоса №8 Байкалова, №4 Байкалова, 3-2 Байкалова); около 1700 п.н. (мажорный, у гибридов абрикоса №9 Байкалова, 2-23 Байкалова, 3-2 Байкалова).

При анализе полученных электрофореграмм не было выявлено ни одного повторяющегося профиля.

По полученным ДНК профилям выделяется группа гибридов абрикоса Байкалова. Уникальные фрагменты размером около 350 п.н. и 1700 п.н. встречаются только у данной группы. У гибрида абрикоса 6-25 Байкалова отсутствует фрагмент размером 730 п.н., присутствующий в электрофореграммах почти всех образцов. Полученные данные могут быть связаны с уникальным происхождением данных гибридов.

Также сильно отличается электрофоретический профиль у сорта Графиня селекции Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина. Профиль состоит всего из четырех фрагментов, один из которых уникальный и не встречается ни у одного из проанализированных образцов, а фрагмент размером около 730 п.н., присутствующий у большинства образцов, в профиле сорта Графиня отсутствует.

Выводы

Полученные данные электрофоретических профилей RawS5 свидетельствуют об информативности метода для ДНК-типирования сортообразцов абрикоса обыкновенного. По результатам анализа электрофореграмм были выделены сортообразцы, обладающие наиболее уникальными электрофоретическими профилями – это группа гибридов Байкалова (№4 Байкалова, №8 Байкалова, №9 Байкалова, 2-23 Байкалова, 3-2 Байкалова, 6-25 Байкалова) и сорт абрикоса Графиня, что может быть связано с их уникальным, по сравнению с остальными проанализированными сортообразцами, происхождением.

Литература

1. Бирюкова В.А., Зайцев В.С., Хавкин Э.Е., Хромова Л.М. Генотипирование сортов картофеля на основе анализа полиморфизма умеренных повторов // Вопросы картофелеводства. М.: ВНИИКС, 2006. С. 54-62.
2. Глазко В.И., Елькина М.А., Глазко Т.Т. Гомологичные нуклеотидные последовательности фланга ретротранспозона RawS5 из семейства R173 в геномах животных и растений // Сельскохозяйственная биология. 2012. №4. С. 36-41. DOI: <https://www.doi.org/10.15389/agrobiology.2012.4.36rus>
3. Джигадло Е.Н., Javier P., Olechko-Lutkova С. Оценка генетического полиморфизма сортов и гибридов вишни и черешни с помощью ДНК-маркеров (методические рекомендации). Орёл: ВНИИСПК, 2010. 34 с.
4. Елькина М.А., Пыльнев В.В., Сеферова И.В., Глазко В.И. LTR-ретротранспозоны в геномах растений // Известия ТСХА. 2013. № 2. С. 179-182.
5. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие для вузов / под ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьева. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007. С.131-142.

6. Прудников П.С., Джигадло Е.Н. Генетический анализ косточковых культур на примере сортообразцов вишни // Селекция, генетика и сортовая агротехника плодовых культур. Орёл: ВНИИСПК, 2012. С. 120-123.
7. Романова О.В., Высоцкий В.А. Методика молекулярно-генетической идентификации сортов косточковых культур. М.: ГНУ ВСТИСП, 2007. 70 с.
8. Guidet F., Rogowsky P.M., Taylor C., Song W., Langridge P. Cloning and characterization of a new rye-specific repetitive sequence. // *Genome*. 1991. N 34. P 81-87. <https://doi.org/10.1139/g91-014>
9. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997. Vol. 15, N 1. P. 8-15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
10. Rogowsky P.M., Manning S., Liu J.Y., Langridge P. The R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences: a structural analysis. // *Genome*. 1991. Vol. 34, N1. P. 88-95. <https://doi.org/10.1139/g91-015>
11. Rogowsky P.M., Liu J.-Y., Manning S., Taylor C., Langridge P. Structural heterogeneity in the R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences. // *Plant Molecular Biology*. 1992a. Vol. 20, N1. P. 95-102. <https://doi.org/10.1007/BF00029152>
12. Rogowsky P.M., Shepherd K.W., & Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. // *Genome*. 1992b. Vol. 35, N 4. P. 621-626. <https://doi.org/10.1139/g92-093>

References

1. Biryukova, V.A., Zaitsev, V.S., Khavkin, E.E., Khromova, L.M. (2006). Genotyping of potato varieties on the base of moderate repetitive sequences polymorphism. *Questions of potato growing*. (pp. 54-62). Moscow: VNIKH. (In Russian).
2. Glazko, V.I., Elkina, M.A., & Glazko, T.T. (2012). Homologous nucleotide sequences of the flank of retrotransposon PawS5 of R173 family in animal and plant genomes. *Agricultural biology*, 4, 36-41. <https://www.doi.org/10.15389/agrobiolgy.2012.4.36eng>
3. Dzhigadlo, E.N., Javier, P., & Olechko-Lutkova, C. (2010). Evaluation of genetic polymorphism of varieties and hybrids of cherry and sweet cherry using DNA markers (methodical recommendations). Orel: VNIISPK. (In Russian).
4. Yelkina, M.A., Pylnev, V.V., Sepherova, I.V., & Glazko, V.I. (2013). LTR-retrotransposons in genomes of plants. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*, 2, 179-182. (In Russian, English abstract).
5. Zhimulev, I.F. (2007). *General and molecular genetics: textbook for higher educational institution*. (pp. 131-142) Novosibirsk: Siberian University publishing house. (In Russian).
6. Prudnikov, P.S., & Dzhigadlo, E.N. (2012). Genetic analysis of stone crops on an example of cherry varieties. In: *Selection, genetics and variety agrotechnics of fruit crops*. (pp. 120-123). Orel: VNIISPK. (In Russian).
7. Romanova, O.V., & Vysotskiy, V.A. (2007). *Method of molecular-genetic identification of varieties of stone cultures*. Moscow: VTISP. (In Russian, English abstract).
8. Guidet, F., Rogowsky, P.M., Taylor, C., Song, W., & Langridge, P. (1991). Cloning and characterization of a new rye-specific repetitive sequence. *Genome*, 34(1), 81-87. <https://doi.org/10.1139/g91-014>
9. Porebski, S., Bailey, L.G., & Baum, B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 8-15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>

10. Rogowsky, P.M., Manning, S., Liu, J.-Y., & Langridge, P. (1991). The R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences: a structural analysis. *Genome*, 34(1), 88-95. <https://doi.org/10.1139/g91-015>
11. Rogowsky, P.M., Liu, J.-Y., Manning, S., Taylor, C., & Langridge, P. (1992a). Structural heterogeneity in the R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, 20(1), 95-102. <https://doi.org/10.1007/BF00029152>
12. Rogowsky, P.M., Shepherd, K.W., & Langridge, P. (1992b). Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome*, 35(4), 621-626. <https://doi.org/10.1139/g92-093>