

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ГОРОХА ОВОЩНОГО

Анохина В.С.¹ – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики, зав. сектором генетики растений НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета

Саук И.Б.¹ – старший научный сотрудник сектора генетики растений НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета

Романчук И.Ю.¹ – научный сотрудник сектора генетики растений НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета

Жардецкий С.С.¹ – научный сотрудник сектора генетики растений НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета

Дронов С.М.¹ – магистрант кафедры генетики биологического факультета БГУ

Чайковский А.И.² – кандидат сельскохозяйственных наук, зав. лабораторий бобовых культур

¹ Белорусский государственный университет

Республика Беларусь, 220030, г. Минск, проспект Независимости, 4

E-mail: Anokhina@bsu.by

² РУП «Институт овощеводства»

Республика Беларусь, 223013, Минская область, Минский район, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

E-mail: belniio.gorox@mail.ru

В работе представлены результаты исследований гибридного материала гороха овощного на наличие в их геномах участков ДНК, комплементарных ряду праймеров, связанных с биохимическими характеристиками и устойчивостью к настоящей мучнистой росе.

Ключевые слова: горох овощной, гибрид, молекулярный маркер, устойчивость к мучнистой росе.

Введение

Современные молекулярно-генетические методы позволяют разрабатывать новые стратегии маркер-селекции сельскохозяйственных культур. Использование молекулярных маркеров по хозяйственно ценным признакам актуально для выведения и оценки последующей перспективности селекционных форм у ряда культивируемых растений. Эти подходы имеют большое значение для паспортизации сортов и гибридов, оценки чистоты сортового посевного материала, а также для установления родственных связей между ними и построения древа филогенетического родства

разных форм и видов. Использование молекулярных маркеров в селекции на устойчивость к заболеваниям позволит проводить оценку селекционного материала на разных этапах развития растений и выбраковать неустойчивые генотипы, а, следовательно, сократить объем работ по созданию инфекционного фона и проводить дальнейшую работу по оценке уровня устойчивости у растений.

В работах сотрудников разных научных учреждений России [1] на примере гороха и других культур доказана важность молекулярного маркирования генетических ресурсов и селекционных образцов для их идентифика-

ции и эффективности использования. Исторически для характеристики образцов коллекций генбанков использовали морфофизиологические признаки растений, реже биохимические маркеры. Однако за последние несколько десятилетий *ex situ* коллекции чрезвычайно увеличились в объёмах как результат попыток мирового сообщества сохранить и расширить растительные генетические ресурсы. В связи с этим становится всё сложнее пользоваться традиционными методами оценки в генбанках сохраняемого разнообразия. В настоящее время FAO разработала набор рекомендаций по эффективному управлению национальными генбанками. При этом подчёркивается, что современное состояние генбанков не является удовлетворительным. Так, свыше 65% мировых коллекций нуждаются в возобновлении всхожести и получении семян свежих репродукций, и многие национальные программы, направленные на поддержание генбанков, переживают значительные трудности, что связано с дороговизной и трудоёмкостью поддержания коллекций, а это в свою очередь приводит к обеднению их, и часто значительному. Предложенное Frankel [2] создание так называемых соге-коллекций для эффективного сохранения и использования генетических ресурсов также требует предварительной оценки всего разнообразия основной коллекции [3].

Решение проблем на современном этапе видится в использовании молекулярных методов ДНК-анализа коллекций, что и предлагает FAO в качестве базовой характеристики генетического разнообразия, представленного в генбанках. При этом подчёркивается, что конечный результат полностью оправдывает и, главное, окупает затраты на проведение молекулярных исследований. В дополнение к традиционным способам характеристики молекулярное генотипирование позволяет охарактеризовать образцы коллекций на уровне первичных последовательностей ДНК на любой стадии развития растения. Молекулярный анализ генетического разнообразия внутри образца и между образцами коллекций позволяет одновременно решать целый ряд актуальных задач для правильной организации и характеристики генетических коллекций:

- идентификация дублетных образцов;
- верификация таксономического статуса образцов;
- создание соге-коллекций;
- создание генбанка ДНК;
- молекулярная паспортизация образцов (прежде всего, сортов).

При этом следует учитывать, что не всегда уровень морфологического полиморфизма коррелирует с генетическим, и, следовательно, молекулярная оценка коллекций может помочь идентифицировать новые потенциальные источники генетического разнообразия, в том числе и полезного для селекции [4].

В основу молекулярной характеристики образцов коллекций был положен метод комплексного геномного анализа, подразумевающий использование различных методов молекулярного маркирования (AFLP, RAPD,

1. Образцы гороха овощного, использованные в эксперименте

№ образца МР	Наименование образца	Родители, ♀х♂
1	05-07-9-3	Ramzes x Альдерман
2	05-07-21-1	Ramzes x Альдерман
3	05-07-27-4	Ramzes x Альдерман
4	06-07-2-5	Альдерман x Helmo
5	06-07-17-2	Альдерман x Helmo
6	06-07-17-3	Альдерман x Helmo
7	06-07-20-3	Альдерман x Helmo
8	12-07-3-1	Альдерман x Betafortuna
9	07-07-3-3	Альдерман x Betafortuna
10	07-07-4-2	Альдерман x Betafortuna
11	07-07-4-3	Альдерман x Betafortuna
12	07-07-24-2	Альдерман x Betafortuna
13	08-07-2-1	Альдерман x Ramzes
14	08-07-2-2	Альдерман x Ramzes
15	08-07-18-2	Альдерман x Ramzes
16	08-07-18-3	Альдерман x Ramzes
17	08-07-22-1	Альдерман x Ramzes
18	08-07-29-2	Альдерман x Ramzes
19	09-07-1-2	Betafortuna x Helmo
20	09-07-1-4	Betafortuna x Helmo
21	09-07-2-2	Betafortuna x Helmo
22	16-07-4-7	Betafortuna x Альдерман
23	16-07-6-8	Betafortuna x Альдерман
24	16-07-4-4	Betafortuna x Альдерман
25	17-07-4-5	Betafortuna x Ramzes
26	Ramzes	
27	Альдерман	
28	Betafortuna	
29	Helmo	

ISSR, анализ семейств генов, анализ нуклеотидного полиморфизма отдельных генов и некодирующих последовательностей, как ядерного генома, так и пластидной ДНК). Подход позволяет максимально полно описать генетическое разнообразие уникальных, функционально значимых областей генома, а также повторяющихся или эволюционно нейтральных локусов.

Установлено существенное различие по полиморфизму изученных форм между данными морфофизиологического анализа и молекулярно-генетического тестирования при молекулярном тестировании коллекций.

Молекулярно-генетическое изучение структуры популяции сои [5] выявило зависимость генетического разнообразия от эколого-фитоценологических условий произрастания и антропогенного воздействия. Исследования сотрудников МГУ убедительно доказали существенное уточнение таксономического положения и полиморфизма рода *Pisum* и др. на основе молекулярно-генетического тестирования образцов гороха и других культур по структуре ДНК [6].

С использованием молекулярно-генетических, молекулярно-биохимических и молекулярно-генетических маркеров проведена паспортизация генетического разнообразия разных видов льна [7], гороха [8], пшеницы

[9-11] и других культур [12,13], что актуально для селекционных программ и познания процессов генетической дивергенции и родства изучаемых форм растений, а также для создания коллекций и изучения генетического разнообразия в целях селекции [14].

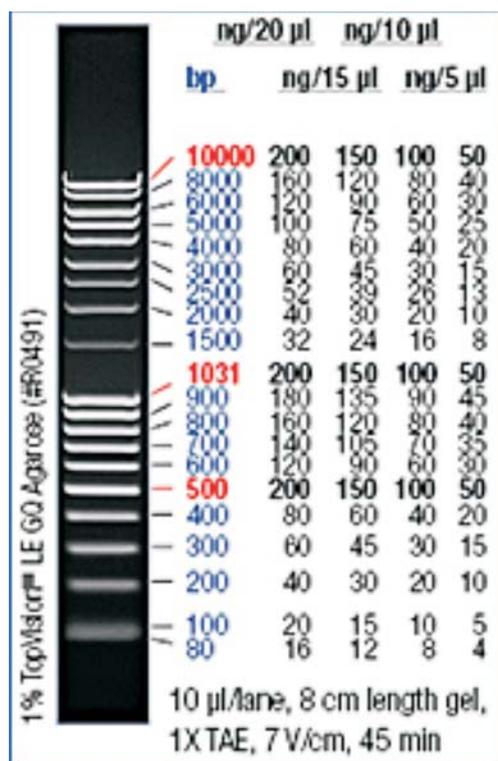
Целью наших исследований было изучение образцов гороха овощного гибридного происхождения на наличие участков ДНК комплементарных праймерам, сцепленным со следующими признаками: синтез протеина транспорта сахарозы SUT 1, рибосомального протеина L24A, вицилина, металлотинин, ингибитора трипсина и устойчивостью к настоящей мучнистой росе (ген *er 1*).

Материалы и методы

В работе по маркированию использовали 29 образцов гороха овощного (табл. 1). Среди них 25 линий из гибридов поздних поколений и 4 родительские формы.

ДНК выделяли из листьев растений до цветения. Листья высушивали в термостате при T=37°C, примерно двое суток. Навеску листового материала 0,2 г растирали в ступке с добавлением небольшого количества Al2O3. Выделение и очистку ДНК исследуемых образцов проводили по методике фирмы Fermentas, набором Genomic DNA Purification Kit, разработанным этой же

2. Праймеры, использованные в опытах



Название праймера	Сцепленный с праймером признак	Источник
P 248	протеин транспорта сахарозы SUT 1	Zhukov, V.A. [15]
BC 210	устойчивость к настоящей мучнистой росе (ген <i>er 1</i>)	Tonguc M [16]
Rph 24 A	рибосомальный протеин L24 A	Zhukov, V.A.[15]
VicJ	вицилин	Zhukov, V.A.[15]
TI 1	ингибитор трипсина	Zhukov, V.A.[15]
Met 2	металлотинин	Zhukov, V.A.[15]

фирмой. Концентрацию полученного раствора ДНК определяли методом спектрофотометрии на приборе CARY 50 SCAN (Varian, Австралия). Для проведения ПЦР использовали амплификатор Thermo Hybrid Rx2 (Великобритания).

Условия амплификации были следующими:

- I. 94°C – 5 мин;
- II. 94°C – 45 сек, X°C – 30 сек, 72°C – 1 мин

III. 94°C – 30 сек, X°C – 30 сек, 72°C – 1 мин

IV. 72°C – 5 мин

Температуру отжига праймеров определяли с помощью программы «олигокалькулятор» (<http://bio.bsu.by/molbiol/oligo-calc.html>). ПЦР амплификация и разделение продуктов ПЦР в полиакриламидном геле проведены согласно методике [15].

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с буфером ТАЕ в присутствии бромистого

3. Результаты маркирования образцов гороха овощного

Образец	Праймеры					
	P 248	BC 210	Rph 24 A	VicJ	TI 1	Met 2
Ramzes x Альдерман, линия 1	+	+	+	+	+	+
Ramzes x Альдерман, линия 2	+	+	+	+	-	+
Ramzes x Альдерман, линия 3	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Helmo, линия 1	+	+	-	+	+	+
Альдерман x Helmo, линия 2	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Helmo, линия 3	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Helmo, линия 4	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Betafortuna, линия 1	+	+	-	+	+	+
Альдерман x Betafortuna, линия 2	+	+	-	+	+	+
Альдерман x Betafortuna, линия 3	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Betafortuna, линия 4	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Betafortuna, линия 5	+	-	+	+	+	+
Альдерман x Ramzes, линия 1	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Ramzes, линия 2	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Ramzes, линия 3	+	-	+	+	+	+
Альдерман x Ramzes, линия 4	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Ramzes, линия 5	+	+	+	+	+	+
Альдерман x Ramzes, линия 6	+	+	-	+	+	+
Betafortuna x Helmo, линия 1	+	+	-	+	+	+
Betafortuna x Helmo, линия 2	+	+	+	+	+	+
Betafortuna x Helmo, линия 3	+	+	+	+	+	+
Betafortuna x Альдерман, линия 1	+	+	+	+	+	+
Betafortuna x Альдерман, линия 2	+	+	+	+	+	+
Betafortuna x Альдерман, линия 3	+	-	+	+	+	+
Betafortuna x Ramzes	+	+	-	+	+	+
Ramzes	+	-	+	+	+	+
Альдерман	+	+	-	+	+	+
Betafortuna	+	+	+	+	+	+
Helmo	+	+	+	+	+	+

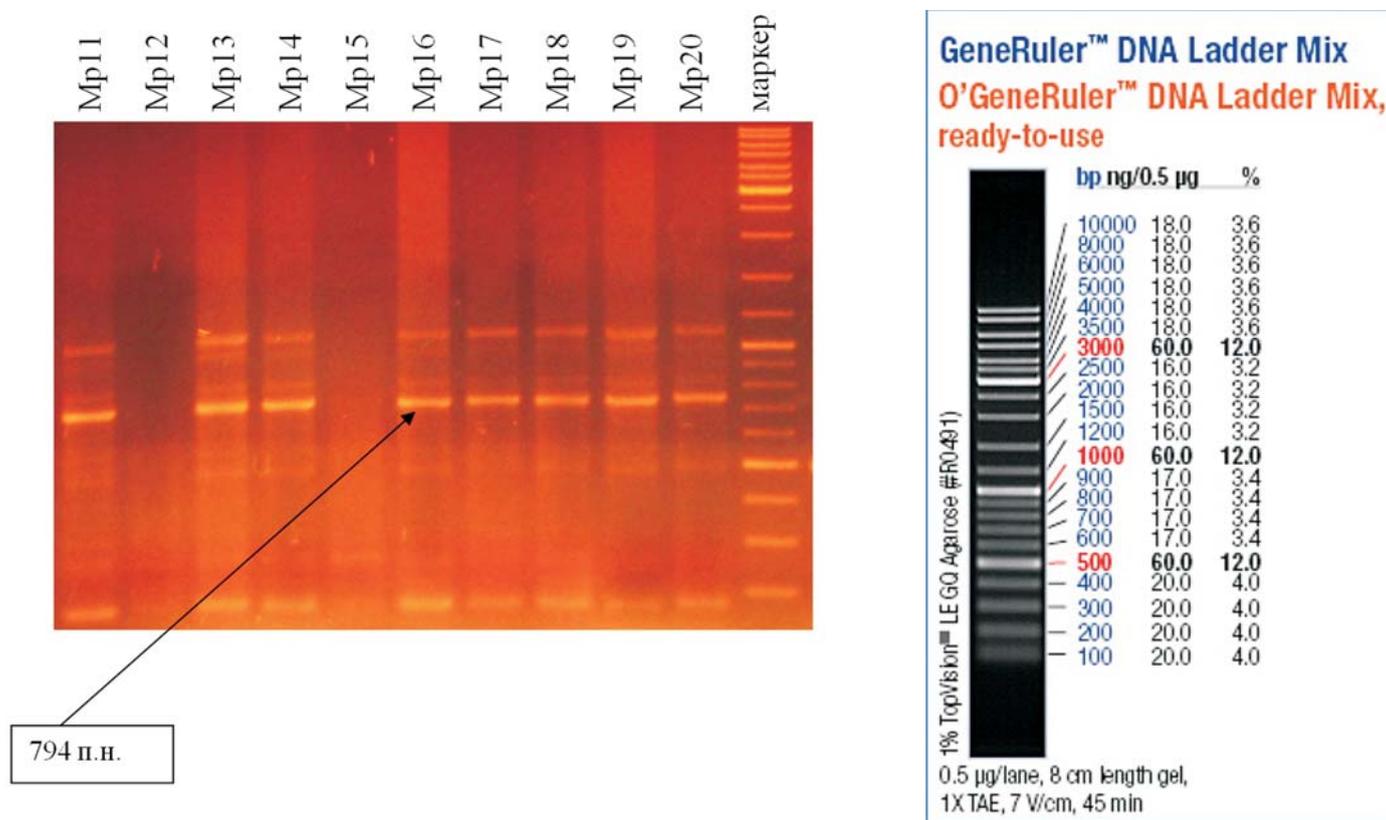


Рис. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов ДНК с праймером BC210 опытных образцов гороха овощного (устойчивость к настоящей мучнистой росе)

- Mp11 - Альдерман x Betafortuna, л 4 Mp17 - Альдерман x Ramzes, л 5.
 Mp12 - Альдерман x Betafortuna, л 5 Mp18 - Альдерман x Ramzes, л 6.
 Mp13 - Альдерман x Ramzes, л 1. Mp19 - Betafortuna x Helmo, л 1
 Mp14 - Альдерман x Ramzes, л 2 Mp20 - Betafortuna x Helmo, л 2
 Mp15 - Альдерман x Ramzes, л 3.
 Mp16 - Альдерман x Ramzes, л 4.

этидия и визуализировали на UV-трансиллюминаторе. На фореуз наносили одинаковый объем ПЦР-продуктов в 10 мкл. В качестве маркера длины фрагментов использовали DNA Ladder, Mix MassRuler™.

В опытах по маркированию гороха овощного использовали следующие праймеры (табл.2).

Результаты и их обсуждение

Выбор этих праймеров обоснован как данными литературы, так и важностью маркируемых признаков, характеризующих биохимические особенности культуры и устойчивость к настоящей мучнистой росе.

Гибриды гороха овощного и их исходные родительские формы проанализированы на наличие в их геномах участков ДНК, комплементарных праймерам P 248, BC 210, Rph 24 A, VicJ, TI 1, Met 2. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Выявлены сходства генотипов изученных форм гороха овощного по праймерам P 248 (синтез протеина транспорта сахарозы), VicJ (синтез вицилина), Met 2 (синтез металло-

тионина). Разница между изученными образцами установлена по праймерам BC 210, TI 1 и Rph 24 A.

Интересные данные получены по признаку устойчивости к настоящей мучнистой росе. Три родительские формы (Альдерман, Betafortuna и Helmo) содержали ген устойчивости er 1. У линий комбинаций скрещивания Альдерман x Betafortuna, линия 5, Альдерман x Ramzes, линия 3; Betafortuna x Альдерман, линия 3 – не выявлено данного гена. Учитывая рецессивную природу искомого гена, при гибридизации отдельных форм происходит рекомбинация геномов, приводящая к восстановлению признака неустойчивости к мучнистой росе. Возможно, это является как результатом неаллельного взаимодействия, так и подтверждением полигенной природы изучаемого признака. Проведенное маркирование позволило нам среди изученных форм выделить образцы, имеющие в своем геноме рецессивный ген устойчивости к настоящей мучнистой росе.

При маркировании образцов гороха овощного по праймеру TI 1 (наличие ингибиторов трипсина) выделен образец Ramzes x Альдерман, линия 2, у которого отмечено отсутствие искомого фрагмента ДНК комплементарного изучаемому праймеру, что позволяет нам утверждать об отсутствии у этого образца гена синтеза ингибиторов трипсина. Сложности в генанализе представляет проявление у гибридов в

сравнении с исходными родительскими формами признака синтеза рибосомального протеина L24 A, ген которого не обнаружен как у одной из родительских форм (Альдерман), так и у гибридов, полученных с другими формами (Betafortuna x Helmo, Betafortuna x Ramzes).

Полученные результаты молекулярного маркирования могут быть и следствием гетерозиготности исходных компонентов скрещивания, что требует дополнительной проверки.

Заключение или выводы

В результате молекулярно-генетического маркирования геномов линий межсортовых гибридов гороха овощного выявлены геномы, различающиеся по отдельным признакам как между линиями одной и той же гибридной комбинации, так и с отдельными родительскими компонентами. Это позволяет по их селекционной значимости отбирать формы для включения в селекционный процесс.

Литература

1. Молекулярное маркирование видового разнообразия генетических ресурсов растений коллекции ГНУ ГНЦ РФ ВИР/ Рыжова Н.Н. и др. // Доклады II Вавиловской Международной конференции «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: Состояние, проблемы, перспективы», 26-30 ноября 2007. – СПб.: ВИР, 2009. – С. 160-171.
2. Frankel, O.H. Genetic perspectives of germplasm conservation / Genetic Manipulation: Impact on Man and Society. Cambridge University Press, Cambridge, 1984. -P.161-170.
3. Barneby R. C. A new species of Lathyrus (Fabaceae) from the Death Valley region of California, Nevada //Aliso. 1971.- V.7.-P.361-364.
4. De Vicente C., Metz T., Alercia A. Descriptors for Genetic markers Technologies. International plant Genetic Resources Institute, Rome Italy, 2004. -30 p.
5. Тихонов А.В., Дорохов Д.Б. Сравнительное молекулярно-генетическое исследование структуры естественных и антропогенных популяций дикой сои (*Glycine Soja* Sieb. Et Zucc.) на юге Приморского края как элемент программы сохранения *in situ* родичей культурных растений // Материала Международной конференции «Генетические ресурсы культурных растений: Проблемы эволюции и систематики культурных растений», 9-11 декабря 2009 г. СПб.: ВИР, 2009.- С. 131-134.
6. Синюшин А.А., Демиденко Н.В. Таксономическое положение *Vavilovia Formosa* (Stev.)Fed.по данным морфологических и молекулярных исследований // Материала Международной конференции «Генетические ресурсы культурных растений: Проблемы эволюции и систематики культурных растений», 9-11 декабря 2009г. СПб.: ВИР, 2009. – С. 212-214.
7. Зеленин А.В. Исследования геномов сельскохозяйственных растений и их дикорастущих сородичей с помощью молекулярно-хромосомных маркеров с целью характеристики и обогащения генофондов важнейших культур //Динамика генофондов растений, животных и человека. М.: ИОГен РАН, 2005. – С.81-82.
8. Гостимский С.А. и др. Исследования генома культурных растений и их сородичей применительно к генетической теории селекции: анализ молекулярно-

генетического полиморфизма генома гороха и идентификация новых генов, кодирующих хозяйственно ценные признаки // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007. – С. 110

9. Кудрявцев А.М. и др. Исследования генома культурных растений и их сородичей применительно к генетической теории селекции: изучение полиморфизма стародавних сортов твердой пшеницы Болгарии // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007. – С. 130 – 131.
10. Одинцова Т.И. и др. Исследования генома культурных растений и их сородичей применительно к генетической теории селекции: исследования спектров дефензинов у устойчивых и восприимчивых к фитопатогенам видов пшеницы // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007. – С. 139-141.
11. Першина Л.А. и др. Использование молекулярно-генетических подходов и методов хромосомной инженерии для изучения и увеличения генетического разнообразия мягкой пшеницы // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007. – С. 147-149.
12. Гришаева Т.М., Додашев С.Я., Богданов Ю.Ф. Изучение генетических и молекулярных аспектов мейоза как основы для реализации изменчивости и сохранения стабильности генома: сравнительное исследование *in silico* мейоз-специфичных когезинов Rec8и их соматических ортологов Rad21 у таксономически далёких организмов // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007.- С. 111-112.
13. Евдокимова Л.И., Ратькин А.В. Исследования генома культурных растений и их сородичей применительно к генетической теории селекции: динамика флавонолрасщепляющей активности бесклеточных экстрактов у мутантов мака (*Papaver somniferum* L.) // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007.- С. 115-116.
14. Шумный В.К. и др. Генетическое разнообразие растений для создания уникальных коллекций и их использования для разработки новых методов селекции // Динамика генофондов. М.: ФИАН, 2007. -С. 168-170
15. Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses/ Zhukov, V.A. et.al.// *Pisum Genetics* . – 2007. – V.39. -P. 19-25.
16. Tonguc M., Weeden N.T. Identification and mapping of molecular markers to er 1 Gene in Pea //Plant Molecular Biology & Biotechnology. – 2010.-V.1.- P.1-5.