

УДК 633.63:631.52

ГЕНОМНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ЦМС – ОСНОВЕ С ПОМОЩЬЮ RAPD – МАРКЕРОВ

Т.П.Федулова

С использованием RAPD-метода (random amplified polymorphic DNA) исследованы инбредные линии сахарной свеклы и гибридные комбинации с их участием. Для ПЦР-анализа использованы восемь произвольных праймеров из семейства ретротранспозонов (PAWS), характеризующих различные участки повторяющегося элемента R 173, картированного у ржи. Сравнение спектров рассеянных повторов ДНК позволило отличить селекционные образцы сахарной свеклы друг от друга, а также гибриды, полученные с их участием. Результаты, полученные с использованием ограниченного набора праймеров, позволили найти маркеры, специфические для некоторых селекционных материалов и идентифицировать их. Обсуждаются перспективы использования RAPD-метода для оценки генетического разнообразия исходного и селекционного материала.

В связи с необходимостью интенсификации селекции сахарной свеклы в последние десятилетия остро возникла потребность в поиске методов, способных ускорить отбор по хозяйственно-ценным признакам на ранних стадиях развития. Данная проблема может быть решена применением молекулярных маркеров на основе ДНК. Эти маркеры используются на очень ранних фазах развития растения (фаза проростков), не зависят от условий окружающей среды и обладают огромным потенциалом полиморфизма. Для выделения ДНК подходит любой растительный материал. Экстракты ДНК хранятся длительное время и многократно применяются для анализа (Хавкин, 2003).

Маркирование сортового материала на основе ДНК-маркеров обеспечивает контроль за его однородностью и стабильностью, а молекулярная идентификация и паспортизация сортов и гибридов сахарной свеклы расширяет возможности системы защиты авторских прав селекционеров. Одним из таких методов является RAPD – анализ (Williams et al., 1990). RAPD – анализ основан на амплификации геномной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции со «случайными» праймерами для получения генотип-специфичных RAPD-спектров. При первичном анализе гибридных геномов RAPD маркеры и геном-специфичные повторы наиболее эффективно позволяют выявлять различия между гибридами и их родителями, оценивать уровень интрогрессии одного генома в другой. Так, с использованием 50-ти RAPD и 248 ПДРФ маркеров создана расширенная карта генома сахарной свеклы. Определено положение генов 3 фенотипических признаков – Rr1 (устойчивость к корневой ризомании), R (окраска гипокотыля) и M (репродуктивные характеристики) (Barzen e.a., 1995). Картированию генома сахарной свеклы на основе ДНК-маркеров посвящено много публикаций (Uphoff, Wricke, 1995; Schondelmaier, Steinrucken, Jung, 1996; Schmidt, Helsop-

Schmidt, Jung, 1997). Вместе с тем, работ по использованию ДНК-маркеров для проведения генотипирования отечественных линий, сортов и гибридов сахарной свеклы нам не встречалось. В этой связи большую актуальность приобретает разработка метода геномной идентификации селекционных материалов сахарной свеклы на основе молекулярных маркеров.

Материалы и методы исследований. В качестве материалов для исследований были использованы проростки МС линий сахарной свеклы, линий О типа, многосемянных опылителей, пробных гибридов, апомиктичных линий.

Известно, что большая часть генома растений представлена некодирующими повторяющимися последовательностями. Для анализа генетического разнообразия сахарной свеклы нами были использованы праймеры, фланкирующие концевые повторы ретротранспозонов семейства R 173: Paw S5 (AACGAGGGGTTCGAGGCC), Paw S6 (GAGTGTCAAACCCAACGA), Paw S16 (ACCTCTGGCTTGGC), а также их комбинации: Paw S5 + Paw S6, Paw S5 + Paw S11, Paw S56 + Paw S11, Paw S6 + Paw S16, Paw S11 + Paw S16 (Rogovsky et al., 1991). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва). Выделение геномной ДНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции (Rogers, Bendich, 1985). Амплификацию геномной ДНК проводили в термоциклере «Терцик» (АО «ДНК-Технология», Москва), в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5мМ трис-НСl, рН 8,8; 25мМ MgCl₂ по 2мМ каждого dNTP; 10пМ/мкл олигонуклеотидов; 25 мкг геномной ДНК; 1ед. а. Таг-полимеразы. Программа амплификации ДНК состояла из двух циклов, включающих 2 мин. денатурации при 94°C, 10 с отжига праймеров с матрицей при 45°C, 70 с синтеза комплементарных цепей при 72°C и 38 циклов, каждый из которых включал 10 с при 92°C, 7 с при 55°C, 70 с при 72°C и завершающего синтеза в течение 5 мин. при 72°C. Продукт амплификации подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле. Длину фрагментов ДНК определяли с использованием маркера молекулярной массы Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

Результаты исследований. Результаты проведенных нами исследований показали, что использованные праймеры в изученных инбредных и апомиктичных линиях сахарной свеклы давали четкие спектры с достаточной степенью полиморфизма (рис.1).

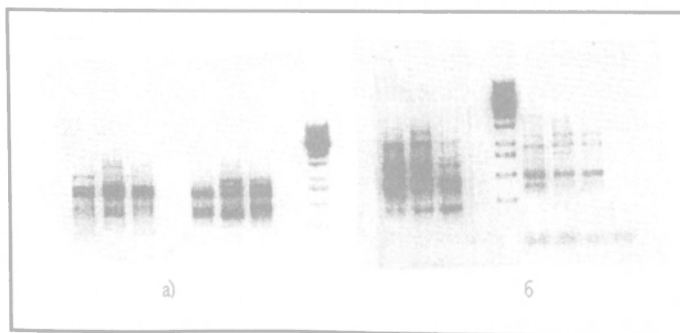


Рисунок 1 — Спектры амплифицированных фрагментов ДНК у линий сахарной свеклы.

Примечание. 1-3 инбредные линии: №№199/96(ф), 94376(2), 93128(3); 4, 8 отрицательный контроль (вода); 5-7 апомиктичные линии: г-РФ-70-АР, г-МС-80-АР, г-МС-94-204-АР; 9 маркер молекулярной массы 1 кв Gene Ruler а) с праймерами

Амплификация с произвольными праймерами позволила нам тестировать изменчивость по ряду неидентифицированных диспергированных по геному локусов. Указанные произвольные праймеры при амплификации с геномной ДНК сахарной свеклы выявили от 5 до 18 полос (ампликонов) на образец с молекулярной массой от 250 до 300 п.н. Полиморфные фрагменты, соответствующие продуктам ПЦР, расценивали как единичные RAPD-локусы. При сравнительном анализе RAPD-спектров шести инбредных линий сахарной свеклы наилучшие результаты были получены при амплификации с праймерами PawS5, PawS6 и с парами этих праймеров, а также с парой праймеров PawS16 + PawS17. При этом удалось обнаружить как сходство, так и различия между исследованными формами по продуктам полимеразной цепной реакции. Так, из приведенных RAPD-профилей видно, что апомиктичные гамма-линии сахарной свеклы характеризовались большей выравненностью - количество амплифицированных ПЦР-продуктов варьировало от 2 до 4-х, тогда как у инбредных линий, созданных традиционными методами, их количество достигало 6-ти. Это связано, по-видимому, с тем, что в процессе создания γ -линий были отобраны формы, гомозиготные по изоферментным локусам. Для анализа гибридности нами были исследованы растения гибридных комбинаций и их родительских компонентов с использованием коммерческих олигонуклеотидных праймеров компании ООО «Биоком» (Москва). При проведении ПЦР наиболее информативные спектры были получены с олигонуклеотидными праймерами №1 и №2 (рис. 2).

Анализ RAPD-спектров пробных гибридов и их родительских форм подтвердил гибридную природу полученных образцов с высоким уровнем интрогрессии геномов. Сравнительный анализ RAPD-спектров гибридных генотипов ($F_1 \gamma$ - MC - 2113 x 15465 и $F_1 \gamma$ - MC - 2113 x 14840) показал наличие специфического фрагмента ДНК, характерного для материнского компонента. В результате проведенного молекулярного анализа методом ПЦР у генотипов сахарной свеклы обнаружены существенные отличия между MC-формой (1, 7) и фертильными многосемянными опылителями (3, 9, 12), как по количеству амплифицированных продуктов, так и по размеру этих фрагментов. Большой полиморфизм у исследованных материалов обнаружен при использовании праймера №1. Вместе с тем, более четкое отличие всех изученных образцов выявлено при амплификации с праймером №2. Так в наших исследованиях было показано, что γ -MC-линия 2113 отличается от всех исследованных селекционных номеров присутствием фрагмента с молекулярной массой 1000 п.н. Данный компонент отсутствует в геномной ДНК многосемянных опылителей 14840 и 15465.

Данный компонент отсутствует в геномной ДНК многосемянных опылителей 14840 и 15465.

Анализируя данные RAPD-анализа, можно также отметить отличие линии закрепителя стерильности «О типа» от ее MC аналога по количеству и размеру амплифицированных фрагментов. Что, по-видимому, объясняется влиянием ядерных генов (xxzz/XXZZ), определяющих стерильность или фертильность цитоплазмы. Однако для более точного тестирования типа цитоплазмы необходимо использовать анализ митохондриальных фрагментов ДНК.

Молекулярный RAPD-анализ индивидуальных растений сахарной свеклы при использовании в качестве праймеров для амплификации случайно

выбранных последовательностей стандартных декануклеотидов фирмы «Orgen Technologies» (USA) OPA 15 и OPK 10 показал значительный полиморфизм как внутри линий, так и межлинейный (рис. 3).



Рисунок 2 — RAPD-профили геномной ДНК селекционных материалов сахарной свеклы.

Примечание. М – маркер молекулярной массы 1kb Gene Ruler; Праймер №1: 1 – ДНК сахарной свеклы г – МС 2113; 2 – ДНК сахарной свеклы г – МС 2113 x 15465; 3 – ДНК сахарной свеклы 15465 (ГО); 4 – ДНК сахарной свеклы F₂ г – МС 2113 x 15465; 5 – ДНК сахарной свеклы F₁ г – МС 2113 x 14840; 6 – отрицательный контроль (вода); Праймер №2: 7 – ДНК сахарной свеклы г – МС 2113; 8 – ДНК сахарной свеклы F₁ г – МС 2113 x 1546; 9 – ДНК сахарной свеклы 15465 (ГО); 10 – ДНК сахарной свеклы F₂ г – МС 2113 x 15465; 11 – ДНК сахарной свеклы F₁ г – МС 2113 x 14840; 12 – ДНК сахарной свеклы 14840 (ГО); 13 – ДНК сахарной свеклы О-типа; 14 – отрицательный контроль (вода).

Это является, вероятно, следствием гетерозиготности растений сахарной свеклы, как перекрестноопыляемой культуры. RAPD-профили с участием праймеров OPA 15 и OPK 10 характеризовались специфическими фрагментами для всех изученных генотипов сахарной свеклы. В результате проведенных экспериментов мы подобрали RAPD-маркеры, специфические для фертильных и стерильных линий сахарной свеклы, но мы не можем утверждать, являются они специфическими только для этих селекционных номеров или для целой группы популяций. Мы полагаем, что при использовании большего числа праймеров можно обнаружить специфические RAPD-маркеры для каждого сорта и гибрида. В дальнейшем планируется использование большего количества праймеров для выявления уникальных локусов генома у каждого из селекционных образцов сахарной свеклы.

Не исключено также, что полный анализ ядерного и цитоплазматического геномов может показать иную степень отличия, нежели обнаруженная при анализе геномной ДНК. Анализ генотипов сахарной свеклы с помощью RAPD-технологии показал, что при тщательном подборе условий проведения ПЦР и олигонуклеотидных праймеров удается получать RAPD-спектры, специфичные для отдельных селекционных номеров. Использование разных олигонуклеотидных праймеров позволяет выявлять разную степень полиморфизма среди генотипов одного сорта. Наибольший уровень полиморфизма отмечен при использовании праймера №1, который оценивается нами как «вариабельный».

выявленная полиморфность ДНК у генотипов сахарной свеклы в выборке свидетельствует о генетической неоднородности изученного селекционного материала, что во многом определяется методом создания данных генотипов. В ходе исследований нами были подобраны восемь олигонуклеотидных праймеров, которые могут быть использованы для идентификации различных селекционных форм, сортов и гибридов сахарной свеклы. Были выявлены генотипспецифичные фрагменты, которые в дальнейшем будут использованы для маркирования селекционных материалов сахарной свеклы. В данном случае метод полимеразной цепной реакции расширяет возможности сравнительного анализа и способствует получению более объективных данных об изменчивости генома сахарной свеклы. Дальнейшие наши исследования будут направлены на совершенствование данного метода для решения задач паспортизации и экспертизы районированных сортов и гибридов сахарной свеклы.

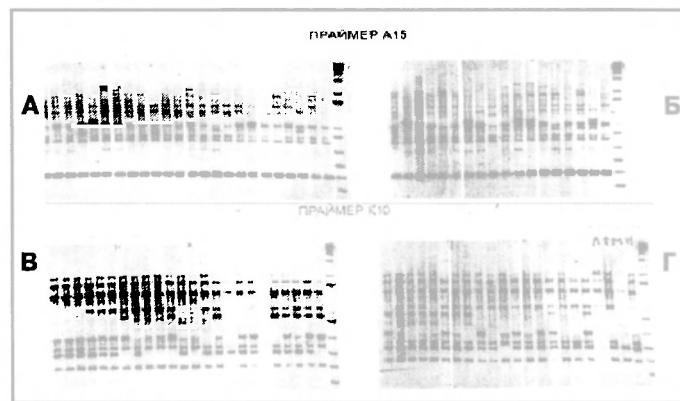


Рисунок 3 — RAPD-профили генотипов сахарной свеклы с праймерами ОРА 15 и ОРК 10.

Примечание. а), в) 1-6 – г-РФ-2093; 7-12 – г-МС-209313-18 – г-РФ-2113; 19-24 – г-МС-211325 – М маркер ДНК (1 т.п.н.); б), г) 1-6 – 15202; 7-12 – 15465; 13-18 – 14840; б) 19 – М маркер ДНК; г) 19 – Львовская одн. 52; 20 – гибрид «Русь»; 21 – Мангольд; 22 – Несравненная; 23 – М маркер ДНК

Таким образом, RAPD-технология, использованная нами при анализе генотипов, может с успехом применяться для проведения идентификации селекционных материалов и в перспективе для маркирования хозяйственно ценных признаков. Идентификация сортов и гибридов сахарной свеклы позволяет создать систему регистрации генотипов растений и может наряду с другими методами оценки стать средством правовой защиты селекционных достижений. Предлагаемая технология может найти самое широкое применение в селекции, семеноводстве и фундаментальных исследованиях генома сахарной свеклы.

Список литературы

1. Barzen E., W.Mechelke, E.Pitter, E.Schulte-Kappert, F.Salamini. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci // Theor. and Appl. genet. - 1995. - 90. - P. 189-193.

2. Хавкин Э. Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур // Сельскохозяйственная биология. - 2003. - № 3. - С. 26-41.
3. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. - V. 5. P. 67-69.
4. Rogovsky P.M., P.M. Rogovsky, K.W. Sherpherd // Genome /. - 1992. - V. 35, №4. - P. 621 - 626.
5. Schondelmaier J., G. Steinrucken, C. Jung Integration of AFLP markers in a linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Breed. - 1996. - V. 115. - P. 231 - 237.
6. Schondelmaier J., T. Schmidt, C. Jung. Genetic and chromosomal location of the 5Sr DNA locus in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Genome. - 1997. - V. 40, №2. - P. 171 - 175.
7. Schmidt T., J.S. Helsop - Harrison. The physic and genomic organization of microsatellites in sugar beet // Proc. Nat. Acad. Sci. - USA. - 1996. - 93. - P. 8761 - 8765.
8. Schmidt T., T. Schwarracher, J.S. Helsop - Harrison. Physical mapping of DNA genes by fluorescent in situ hybridization and structural analysis of 5Sr DNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / T. Schmidt, // TAG. - 1999. - 88. - P. 629 - 636.
9. Uphoff H., G. Wricke. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Breed. - 1995. - 111. - P. 355 - 357.
10. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. - 1990. - 18. - P. 6231-6235.

Анотація

З використанням RAPD-метода (random amplified polymorphic DNA) досліджені інбредні лінії цукрових буряків та гібридні комбінації за їх участю. Для ПЦР-аналізу використані вісім довільних праймерів із родини ретротранспозонів (PAWS), що характеризують різні ділянки елемента, R 173, який повторюється, встановленого у жита. Порівняння спектрів розсіяних повторів ДНК дозволило відрізнити селекційні зразки цукрових буряків один від одного, а також гібриди отримані за їх участю. Результати, отримані з використанням обмеженого набору праймерів, дозволили знайти маркери, специфічні для деяких селекційних матеріалів і ідентифікувати їх. Обговорюються перспективи використання RAPD-метод для оцінки генетичного розмаїття вихідного і селекційного матеріала.

Annotation

Using RAPD-method (random amplified polymorphic DNA), inbred lines of sugar beet and hybrid combinations with their participation have been studied. Seven random primers from retrotransposon family (PAWS) that characterize different regions of repetitive element R 173, mapped in rye, are used for PCR-analysis. Spectra comparison of dispersed DNA repeats has allowed distinguishing between breeding specimens of sugar beet as well as hybrids developed with their participation. The results obtained using a limited kit of primers have allowed to find markers specific for some breeding materials and to identify them. Prospects of using RAPD-method to evaluate genetic diversity of starting and breeding material are discussed.