

ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТТЕЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*) ХАРЬКОВСКОЙ И МИРОВОЙ СЕЛЕКЦИИ

*С. С. Китаёва, аспирант**

*В. В. Кириченко, доктор сельскохозяйственных наук
Л. Н. Чернобай, кандидат сельскохозяйственных наук
Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН*

Проведена оценка генетического разнообразия 66 инбредных линий кукурузы харьковской и мировой селекции с использованием микросаттелитной маркерной системы. Было исследовано 19 локусов и идентифицировано наличие 54 аллелей. Полиморфизм по всем локусам в среднем составил 46 %. Было установлено наличие гетерозиготных локусов у 13,6 % линий. Показана возможность использования SSR маркерной системы для контроля качества перевода линий на стерильную основу (М-типа) и создания аналогов восстановления фертильности.

Zea mays L., инбредные линии, полиморфизм, микросаттелитный анализ.

Удельный вес кукурузы в зерновом балансе мира и Украины прогрессивно возрастает. Это связано, прежде всего, с успехами селекции, что обеспечивает производство высокоурожайными, адаптивными, технологичными гибридами. Рынок селекционных разработок гибридной кукурузы является динамичным и требует поиска новых и совершенствования традиционных схем селекции и семеноводства. Значительные надежды на повышение интенсивности и результативности селекционного процесса связывают с использованием современных молекулярно-генетических методов [1, 2]. Но узким местом при этом остается гармоничное взаимосогласованное сочетание традиционных методов с методами биотехнологии и молекулярной генетики. Последние способны предоставить селекционеру ценную информацию об исходном материале, расширить оценочную базу, улучшить контроль качества семеноводства.

Основой селекционных программ по кукурузе является подбор родительских компонентов, обеспечивающих высокий уровень гетерозиса. Длительной селекционной практикой создана эмпирическая концепция гетерозисных групп, связанная с представлениями о более высокой вероятности получения высокогетерозисных гибридов при скрещивании неродственных линий. Генетическое разнообразие и неродственность

* Научный руководитель – доктор сельскохозяйственных наук, академик НААН В. В. Кириченко.

образцов обусловлена степенью мутационных и рекомбинационных преобразований генома, поэтому вполне логичны попытки определения этого показателя по полиморфизму именно молекулы ДНК [3, 5, 6].

Перспективность такого подхода показана в многочисленных работах зарубежных и отечественных исследователей. Пионерами этого направления в Украине являются специалисты коллектива Одесского селекционно-генетического института под руководством академика Ю. М. Сиволапа [1, 2].

Цель исследований – изучить генетические разнообразия инбредных линий кукурузы отечественной и мировой селекции с использованием микросателлитной маркерной системы.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в 2011 г. в Институте растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН. В качестве материала для исследований были использовано 66 инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) из рабочей коллекции лаборатории селекции и семеноводства кукурузы института.

Выделение ДНК проводили цетавлонным методом из смеси 6–10 зрелых семян кукурузы каждого образца. Амплификацию проводили согласно Р. М. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston и других [4]. Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия, с использованием трис-ЭДТА-боратной буферной системы (рН 8,3).

В работе было использовано 19 SSR праймеров: UMC 1703, UMC 2047, Phi090, Phi053, Phi10228, Phi072, Phi093, Phi113, Phi 048, Phi 452693, Phi078, UMC 1545, Phi 114, UMC 1304, Phi 015, Phi 22, Phi 32, Phi 041, UMC 1344. Праймеры были отобраны по литературным данным [5, 7–10]. Основным критерием отбора было наличие полиморфизма при использовании этих праймеров на другом материале. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли с помощью трансиллюминатора TCP–20 MC с последующим фотографированием гелей с использованием красного светофильтра. Как маркер для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали 50 M DNA ladder. Вычисление молекулярной массы продуктов амплификации проводили с помощью программного пакета "TotalLab TL 120".

По результатам анализа были составлены бинарные матрицы по каждому локусу, в которых указывалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме.

Вычисляли среднее количество аллелей (A), эффективное количество аллелей (A_e), наблюдаемую гетерозиготность (H_o) и ожидаемую гетерозиготность (H_e) [10].

Кластеризацию и построение дендрограмм проводили методом Варда с помощью пакета программ Statistica 6.0 на основании матрицы генетических дистанций, рассчитанных по Nei, Lee и матрицы частот аллельных вариантов.

Результаты исследования и их анализ. Одна пара праймеров для флангов позволяет рассматривать полиморфизм только одного локуса. Нами было исследовано 19 локусов, охватывающих все 10 хромосом (по 2 локуса на каждую хромосому, только во 2-й хромосоме – 1 локус). Аллельные варианты микросателлитных локусов оценивались как продукты

амплификации различной длины (разное количество повторов) при использовании пары праймеров к его флангам. Всего было определено наличие 54 аллелей. Для каждого SSR локуса количество аллелей колебалось от 2 до 4, что в среднем составляет 5,28 % на каждый локус и свидетельствует о высоком разнообразии инбредных линий харьковской селекции. Полиморфизм по всем локусам в среднем составил 46 %. Молекулярный вес ампликонов варьировал от 45 до 298 пар нуклеотидов (табл. 1).

Частота эффективных аллелей (A_e) в среднем составила 2,05 и колебалась от 1,39 до 4,25. Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e) для всей выборки линий составила 0,54. Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) колебалась от 0,044 до 0,103. Самым полиморфным по данному параметру был локус phi022 (табл. 1).

1. Характеристики SSR локусов, исследованных в работе

Локус	Локализация в геноме, хромосома	РІС	A (среднее количество аллелей)	Вес ампликонов, п. н.	A_e (частота эффективных аллелей)	H_e , ожидаемая гетерозиготность	H_o , наблюдаемая гетерозиготность
UMC 1703	1,05	0,584	3	122-146	1,52	0,665	0
UMC 2047	1,09	0,399	3	73-132	1,94	0,520	0
Phi 090	2,08	0,518	3	122-151	1,71	0,590	0
Phi 053	3,05	0,401	3	152-189	2,31	0,520	0,080
Phi 10228	3,06	0,650	4	127-154	1,42	0,708	0
Phi 072	4,01	0,586	3	193-161	1,52	0,666	0
Phi 093	4,08	0,434	3	280-298	2,02	0,499	0
Phi 113	5,03	0,442	3	85-272	2,51	0,502	0,103
Phi 048	5,07	0,654	4	160-183	1,42	0,712	0
Phi 452693	6,04	0,208	2	131-142	4,25	0,237	0
Phi 078	6,05	0,441	3	116-158	1,86	0,542	0
UMC 1545	7	0,669	4	45-77	1,39	0,730	0
Phi 114	7,03	0,374	2	138-171	2,16	0,503	0,017
UMC 1304	8,02	0,349	2	127-135	2,22	0,455	0
Phi 015	8,08	0,530	3	64-123	1,65	0,611	0
Phi 22	9,03	0,282	2	137-170	3,38	0,344	0,044
Phi 32	9,04	0,373	2	225-238	2,02	0,502	0
Phi 041	10	0,540	3	188-207	1,65	0,620	0
UMC 1344	10,07	0,364	2	91-100	2,09	0,483	0

Для некоторых образцов была констатирована гетерозиготность по локусам Phi022, Phi053, Phi113 и Phi114. Наибольшее количество гетерозиготных образцов было выявлено при использовании праймера phi053 – это образцы UKY 14, UKY 17, UKY 20 и Харьковская 155. Образцы UKY 26, Харьковская 233 были гетерозиготны по двум локусам (табл. 2).

2. Список образцов, у которых наблюдалась гетерозиготность по некоторым локусам

Праймер	Локализация в геноме, хромосома	Образцы
Phi022	9	UKY 17, UKY 43
Phi053	3	UKY14, UKY17, UKY20, Харьковская 155 Харьковская 233,
Phi113	5	Харьковская 242, ГК 26 ЗМ
Phi114	7	UKY 26, Харьковская 233

Дендрограмма, построенная методом Варда по матрице генетических расстояний инбредных линий, рассчитанных по Nei, Lee, представлена пятью кластерами (рис.1).

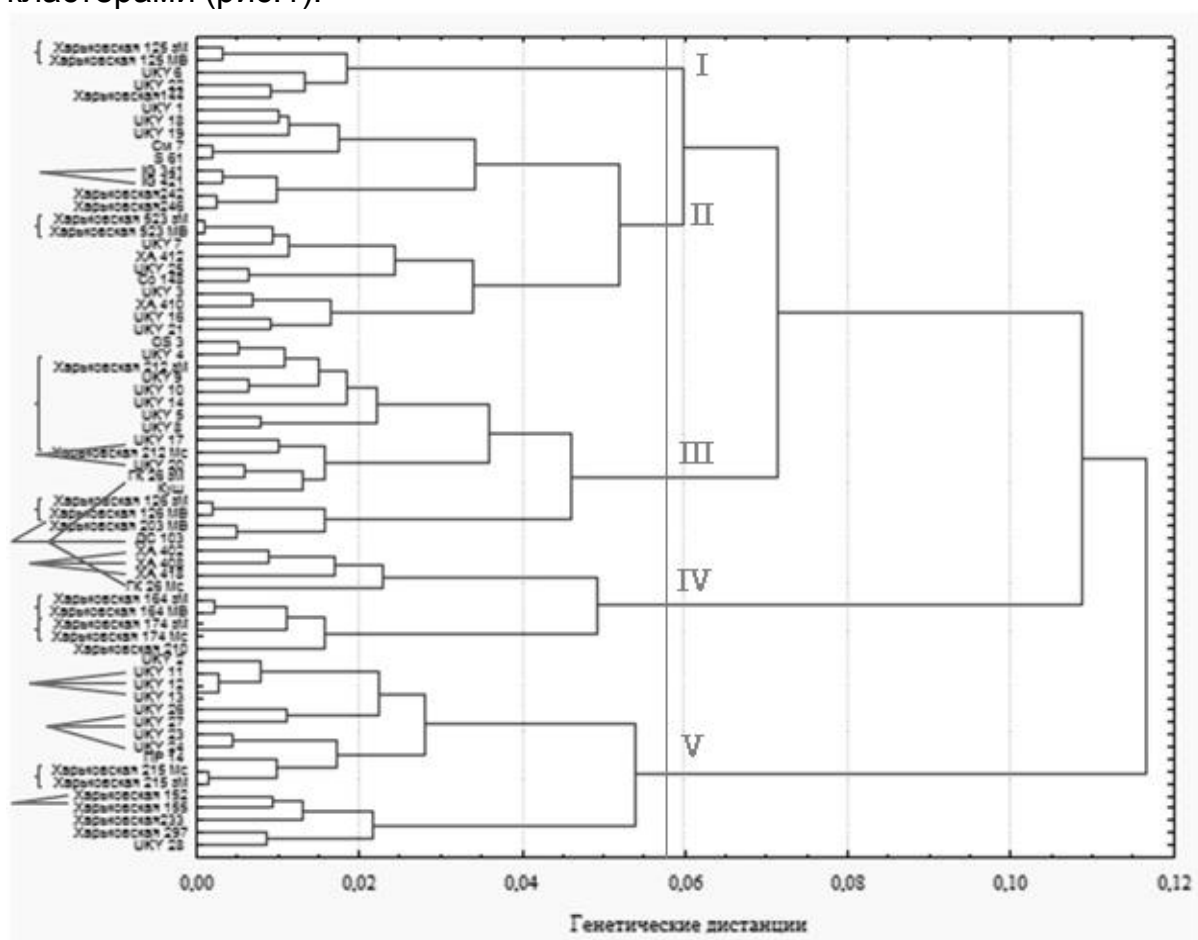


Рис. 1. Дендрограмма инбредных линий кукурузы, построена по дистанциям Nei, Lee

Прямыми линиями отмечены заранее известные близкородственные линии. Как видно из рисунка 1 почти все близкородственные линии находятся рядом на дендрограмме. Частично отдаленное расположение этих близкородственных линий свидетельствует о некотором несоответствии построения данным родословных. В данном случае генетическая

индивидуальность линий присутствует, так как близкородственные линии находятся преимущественно в одном кластере, но при этом имеет место разобщенность родственных генотипов.

Также в нашей выборке присутствовали аналоги некоторых линий (закрепитель стерильности – стерильный аналог М-типа, закрепитель стерильности – восстановитель фертильности). На дендрограмме они объединены фигурными скобками.

Кластерный анализ показал, что линия и ее аналог почти во всех случаях находятся рядом. Большинство инбредных линий кукурузы являются естественными закрепителями стерильности М-типа. Так, линии Харьковская 125 3М (закрепитель стерильности) и ее аналог Харьковская 125 МВ (восстановитель фертильности) на дендрограмме находятся одном кластере, а генетическое расстояние между ними очень мало и составило 0,003287. Эту же картину можно наблюдать при рассмотрении других линий и их аналогов восстановителей фертильности. Генетическое расстояние между линиями закрепителями стерильности и восстановителями фертильности составили: между линиями Харьковская 523 3М и Харьковская 523 МВ – 0,000905, Харьковская 126 3М и Харьковская 126 МВ – 0,002108, Харьковская 164 3М и Харьковская 164 МВ – 0,002356. Эти показатели на порядок ниже, чем средние генетические дистанции, что свидетельствует о небольшом их генетическом расхождении при насыщении линий генами восстановления фертильности.

В ходе эксперимента также были изучены такие пары линий, как закрепители стерильности и их стерильные аналоги. Генетические расстояния между этими парами линий также невелики. Расстояние между линиями Харьковская 215 3М и Харьковская 215 МС составило 0,001602, между линиями Харьковская 174 3М и Харьковская 174 МС – 0,000001, между линиями Харьковская 212 3М и Харьковская 212 МС – 0,010372. Эти данные также свидетельствуют о сохранении генетических особенностей рекуррентного родителя при переводе на стерильность М-типа.

Кроме того, нами опробован еще один способ построения дендрограммы, который обеспечивает в нашем случае максимальную согласованность с данными родословных. Он основан на использовании в качестве матрицы сходства не матрицу генетических дистанций, а матрицы частот аллельных вариантов у разных генотипов (рис. 2).

Размещение линий и их аналогов при таком подходе к построению наиболее компактное, что свойственно и близкородственным линиям. Таким образом, можно сделать вывод, что использование SSR маркерной системы целесообразно использовать для контроля качества перевода линий на стерильную основу М-типа и при создании линий восстановителей фертильности. В свою очередь, эти аналоги (пара) служили эмпирическим критерием качества построения дендрограммы.

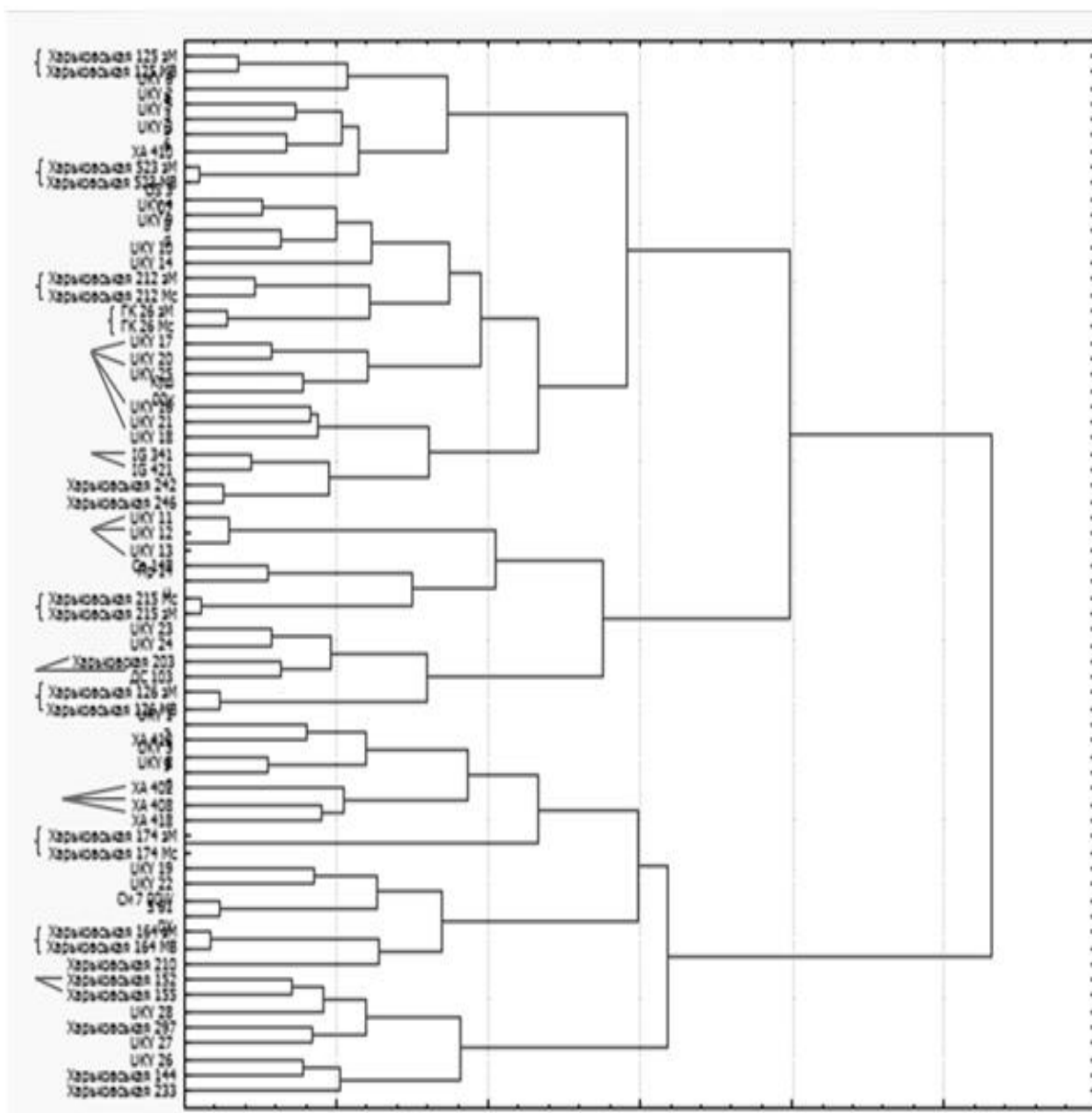


Рис. 2. Дендрограмма инбредных линий кукурузы, построена по матрице частот попадания аллельных вариантов

Выводы. Таким образом, микросателлитным анализом выявлен высокий уровень полиморфизма исследуемых инбредных линий кукурузы харьковской селекции, что указывает на их широкую генетическую базу. Молекулярно-генетическим анализом определены филогенетические взаимосвязи между исследуемыми образцами, которые соответствуют данным родословных линий.

Нами была установлена высокая дифференцирующая способность микросателлитного анализа, обусловленная наличием высокоспецифичных компонентов и их сочетаний в индивидуальном спектре, что может обеспечить надежную паспортизацию исходного материала с целью контроля типичности и защиты авторских прав. Показана возможность использования SSR маркерной системы для контроля качества перевода линий на стерильную

основу и создание аналогов восстановления фертильности, а также показано, что при использовании одной маркерной системы построение дендрограммы на основе частот аллелей микросателлитных локусов, а не генетических дистанций, обеспечивает более четкое разделение линий по филогенетическим взаимоотношениям.

Список литературы

1. Сиволап Ю. М. Геном рослин і молекулярна селекція / Ю. М. Сиволап // Селекція і насінництво. – 2008. – Вип. 96. – С. 34–40.
2. Сиволап Ю. М. ДНК-технології у дослідженні генетичного потенціалу кукурудзи / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова // Селекція і насінництво. – 2008. – Вип. 96. – С. 113–120.
3. Якушева Н. В. Проблема подбора родительских пар для скрещиваний / Н. В. Якушева // Научно-информационный бюллетень ВНИИР им. Н. И. Вавилова. – СПб, 2001. – Вып. 240. – С. 26–29.
4. Current protocols in molecular biology / [P. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al.]. – New York : Wiley, 1997. – 630 p.
5. Genetic analysis of some commonly grown genotypes of maize in Pakistan using maize specific simple sequence repeat (SSR) primers / [S. Bibi, H. Ahmad, S. Ghafoor et al.] // Current Research Journal of Biological Sciences. – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 259–261.
6. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / [R. K. Kalia, M. K. Rai, S. Kalia et al.] // Euphytica. – 2011. – Vol. 177. – P. 309–334.
7. Kumari J. Molecular profiling of maize (*Zea mays* L.) inbred lines using SSR markers / J. Kumari, R. N. Gadag, B. M. Prasanna // Indian Journal Genetic. – 2005. – Vol. 65, № 4. – P. 249–252.
8. Leal A. A. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines / [A. A. Leal, C. A. Mangolin, A. T. Jr. do Amaral et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2010. – 9, № 1 – P. 9–18.
9. Souza S. G. H. Comparative Analysis of Genetic Diversity Among the Maize Inbred Lines (*Zea mays* L.) obtained by RAPD and SSR Markers / [Silvia Graciele Hülse de Souza, Valéria Carpentieri-Pípolo, Claudete de Fátima Ruas et al.] // Braz. arch. biol. technol. – 2008. – Vol. 51, № 1 – P. 183–192.
10. Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data / [Yao Q., Yang K., Pan G., Rong T.] // Journal of Genetics and Genomics. – 2007. – Vol. 34, № 9. – P. 851–860.

Проведена оцінка генетичної різноманітності 66 інбредних ліній кукурудзи харківської та світової селекції з використанням микросателітної маркерної системи. Було досліджено 19 локусів та ідентифіковано наявність 54 алелів. Поліморфізм за всіма локусами в середньому склав 46 %. Було встановлено наявність гетерозиготних локусів у 13,6 % ліній. Показано можливість використання SSR маркерної системи для контролю якості переводу ліній на стерильну основу (М-типу) і створення аналогів відновлення фертильності.

***Zea mays* L., інбредні лінії, поліморфізм, микросателітний аналіз.**

Evaluation of the genetic diversity among 66 maize inbred lines of Kharkov and the world selection using microsatellite marker system has been investigated. It had been examined 19 loci as well as 54 alleles were identified. The average polymorphism by all loci was rose to 46%. The presence of heterozygous loci in 13.64% of lines was established. It was concluded that SSR marker system may appropriate for the control on process of sterile lines and restorers one creation.

Zea mays L., inbred lines, polymorphism, microsatellite analysis.