

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДНК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ И ГИБРИДОВ F₁ СОИ

Рамазанова С.А., канд. биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
масличных культур имени В.С. Пустовойта», г. Краснодар

Наиболее удобными для идентификации генотипов в настоящее время являются молекулярно-генетические маркеры, то есть маркеры на основе макромолекул: запасные белки, изоферменты и полиморфные фрагменты ДНК. Они в меньшей мере подвержены фенотипической изменчивости, чем морфологические маркеры и, в большинстве случаев, имеют кодоминантное наследование. На их основе проводится биохимическая паспортизация многих сельскохозяйственных культур. Эти данные можно использовать при регистрации сортов и гибридов, а так же для защиты прав селекционеров.

Микросателлиты (SSRs) представляют собой простые, наиболее доступные, удобные и относительно недорогие маркеры, пригодные для идентификации генотипов [1, 2]. Они позволяют дифференцировать особи, отличающиеся друг от друга небольшим количеством генов, что не всегда заметно фенотипически.

Микросателлитные маркеры, при условии кодоминантного наследования, позволяют легко выявлять гибриды в скрещиваниях, особенно это актуально при скрещивании родительских форм, не отличающихся по морфологическим признакам (3,4). В селекции сои, например, при искусственной гибридизации, необходимо контролировать образование гибридов. В настоящее время селекционеры могут вовлекать в скрещивания только родительские формы, различающиеся по морфологическим маркерам, которые хорошо определяются визуально, и их проявление не зависит от условий окружающей среды. Это, как правило, маркеры, определяющие качественные признаки: окраску различных частей растений, размер побегов, устойчивость к вредителям и болезням и так далее. Причем, контроль над процессом гибридизации можно осуществлять, только если в гибридной комбинации материнская форма обладает рецессивным признаком, а отцовская – доминантным.

Анализ микросателлитных последовательностей ДНК дает возможность селекционерам вовлекать в скрещивания генотипы, не отличающиеся по морфологическим признакам и при этом осуществлять контроль над процессом гибридизации на ранних стадиях развития растений F₁.

Целью наших исследований явилось изучение молекулярно-генетического полиморфизма микросателлитных локусов и создание на этой основе системы маркеров, пригодной для идентификации и паспортизации сортов и гибридов F₁ сои.

Материалы и методы

В работе использованы 52 сорта сои (*G.max*) разных стран и 12 гибридных комбинаций. Для исследования были выбраны 9 пар микросателлитных

праймеров: Satt1, Satt 2, Satt5, Satt9, Soypr 1, Soygy 2, Sat 1, Sat 36, Soyhsp176.

ДНК выделяли из фрагментов зеленых листьев 5-10 растений. Выделение проводили по модифицированному методу [5].

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащем: 67 мМ трис- HCl, pH8.8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5-3 мМ MgCl₂; 0.01% Tween 20; по 0.2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 единицу рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Москва, ГОСНИИГЕНЕТИКА). Амплификацию проводили в приборе Терцик (ДНК-технология, Россия). Подробно температурные режимы для каждого праймера опубликованы ранее (6). Концентрацию ДНК определяли по интенсивности окрашивания ее бромистым этидием в 1% агарозном геле.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2% агароза, 1x TAE-буфер). Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Результаты

Результаты амплификации ДНК 52 сортов сои показали, что из девяти изученных SSR-локусов все оказались полиаллельными. Всего в этой группе генотипов было выявлено 29 аллелей. Число аллелей на локус варьировало от 1 до 5, что в среднем составило 3,2. У локуса Satt9 было выявлено максимальное количество аллелей – пять, у трех локусов Satt1, Satt5 и Sat1 – по четыре, у двух локусов Soyhsp176 и Soygy 2 – по три и у трех локусов Satt 2, Soypr1, и Sat36 – по два аллеля.

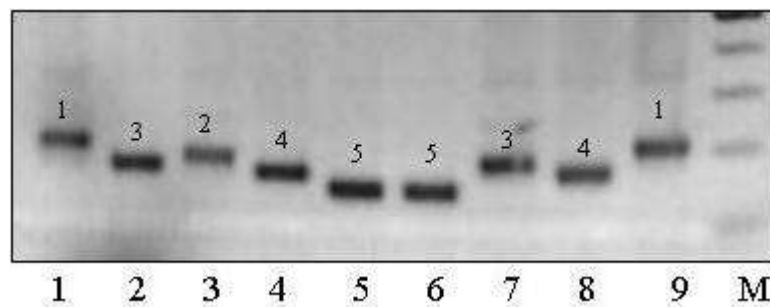


Рис. 1. Фореграмма продуктов амплификации ДНК сортов сои по локусу Satt9. Дорожки 1-9 фрагменты ДНК сортов, М – маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder

Аллели SSR-локусов представлены на фореграммах фрагментами ДНК разного молекулярного веса (длины пар нуклеотидов). На рисунке 1 показаны фореграммы результатов амплификации ДНК некоторых сортов по локусу Satt9. Нумерацию аллелей по каждому локусу проводили следующим образом: фрагмент ДНК с максимальным значением молекулярного веса обозначали цифрой 1 (дорожки 1, 9) и далее по мере уменьшения молекулярного веса цифрами 2 (дорожка 3), 3 (дорожки 2, 7), 4 (дорожки 4, 8) и 5 (дорожки 5, 6).

Для всех сортов сои получены уникальные наборы аллелей. Различия наблюдались по одному и более локусам. К примеру, сорта селекции ВНИИМК Лань, Валента, Рента, РВБ и Лакта, отличаются друг от друга по одному локусу Satt9. В группе сортов разных селекционеров по одному локусу отличаются

Safi-Abad 1 (Иран) и Юг-30 (Украина) (локус Sat1), Алдана (Польша) и К-11641 (ВИР) (локус Soygy2).

Таблица

Формулы генотипов сои

Сорт	Формула*
Лань (ВНИИМК)	A ₂ B ₂ C ₂ D ₁ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Ли́ра (-/-)	A ₁ B ₁ C ₁ D ₃ E ₂ F ₁ G ₂ H ₂ I ₂
Фора (-/-)	A ₂ B ₁ C ₂ D ₂ E ₁ F ₄ G ₁ H ₃ I ₂
Валента (-/-)	A ₃ B ₂ C ₂ D ₄ E ₁ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
Дельта (-/-)	A ₃ B ₂ C ₂ D ₅ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Парма (-/-)	A ₃ B ₁ C ₁ D ₄ E ₂ F ₂ G ₂ H ₂ I ₂
Рента (-/-)	A ₃ B ₂ C ₂ D ₂ E ₁ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
РВБ (-/-)	A ₃ B ₂ C ₂ D ₃ E ₁ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
РВФ (-/-)	A ₂ B ₂ C ₂ D ₂ E ₁ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
Веста (-/-)	A ₂ B ₁ C ₃ D ₃ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Вилана (-/-)	A ₃ A ₄ B ₂ C ₂ D ₁ E ₁ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
Лакта (-/-)	A ₂ B ₂ C ₂ D ₂ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Ника (-/-)	A ₂ B ₂ C ₂ D ₁ E ₂ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Дива (-/-)	A ₂ B ₂ C ₁ D ₅ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Диана (-/-)	A ₂ B ₁ C ₂ D ₂ E ₃ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
Памела (-/-)	A ₃ B ₁ C ₂ D ₃ E ₁ F ₄ G ₂ H ₃ I ₂
Д-6 (-/-)	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃ E ₂ F ₁ G ₂ H ₂ I ₂
Д-4 (-/-)	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃ E ₂ F ₂ G ₂ H ₂ I ₂
Альба (-/-)	A ₂ B ₂ C ₂ D ₃ E ₂ F ₄ G ₂ H ₃ I ₂
Трембита (-/-)	A ₃ B ₂ C ₄ D ₃ E ₂ F ₃ G ₂ H ₂ I ₂
Лиана (-/-)	A ₃ B ₂ C ₄ D ₂ E ₂ F ₂ G ₂ H ₂ I ₂
Лада (-/-)	A ₃ B ₂ C ₃ D ₄ E ₂ F ₂ G ₂ H ₂ I ₂
Б-2 (-/-)	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Ланцетная (Россия, Орел)	A ₂ B ₂ C ₁ D ₂ E ₂ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
Сибниисхоз 6 (Россия, Омск)	A ₁ B ₂ C ₃ D ₁ E ₂ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂
Приморская 56 (Россия, Приморский край) Бла-	A ₁ B ₁ C ₄ D ₃ D ₅ E ₁ F ₂ G ₂ H ₃ I ₂
Селекта 301 (Россия, Краснодар)	A ₄ B ₂ C ₂ D ₁ E ₁ F ₁ G ₂ H ₃ I ₂

* *Примечание: код локуса A-Satt1; B-Satt2; C-Satt5; D-Satt9; E-Soypr1; F- Sat1; G-Sat36; H-Soyhsp176, I-Soygy2.*

Для каждого сорта на основании полученного набора аллелей микросателлитных локусов были составлены молекулярно-генетические паспорта или, так называемые, «генетические формулы генотипов». Большими буквами латинского алфавита был обозначен код локуса, а нижний индекс – аллельное состояние данного локуса. В качестве примера в таблице представлены молекулярно-генетические формулы сортов сои российских селекционеров.

В результате проведенной работы было установлено, что дискриминационный потенциал изученной маркерной системы достаточно высокий для того, чтобы использовать ее для идентификации и паспортизации сортов культурной сои. Были идентифицированы 52 сорта, в том числе 24 сорта селекции ВНИИМК, для каждого из них были получены уникальные наборы аллелей. На основании полученных данных об аллельном разнообразии изученных микроса-

теллитных локусов разработаны молекулярно-генетические формулы, которые предложено использовать как соответствующие паспорта для идентификации и сертификации сортов сои.

Для выявления наследования микросателлитных локусов у гибридов сои F₁, были выбраны 12 гибридных комбинаций, отличающихся друг от друга размером аллелей: Б-2 х К-10641; Дуар х Вилана; Юг-30 х Ника; Юг-30 х Вилана; Алдана х Т-215; Дуар х Ника; Shimabara wase х РВФ; РВФ х Ланцетная; Вилана х Валента; Офелия х РВБ; Дива х РВФ; РВБ х К-10641; Ника х Sepideh.

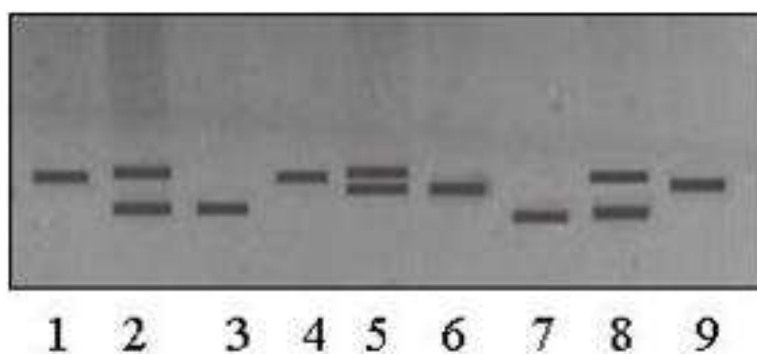


Рис. 2. Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК сортов и гибридов сои по локусу Satt9. Дорожки: 1 – Вилана; 2 – F₁ (Вилана х Валента); 3 – Валента; 4 – Офелия; 5 – F₁ (Офелия х РВБ); 6 – РВБ; 7 – Дива; 8 – F₁ (Дива х РВФ); 9 – РВФ

Результаты наших исследований показали, что 3 локуса Satt1, Satt9 и Soypr1 наследуются кодоминантно. На рисунке 2, представлены полученные спектры амплифицированной ДНК родительских форм и их гибридов F₁. У всех гибридов присутствуют по две фракции ДНК материнская и отцовская.

На рисунке 3 показаны продукты амплификации ДНК родительских форм и трех гибридных растений по локусу Satt9. На дорожке 2 видны две фракции ДНК материнская и отцовская, на дорожках 3 и 4 только одна – материнская. Следовательно, из трех растений гибридным является только одно.

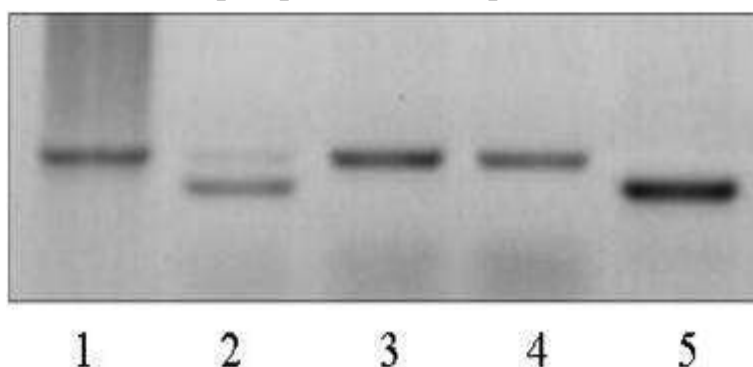


Рис. 3. Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК сортов и гибридов сои по локусу SATT9. Дорожки: 1 – Ника; 2, 3, 4 – F₁ (Ника х Sepideh); 5 – Sepideh

Таким образом, полученные спектры амплифицированной ДНК родительских форм и гибридов F₁ сои показали, что три локуса Satt1, Satt9 и Soypr1 имеют кодоминантное наследование. У всех гибридов присутствуют как отцовская, так и материнская фракции ДНК. Благодаря проведенным исследова-

ниям, мы можем предложить селекционерам еще один метод идентификации гибридов сои.

Литература

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Научно-методическое руководство // Под. ред. Сиволапа Ю.М. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156с.
2. Сулимова Г.Е. ДНК- маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // 2004, [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.labsgi.by.ru>
3. Трёмбак Е.Н. Естественная гибридизация сои как метод создания исходного материала для селекции: Автореф. дисс. канд. биол. наук: 06.01.05. / ВНИИМК. – Краснодар, 2001. – 25с.
4. Выделение гибридных растений сои по генетическим метчикам при искусственных скрещиваниях и спонтанном опылении / Методические указания // Ю.П. Мякушко, Н.Д. Лунин, Л. М. Лыгина, А.В. Кочегура. – М., 1979. – 15 с.
5. Saghai–Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS USA. – 1984. – 81. – P. 8014-8018.
6. Рамазанова С. А., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Полиморфизм микросателлитных локусов ДНК сортов сои селекции ВНИИМК.// Сб. докл. межд. научно-практ. конф. «Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника» посвященной 120-летию со дня рождения академика В.С. Пустовойта» ВНИИМК, Краснодар, Россия, 19-22 июля 2006. – С.234-239.