

УДК 577.213.3:575.174.015.3: 575.224.22:630\*165:634.232

## АЛЕЛЬНИЙ СТАН ГЕНА *PavCNR12* У СОРТІВ ЧЕРЕШНІ (*PRUNUS AVIUM* L.) УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Я. І. ІВАНОВИЧ<sup>1</sup>, Р. А. ВОЛКОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут садівництва НААН України  
Україна, 03027, Київ-27, с. Новосілки, вул. Садова, 23  
e-mail: ivanovych.yar@gmail.com

<sup>2</sup> Кафедра молекулярної генетики та біотехнології  
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2  
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

**Мета.** Протягом останніх десятиріч українські селекціонери створили велику кількість сортів черешні. Подальший прогрес в селекції черешні потребує широкого залучення молекулярних методів. Особливо важливим є розробка методів ідентифікації генів та/чи алелів, що контролюють господарсько-цінні ознаки. Метою дослідження було розробити новий метод диференціації алелів гену *PavCNR12*, що контролює масу плодів у черешні та з'ясувати алельний стан гену *PavCNR12* в українських сортів черешні. **Методи.** Шляхом порівняння опублікованих послідовностей *PavCNR12-1*, *-2* та *-3* було виявлено одонуклеотидні поліморфізми (SNP) в промоторній ділянці. Після ПЛР-ампліфікації цієї ділянки отримані ПЛР-продукти розщеплювали ендонуклеазою рестрикції *Tail* та електрофоретично розділяли в поліакриламідному гелі. Ідентичність ПЛР-продуктів була підтверджена прямим секвенуванням. **Результати.** Запропоновано новий зручний метод ідентифікації алельних варіантів гену *PavCNR12* з використанням CAPS-маркерів. За допомогою цього методу з'ясовано алельний стан гену *PavCNR12* в 56 сортів черешні української та закордонної селекції. **Висновки.** У досліджених сортах виявлено суттєве переважання бажаного алеля *PavCNR12-1* над алелями *PavCNR12-2* та *-3*.

**Ключові слова:** українські сорти черешні, генетичний контроль розміру плодів, алелі гену *PavCNR12*, CAPS-маркери, *Prunus avium*.

**Вступ.** За наявності та використанням генетичного різноманіття культурних рослин Україна посідає одне з найперших місць у світі. Зокрема, вона входить до десятки країн, які зробили найбільший вклад у розвиток селекції черешні [1] та до десятки найбільших виробників плодів цієї культури [2]. Для подальшого цілеспрямованого розвитку селекції культурних рослин актуальною є задача широкого залучення методів молекулярної генетики [3, 4, 5]. Зокрема, вкрай важливо виявляти гени/алелі, які контролюють господарсько-цінні ознаки та розробляти методи їх ідентифікації, які зручно застосовувати у повсякденній селекційній практиці.

Морфологічно культурна і дика черешні дуже схожі, зокрема, формою плодів. Найбільш вагомою зміною, що відбулася в процесі одомашнення є збільшення розміру плодів. Діаметр плодів черешні є важливим фактором у виборі споживача та основною складовою при формуванні ціни [1]. Встановлено, що основним чинником, який впливає на діаметр та масу плодів черешні є кількість клітин мезокарпу [6, 7].

Діаметр плодів черешні є кількісною ознакою, що ускладнює її аналіз з використанням методів класичної генетики. На сьогодні відомо вісім локусів кількісних ознак (QTL, Quantitative Trait Loci), які мають адитивний вплив на масу плодів.

При цьому, найбільший інтерес представляють локалізовані в 2-й парі хромосом локуси *FW\_G2a* та *FW\_G2b* [8, 9]. В локусі *FW\_G2a* знаходиться ген *PavCNR12*, який є представником родини регуляторів кількості клітин (*FW2.2* або *CNR*, Cell Number Regulator).

Відомо три його алельні варіанти: *PavCNR12-1*, *PavCNR12-2* та *PavCNR12-3*, що мають 14 поліморфних нуклеотидів в некодуючих ділянках [8,10]. Варіації у нуклеотидній послідовності гена *PavCNR12* у черешні можуть використовуватись для пошуку гомозигот по алелю *PavCNR12-1*, оскільки такі рослини демонструють на 9–16 % більшу масу плодів. Відповідно, генотипи із алелями *PavCNR12-2* та, особливо, *PavCNR12-3* є небажаними [8]. Оскільки алель *PavCNR12-1* недостатньо закріплений в сортименті, генотипування існуючих сортів черешні по алелям *PavCNR12* має практичне значення для цілеспрямованої маркер-опосередкованої селекції.

Єдиним надійним способом визначення алельного стану гена *PavCNR12* на сьогодні є сиквенування ПЛП-продуктів, отриманих шляхом ампліфікації промоторної ділянки з використанням праймерів *CNR12-C2-F* та *-R* [8]. В цій ділянці наявні шість SNP (single nucleotide polymorphism) -сайтів, що дозволяє відрізнити всі три алелі. Недоліком є лише те, що даний метод є відносно затратним, трудомістким та мало придатним для масового використання. Відповідно, нами було виявлено нові CAPS-маркери для промоторної ділянки гена *PavCNR12* та з їх використанням визначено алельний стан 56 сортів черешні української та закордонної селекції.

#### Матеріали і методи

Рослинний матеріал сортів черешні відбирали в колекційних насадженнях Інституту садівництва НААН (ІС), Мелітопольської ДСС ІС ім. М. Ф. Сидоренка, Артемівської ДСР ІС та Інституту помології ім. Л. П. Симиренка НААН. На загал, в дослідження було включено 50 сортів української селекції та 6 — закордонної.

Загальну геномну ДНК виділяли ЦТАБ-методом [11] з деякими модифікаціями.

Для ампліфікації фрагменту гена *PavCNR12* було використано раніше опубліковані праймери *CNR12-C2-F* (5'-TTG CCA TAA ATA GAT ATC CAA AA-3') та *CNR12-C2-R* (5'-GAT TTC CAT CAG CCA TCT G-3') [8]. Реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 30–50 нг геномної ДНК, 1 × ПЛП буфер, 0,5 мкМ кожного праймера, 0,2 мМ кожного дНТФ, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub> та 0,5 ОА *Taq* ДНК полімерази (СибЭнзим, Росія). ПЛП проводили на ампліфікаторах Терцик (ДНК-Технология, Росія) та Mastercycler® personal 5332 (Eppendorf, Німеччина) за «понижуючою програмою» [12]: первинна денатурація — 90 с при 94 °С; 10 циклів, що включали 30 с при 94 °С для денатурації, 45 с при 60 °С (–0,5 °С за цикл) для гібридизації праймерів, 1 хв при 72 °С для елонгації; 25 циклів, що включали 30 с при 94 °С, 45 с при 55 °С, 1 хв при 72 °С; кінцева елонгація 5 хв при 72 °С.

Електрофоретичне розділення продуктів ПЛП здійснювали на приладі для вертикального електрофорезу PROTEAN® II xi Cell (Bio-Rad, США) в 10 % неденатуруючому (нативному) поліакриламідному гелі (ПААГ) протягом 3 год при напруженості 12–15 В/см. Після цього гель забарвлювали етидід бромідом. В якості маркера молекулярних мас використовували O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Електрофореграми продуктів ампліфікації аналізували з використанням програми (TotalLab TL120). Пряме сиквенування ПЛП-продуктів проводили на фірмі GATC Biotech (Німеччина).

#### Результати та обговорення

З метою розробки альтернативного методу ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* було проведено віртуальну ПЛП із праймерами *CNR12-C2-F* та *-R* та наступне віртуальне розщеплення ампліфікатів ендонуклеазами рестрикції (рестриктазами) з використанням SMS (The Sequence Manipulation Suite) [13]. Метою цього аналізу було виявлення рестриктаз, застосування яких дозволяє отримувати відмінний набір фрагментів для трьох відомих алелів гена *PavCNR12* (рис. 1, 2).

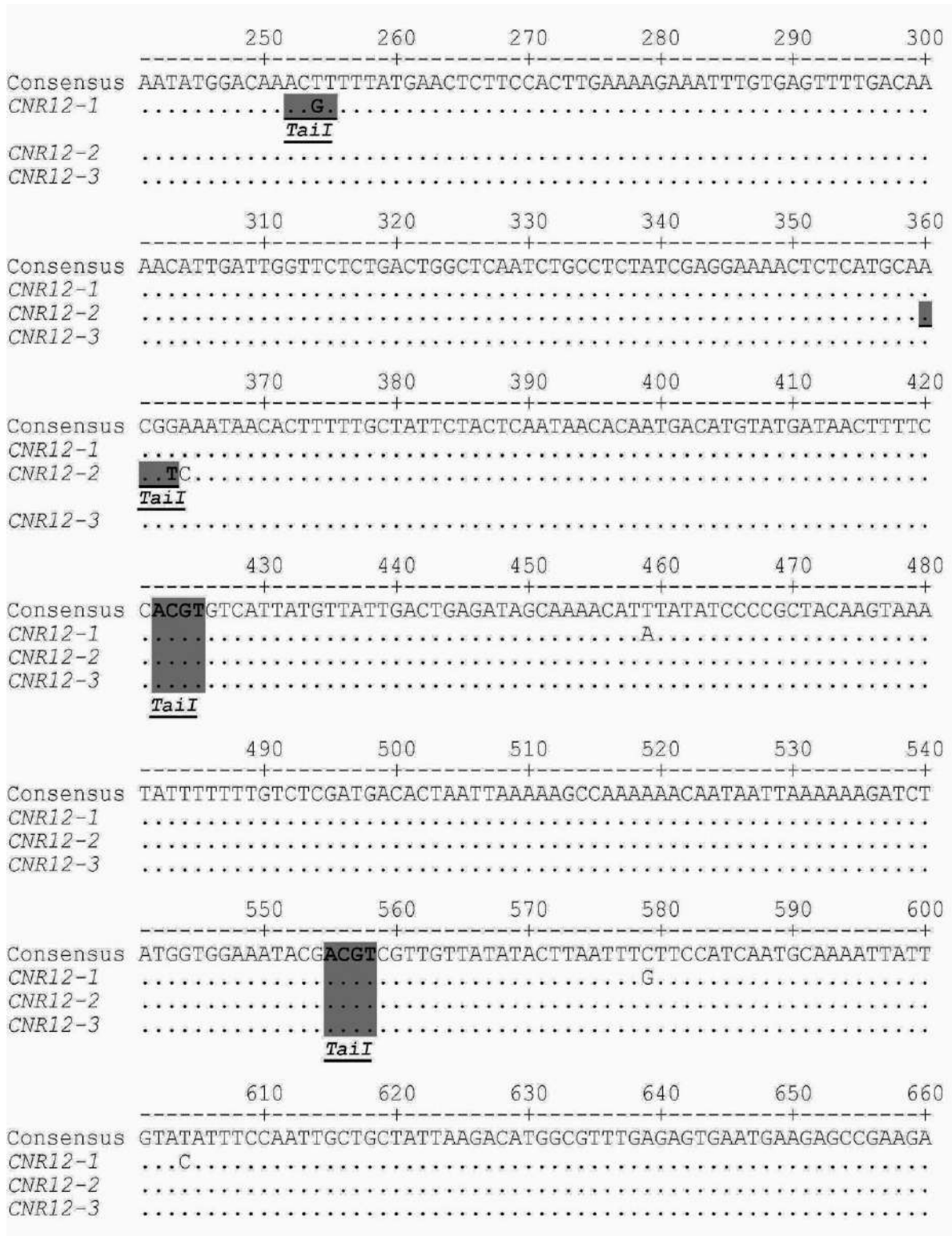
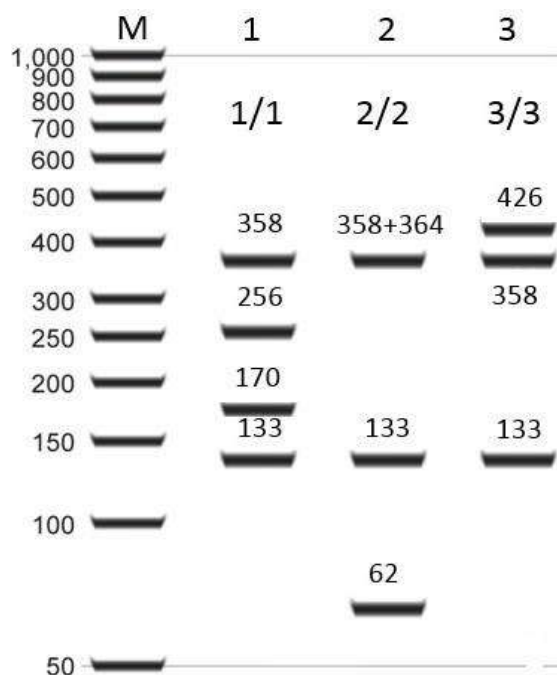


Рисунок 1. Порівняння центральної частини промоторної ділянки алелів *PavCNR12-1*, -2 та -3; вказано локалізацію сайтів візнавання рестриктази *TaiI*



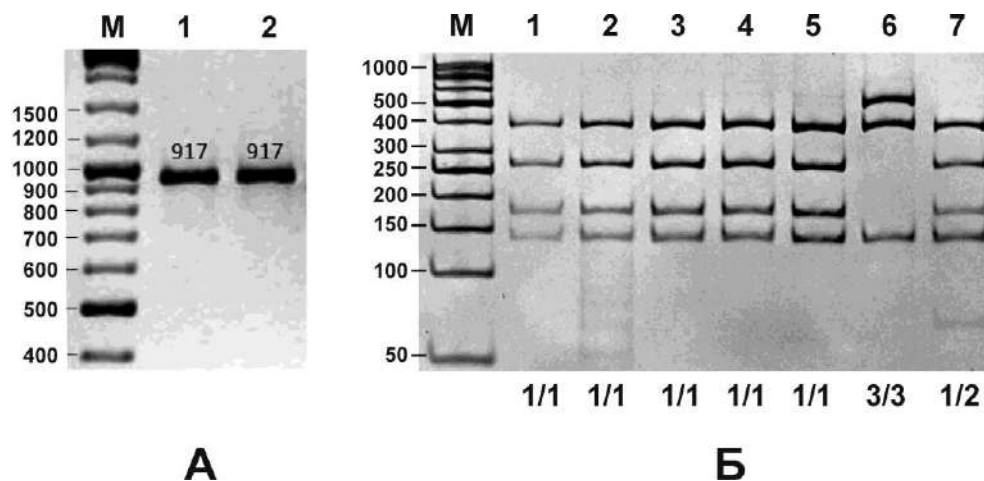
**Рисунок 2.** Очікувані набори фрагментів ДНК після обробки ПЛР-ампліфікатів рестриктазою *Tail*. Генотипи: 1 — *PavCNR12-1/1*, 2 — *PavCNR12-2/2*, 3 — *PavCNR12-3/3*; М — 50 bp DNA Ladder

За підсумками проведеного пошуку було встановлено, що очікувана довжина ПЛР-продукту має становити 917 нп. Рестриктаза *AclI* (AA↓CGTT) має лише один сайт впізнавання в першому алельному варіанті, тобто має розщеплювати ПЛР-продукт на фрагменти з очікуваними

розмірами 252 та 665 нп. При використанні *BsrGI* (T↓GTACA) для першого алельного варіанту мають утворюватись фрагменти 110/207/600 нп, а для другого та третього — 207/710 нп; при використанні *RsaI* (GT↓AC) очікувані розміри фрагментів рестрикції для першого алельного варіанту становлять 80/110/125/602 нп, а для другого та третього — 80/125/712 нп. Таким чином, застосування кожної з цих трьох рестриктаз дозволяє відрізнити алель *PavCNR12-1* від алелів *PavCNR12-2* та *PavCNR12-3*.

На противагу цьому за використання рестриктази *Tail* (ACGT↓) (або її ізошизомеру *Maell* — A↓CGT) можливо диференціювати всі три алелі: для першого з них має утворюватись набір фрагментів 133/170/256/358 нп, для другого — 62/133/358/364 нп та для третього — 133/358/426 нп (рис. 2).

На наступному етапі дослідження з використанням рестриктази *Tail* було проведено визначення алельного стану гена *PavCNR12* у 56 сортів черешні української та закордонної селекції (рис. 3; табл. 1). В якості контролю до списку досліджених форм було включено три референтні сорти закордонної селекції, генотип яких був визначений раніше: Bigarreau Hâtif Burlat (*PavCNR12-1/1*), Bigarreau Napoleon та Regina (*PavCNR12-1/2*) [8]. Було встановлено, що отримані нами для цих сортів результати повністю співпадають із оприлюдненими.



**Рисунок 3.** (А) Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймерів CNR12-C2-F та -R із геномною ДНК сортів черешні Крупноплідна (1) та Казка (2), М — GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific); (Б) Електрофореграма фрагментів ДНК, отриманих після обробки ПЛР-ампліфікатів рестриктазою *Tail*. 1 — Форма DON/1, 2 — Отрада, 3 — Аннушка, 4 — Тайна, 5 — Форма YAR/1, 6 — Форма NIJ/2, 7 — Любава, М — O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Під рисунком вказано варіанти алелів гена *PavCNR12*

Таблиця 1. Алельний стан гена *PavCNR12* у сортів черешні

	Сорт	Довжина рестриктазних фрагментів, нп	Алелі <i>PavCNR12</i>
1	Аборигенка	62/133/170/256/358+364	1/2
2	Аеліта	133/170/256/358	1/1
3	Аннушка	133/170/256/358	1/1
4	Анонс	133/170/256/358	1/1
5	Аншлаг	62/133/170/256/358+364	1/2
6	Валерія	133/170/256/358	1/1
7	Василиса прекрасна	133/170/256/358	1/1
8	Веселка	133/170/256/358	1/1
9	Дар Млієва	133/170/256/358	1/1
10	Дачниця	62/133/170/256/358+364	1/2
11	Джерело	133/170/256/358	1/1
12	Донецька рання	133/170/256/358	1/1
13	Донецький угольок	62/133/170/256/358+364	1/2
14	Дончанка	133/170/256/358	1/1
15	Електра	133/170/256/358	1/1
16	Етика	133/170/256/358	1/1
17	Єдина	62/133/170/256/358+364	1/2
18	Зодіак	133/170/256/358	1/1
19	Казка	133/170/256/358/426	1/3
20	Коралова	133/170/256/358	1/1
21	Крупноплідна	133/170/256/358	1/1
22	Ласуня	133/170/256/358/426	1/3
23	Легенда Млієва	133/170/256/358	1/1
24	Леся	133/170/256/358	1/1
25	Любава	62/133/170/256/358+364	1/2
26	Мелітопольська мирна	133/170/256/358	1/1
27	Мелітопольська чорна	133/170/256/358	1/1
28	Міраж	133/170/256/358	1/1
29	Ніжність (NIJ/3)	62/133/170/256/358+364	1/2
30	Отрада	133/170/256/358	1/1
31	Показкова	62/133/170/256/358+364	1/2
32	Престижна	133/170/256/358	1/1
33	Присадибна	133/170/256/358	1/1
34	Простір	62/133/170/256/358+364	1/2
35	Прощальна Тараненко	133/170/256/358	1/1
36	Рання розова	133/170/256/358	1/1
37	Сестрьонка (SES/2)	133/170/256/358	1/1
38	Студентка	133/170/256/358	1/1
39	Тайна	133/170/256/358	1/1
40	Талісман	133/170/256/358	1/1
41	Темпоріон	133/170/256/358	1/1
42	Форма DON/1	133/170/256/358	1/1
43	Форма DON/2	62/133/170/256/358+364	1/2
44	Форма DRO/1	133/170/256/358/426	1/3
45	Форма GEN/2	133/170/256/358	1/1
46	Форма NIJ/2	133/358/426	3/3
47	Форма REG/1	62/133/170/256/358+364	1/2
48	Форма VAL/3	133/170/256/358/426	1/3
49	Форма YAR/1	133/170/256/358	1/1
50	Форма YAR/2	62/133/170/256/358+364	1/2
51	Щедрість	133/170/256/358	1/1
52	Ювілейна мліївська	62/133/170/256/358+364	1/2

Алельний стан гена *PavCNR12* у сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції

	Сорт	Довжина рестриктазних фрагментів, нп	Алелі <i>PavCNR12</i>
53	Bigarreau Hâtif Burlat (Біарро Бурлат)	133/170/256/358	1/1
54	Bigarreau Napoleon (Наполеон рожева)	62/133/170/256/358+364	1/2
55	Regina (Регіна)	62/133/170/256/358+364	1/2
56	Saint Georges (Сент Жорж)	133/170/256/358	1/1

Примітка: Наведено довжини фрагментів ДНК, отриманих після обробки ПЛР-ампліфікатів промоторної ділянки гена *PavCNR12* рестриктазою *Tail*. Фрагменти довжиною 358 та 364 нп мають практично однакову рухливість у ПААГ.

Для додаткової перевірки надійності розробленого нами методу генотипування, отримані дані було підтверджено методом прямого сиквенування ПЛР-ампліфікатів промоторної ділянки гена *PavCNR12*. Для цього було обрано три зразки черешні: Крупноплідна, Ласуня та форма NIJ/2, які відрізняються алельним станом цього гена (див. табл. 1). Порівняння отриманих послідовностей із вже відомими алельними варіантами гена *PavCNR12-1* (Асс. No KC139086), *PavCNR12-2* (KC139087) та *PavCNR12-3* (KC139088) повністю підтвердило наші результати щодо стану *PavCNR12*-алелів, отримані із використанням нових CAPS-маркерів. Отже, розроблений нами метод дозволяє швидко та надійно проводити іден-

тифікацію алельних варіантів *PavCNR12-1*, -2 та -3 без використання затратної та трудомісткої процедури сиквенування. Отримані CAPS-маркери є кодомінантними та дозволяють чітко відрізнити гомо- та гетерозиготні форми.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що майже всі (55 з 56) досліджені сорти черешні є носіями алеля *PavCNR12-1*. При цьому 36 сортів (64 % від загальної кількості) є гомозиготними по цьому алелю, 15 сортів мають генотип *CNR12-1/2*, а 4 — генотип *CNR12-1/3*. Отже, розмір плодів у 36 % сортів міг би бути додатково збільшений за умови введення у геном алеля *PavCNR12-1* та/або переведення його у гомозиготний стан.

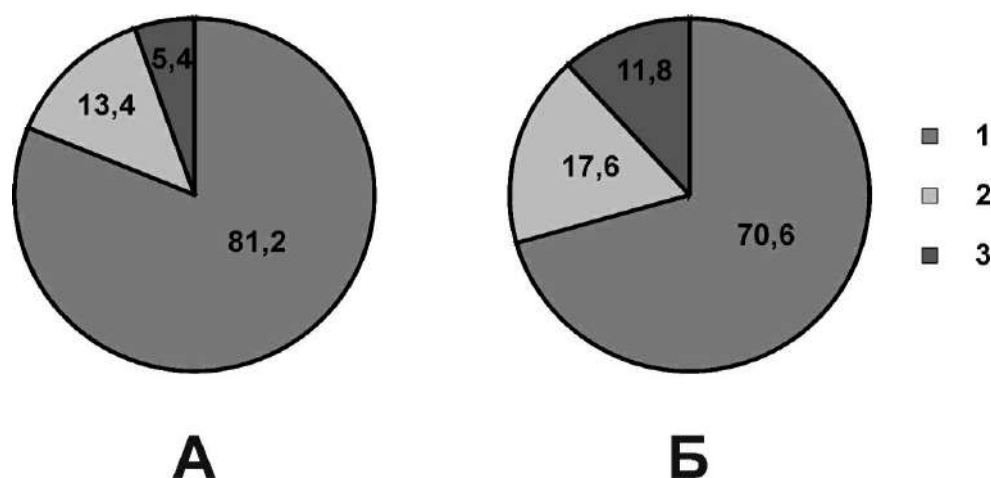


Рисунок 4. Частоти зустрічальності алелів *PavCNR12-1* (1), -2 (2) та -3 (3) у сортів черешні у нашому дослідженні (А: 56 форм) та згідно De Franceschi et al., 2013 (Б: 17 форм)

Розрахунок показує, що частоти алелів *PavCNR12-1*, -2 та -3 у нашій виборці становлять 81,2, 13,4 та 5,4 %, відповідно (рис. 4). Висока частота алеля *PavCNR12-1* (70,6 %) у культурних форм черешні спостерігалась і у попередніх дослідженнях [8]. Цікаво, що у нашій виборці частота зустрічальності бажаного алеля *PavCNR12-1* вище, а небажаних алелів *PavCNR12-2* та -3, відповідно, нижче, ніж повідомлялось раніше [8]. Враховуючи, що наша вибірка складається пере-

важно з українських сортів, цю різницю можна розглядати як приклад високого рівня селекції черешні в Україні.

#### Висновки

Запропоновано новий швидкий та надійний метод ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* із застосуванням CAPS-маркерів, які є кодомінантними та дозволяють відрізнити гомо- та гетерозиготні форми. З використанням цього

методу встановлено алельний стан гена *PavCNR12* у 56 сортів черешні української та закордонної селекції та виявлено суттєве переважання частоти алеля *PavCNR12-1* над алелями -2 та -3.

### Подяка

Автори хочуть висловити подяку Н. В. Тряпціній, В. М. Удовиченко та К. М. Удовиченко за їх допомогу у реалізації цього дослідження, конструктивну критику та участь у обговоренні результатів.

### Перелік літератури

1. *Sansavini S., Lugli S.* Sweet cherry breeding programs in Europe and Asia // *Acta Hort.* — 2008. — Vol. 795. — P. 41–58.
2. FAOSTAT database collections. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Access date: 2016-10-25. URL: <http://faostat3.fao.org/>
3. *Ivanovych Ya. I., Udovychenko K. M., Bublyk M. O., Volkov R. A.* ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars // *Cytology and Genetics.* — 2017. — Vol. 51 (1). — P. 40–47.
4. *Landjeva S., Ganeva G., Korzun V., Palejev D., Chebotar S., Kudrjavitsev A.* Genetic diversity of old bread wheat germplasm from the Black Sea region evaluated by microsatellites and agronomic traits // *Plant Gen. Res.* — 2015. — Vol. 13. — P. 119–130.
5. *Hemleben V., Kovarik A., Torres-Ruiz R. A., Volkov R. A., Beridze T.* Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids // *Systematics and Biodiversity.* — 2007. — Vol. 5 (3). — P. 277–289.
6. *Olmstead J. W., Iezzoni A. F., Whiting M. D.* Genotypic differences in sweet cherry fruit size are primarily a function of cell number // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* — 2007. — Vol. 132, № 5. — P. 697–703.
7. *Zhang G., Sebolt A. M., Sooriyapathirana S. S., Wang D., Marco CAM Bink., Olmstead J. W., Iezzoni A. F.* Fruit size QTL analysis of an F<sub>1</sub> population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry // *Genetics and Genomes.* — 2010. — Vol. 6. — P. 25–36.
8. *De Franceschi P., Stegmeir T., Cabrera A., van der Knaap E., Rosyara U. R., Sebolt A. M., Dondini L., Dirlwanger E., Quero-Garcia J., Campoy J. A., Iezzoni A. F.* Cell number regulator genes in *Prunus* provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry // *Mol. Breeding.* — 2013. — Vol. 32, № 2. — P. 311–326.
9. *Rosyara U. R., Bink M. C. A. M., Weg E., Zhang G., Wang D., Sebolt A., Dirlwanger E., Quero-Garcia J., Schuster M., Iezzoni A. F.* Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry // *Mol. Breeding.* — 2013. — Vol. 32, № 4. — P. 875–887.
10. *Campoy J. A., Le Dantec L., Barreneche T., Dirlwanger E., Quero-Garcia J.* New insights into fruit firmness and weight control in sweet cherry // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 2015. — Vol. 33, № 4. — P. 783–796.
11. *Doyle J. J., Doyle J. L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* — 1987. — Vol. 19. — P. 11–15.
12. *Clarke J. B., Tobutt K. R.* Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* «Napoleon» // *Mol. Ecol. Notes.* — 2003. — Vol. 3. — P. 578–580.
13. *Stothard P.* The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences // *Biotechniques.* — 2000. — Vol. 28. — P. 1102–1104.

Представлено В. М. Мельником  
Надійшла 15.05.2017

### ALLELIC STATUS OF *PavCNR12* GENE IN UKRAINIAN SWEET CHERRY (*PRUNUS AVIUM* L.) CULTIVARS

Ya. I. Ivanovych<sup>1</sup>, R. A. Volkov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Horticulture NAAS  
Ukraine, 03027, Kyiv-27, Novosilky, Sadova str., 23  
e-mail: ivanovych.yar@gmail.com

<sup>2</sup> Dept. of Molecular Genetics and Biotechnology  
Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi  
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str., 2  
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

**Aim.** In recent decades, Ukrainian breeders have created a large number of sweet cherry cultivars. Further progress in the breeding of sweet cherry requires a broad involvement of molecular methods. Especially important is the development of methods for the identification of genes / alleles that control economically valuable traits. The goal of the study was to develop a new method for discrimination of alleles of the *PavCNR12* gene, which controls the fruit size in sweet cherry, and to reveal the allelic status of *PavCNR12* in Ukrainian sweet cherry cultivars. **Methods.** The SNP-polymorphisms in the promoter regions of the *PavCNR12-1*, -2 and -3 alleles was detected applying comparison of published sequences. PCR amplification of the region was conducted, the obtained PCR products were cut by *TalI* restriction endonuclease and separated by electrophoresis in a polyacrylamide gel. The identity of PCR products was confirmed by direct sequencing. **Results.** A new convenient method for the identification of allelic variants of the *PavCNR12* gene using CAPS-markers is proposed. Using the method the allelic status of *PavCNR12* in 56 sweet cherry cultivars of Ukrainian and foreign breeding was elucidated. **Conclusions.** A significant prevalence of the desirable allele *PavCNR12-1* over the alleles *PavCNR12-2* and -3 was found among the studied cultivars.

**Key words:** Ukrainian sweet cherry cultivars, genetic control of fruit size, alleles of *PavCNR12* gene, CAPS-markers, *Prunus avium*.