

В.Г. ЕФИМЕНКО,
Н.Э. КОЖУХОВА, Ю.М. СИВОЛАП

Южный биотехнологический центр
в растениеводстве УААН и МОНУ, Одесса

ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК И ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ КУКУРУЗЫ



Провели ПЦР-анализ 12 микросателлитных локусов 80 линий и гибридов кукурузы двух регионов Украины. Выявлены наборы аллелей, индивидуальные для каждого генотипа кукурузы, оценен дискриминационный потенциал использованной маркерной системы, осуществлен сравнительный анализ частот встречаемости аллелей и генотипов в обеих выборках и показано возможное участие исследованных SSR-локусов в формировании систем адаптивности у кукурузы.

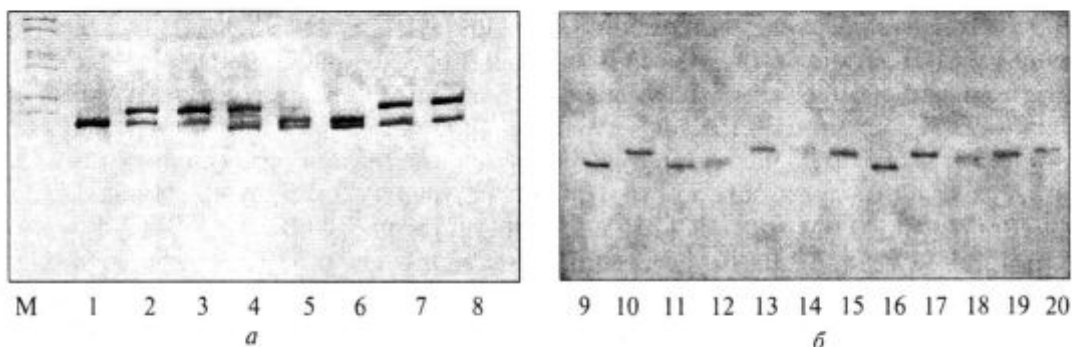
© В.Г. ЕФИМЕНКО, Н.Э. КОЖУХОВА, Ю.М. СИВОЛАП, 2005

Введение. Сохранение и обогащение генетических ресурсов растений, в том числе кукурузы, является актуальной генетико-селекционной проблемой в связи с прогрессирующей эрозией генофонда культурных растений. Оценка генетического разнообразия исходного селекционного материала, характеристика существующего генофонда, определение степени родства сортов требуют наличия точных, надежных и эффективных методов идентификации [1]. Технологии, основанные на анализе полиморфизма ДНК, в частности, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), полностью отвечают таким требованиям [2].

Одним из наиболее информативных источников полиморфизма ДНК является микросателлитная фракция геномов. Предполагается, что микросателлитные локусы нейтральны к факторам отбора, событиям эволюционного ранга и оптимально соответствуют решению задач объективной оценки генетических взаимосвязей между генофондами [3].

Микросателлиты, называемые также SSRs (Simple Sequence Repeats), это высокополиморфные регионы ДНК, содержащие простые тандемно расположенные повторяющиеся мотивы длиной от 1 до 6 нуклеотидов. Они встречаются как интерсперсированные элементы во всех эукариотических и в меньшей степени в прокариотических и зубактериальных геномах. В эукариотах встречается не менее одной области микросателлитов на каждые 100 тысяч оснований последовательности ДНК [4]. Образование и эволюция микросателлитов связаны с процессами рекомбинации ДНК, происходящей вследствие неравного кроссинговера при мейозе или митозе («горячие точки»), геной конверсии или вследствие ошибок при репликации ДНК [5]. Рекомбинационные события обуславливают аллельные различия в числе тандемно повторяющихся единиц, имеющих в данном локусе гипервариабельного района, и вследствие этого являются причиной наблюдаемого полиморфизма длины всего тандемного блока [6, 7].

При определении SSR-состава генома кукурузы [8] проведен сравнительный обзор различных классов повторов и показано, что динуклеотидные микросателлитные повторы (AG)_n и (AC)_n встречаются в геноме кукурузы с частотой один повтор на каждые 800 и 1300 тыс. п.н. соответственно для повтора, длиннее 20 п.н. Встречаемость тринуклеотидных повторов значительно



Электрофореграмма продуктов амплификации локусов phi064 (а) и ps030 (б) генотипов кукурузы: 1 — Oh 43; 2 — Смена; 3 — Сувенир; 4 — Одесский 375; 5 — Кадр 195; 6 — Кадр 217; 7 — Днепровский 335; 8 — ДАР 347; 9 — ГК 26; 10 — П 101; 11 — Роза; 12 — ГК 11; 13 — Одесская 386; 14 — Одесская 221; 15 — ДК 66; 16 — ДК 417-32; 17 — Кадр 307; 18 — ДК 277-10; 19 — А 654; 20 — ДК 366; М — маркер молекулярной массы: ДНК λ /Pst I

меньше. Среди всех возможных тринуклеотидных комбинаций (TTG)_n- и (TTC)_n-повторы наиболее обычны у кукурузы. Также отмечено, что для генома кукурузы характерно преобладание несовершенных повторов (два или более повтора, прерываемых участком неповторяющихся последовательностей).

Характерные для микросателлитной ДНК высокая скорость мутирования, большое аллельное разнообразие и гетерогенность, достигающая более 90 %, открыли широкие перспективы для генетической дифференциации, индивидуальной идентификации, изучения происхождения и родства различных организмов, а также нашли широкое применение в генетико-селекционных исследованиях важных сельскохозяйственных культур, в частности кукурузы [9—15].

Цель наших исследований заключалась в сравнении аллельного состава микросателлитных локусов у генотипов кукурузы двух климатических зон Украины и определении их участия в формировании систем адаптивности. Для достижения поставленной цели установили следующие задачи: ПЦР-анализ 12 SSR-локусов; оценка дискриминационного потенциала выбранной маркерной системы; сравнительный анализ частот встречаемости аллелей и генотипов; сравнение аллельного состава микросателлитных локусов в двух выборках.

Материалы и методы. *Растительный материал.* Материалом исследований служили 24 линии и 11 гибридов (простых, тройных линейных, двойных межлинейных) кукурузы (*Zea mays* L.) Южного региона Украины, а также 31 линия и 14 гибридов Восточного региона. Инбредные ли-

нии имеют различные родословные и представляют относительно широкий спектр образцов зародышевой плазмы кукурузы. Семена любезно предоставлены заведующим лабораторией селекции раннеспелых и среднеспелых гибридов кукурузы Института зернового хозяйства (Днепропетровск) В.Ю. Черчелем и с.н.с. отдела селекции и семеноводства кукурузы Селекционно-генетического института (Одесса) Б.Ф. Вареником.

Выделение ДНК осуществляли из смеси 7-дневных этиолированных проростков каждого генотипа согласно методике [16].

Таблица 1
Значения индекса полиморфности (PIC)
12 микросателлитных локусов у генотипов кукурузы
Южного и Восточного регионов Украины

Локус	Значения PIC у генотипов		Средний PIC на локус
	Восточного региона	Южного региона	
phi083	0,543	0,480	0,512
phi127-2	0,760	0,789	0,775
ps030	0,718	0,571	0,645
phi047	0,569	0,490	0,530
phi070	0,605	0,658	0,632
phi113	0,245	0,111	0,178
phi091	0,531	0,520	0,526
phi051	0,492	0,526	0,509
phi115	0,444	0,497	0,471
phi064	0,771	0,797	0,784
phi027	0,551	0,480	0,516
phi021	0,477	0,539	0,508
Средний PIC на выборку	0,559	0,538	0,549

ПЦР-амплификацию проводили на термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) в следующем температурном режиме: начальная денатурация — 93 °С, 1,5 мин; 30 циклов — 93, 55, 70 °С — по 30 с; заключительная элонгация — 70 °С, 2 мин. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl pH 8,4, 2 мМ MgCl₂, 0,01 % твин-20, 0,8 мМ каждого dNTP, по 5 мкМ прямого и обратного SSR-праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. ДНК-полимеразы Taq.

Проводили ПЦР-анализ 12 микросателлитных локусов, расположенных на разных хромосомах: phi064 (хромосома I), phi127-2 (II), nc030,

phi047 (III), phi021, phi083 (IV), phi113 (V), phi070 (VI), phi051, phi091 (VII), phi115 (VIII), phi027 (IX). Дизайн праймеров взят из MaizeDB [17].

Гель-электрофорез. SSR-ампликоны (5 мкл реакционной смеси) фракционировали в 10 % неденатурирующем полиакриламидном геле в течение 1,5 ч при 500 В в 1 × TBE-буфере в аппарате для вертикального электрофореза («Hoefer Scientific Instruments», США). Продукты амплификации окрашивали азотнокислым серебром [18]. Амплифицированные аллели кодировали «1», «2», ..., «n» от низкомолекулярного по возрасту молекулярной массы.

Таблица 2

Сравнение информативности SSR-локусов для дифференциации генотипов кукурузы

линий	Количество		Среднее количество аллель/локус	PIC (среднее значение)	Литературный источник
	SSR-локусов	аллелей			
12	34	2—11	6,2	0,40—0,89 (0,74)	[8]
8	6	—	4,2	—	[9]
33	27	—	6,8	—(0,72)	[18]
58	200	2—12	—	0,06—0,91 (0,48)	[19]
65	60	2—17	—	0,41—0,91 (0,66)	[20]
40	83	2—12	4,9	—	[21]
9	69	2—4	—	—	[22]
55	12	2—6	3,6	0,11—0,80 (0,56)	По результатам данного анализа

Таблица 3

Значения частот встречаемости аллелей 12 микросателлитных локусов у генотипов кукурузы Южного и Восточного регионов Украины

№ аллеля	Локус											
	phi083	phi127-2	nc030	phi047	phi070	phi113	phi091	phi051	phi115	phi064	phi027	phi021
Восточный регион												
1	0,172	0,292	0,520	0,500	0,439	0,857	0,663	0,439	0,666	0,042	0,454	0,552
2	0,620	0,250	0,419	0,417	0,441	0,143	0,054	0,561	0,334	0,166	0,319	0,414
3	0,208	0,250	0,061	0,083	0,040	—	0,076	0	—	0,375	0,227	0,034
4	—	0,166	—	—	0,080	—	0,207	—	—	0,125	—	—
5	—	0,042	—	—	—	—	0	—	—	0,166	—	—
6	—	0	—	—	—	—	—	—	—	0,126	—	—
Южный регион												
1	0,600	0,063	0,524	0,429	0,470	0,941	0,285	0,457	0,461	0,063	0,400	0,524
2	0,400	0,250	0,381	0,571	0,295	0,059	0,057	0,515	0,539	0,062	0,600	0,429
3	0	0,125	0,095	0	0,176	—	0	0,028	—	0,250	0	0,047
4	—	0,250	—	—	0,059	—	0,629	—	—	0,312	—	—
5	—	0,250	—	—	—	—	0,029	—	—	0,187	—	—
6	—	0,062	—	—	—	—	—	—	—	0,126	—	—

Математический анализ данных. Частоты встречаемости аллелей и генотипов и индексы полиморфности (Polymorphic Index Content — PIC) рассчитывали согласно [15].

Результаты исследований и их обсуждение. *Дискриминация линий и гибридов.* В результате ПЦР-амплификации ДНК 80 исследуемых образцов с использованием 12 пар праймеров к микросателлитным локусам получены уникальные спектры ДНК (рис. 1). Для всех инбредных линий отмечено гомозиготное состояние исследованных локусов, тогда как для гибридов получены и гомо-, и гетерозиготы. Спектр амплифицированной ДНК гибридов включал компоненты спектров линий, участвующих в их создании.

Оценка дискриминационного потенциала маркерной системы. При анализе 12 локусов выявлено от 2 до 6 аллелей на локус в выборке генотипов Южного и Восточного регионов. Среднее число аллелей на локус составило 3,3 в обеих выборках.

Значения индекса полиморфности варьировали от 0,245 (локус phi113) до 0,771 (локус phi064) для генотипов Восточного региона и от 0,111 (локус phi113) до 0,797 (локус phi064) для генотипов Южного региона (табл. 1). Среднее значение PIC по всем исследованным локусам составило 0,559 и 0,538 соответственно для выборок Восточного и Южного регионов. В табл. 2 суммированы данные по информативности SSR-локусов в различных выборках генотипов кукурузы, представленные зарубежными авторами [8, 9, 19—23]. Среднее значение PIC, полученное для использованной в данном исследовании маркерной системы, составляет 0,55. Это ниже, чем в аналогичных исследованиях. Несмотря на то, что эта маркерная система позволила отличить (дискриминировать) все генотипы выборки (55 инбредных линий и 25 гибридов), в дальнейшем SSR-локусы с низким показателем PIC (до 0,5) не будут использоваться для регистрации генотипов. Разрешающая способность маркерной системы будет повышаться за счет анализа других микросателлитных локусов и оценки их дискриминационного потенциала. В результате будут подобраны SSR-локусы (не менее 20) с высоким индексом полиморфности для дифференциации большего количества генотипов.

Сравнительный анализ частот встречаемости аллелей и генотипов. В табл. 3 приведены значения частот встречаемости аллелей 12 исследован-

Таблица 4

Значения частот встречаемости генотипов кукурузы Южного и Восточного регионов Украины

Локус и № аллеля	Частота встречаемости генотипов		Локус и № аллеля	Частота встречаемости генотипов	
	Восточного региона	Южного региона		Восточного региона	Южного региона
phi064			phi127-2		
11	0,045	0,029	11	0,222	0,114
12	0,068	0,058	12	0,027	0,057
14	0,045	0	13	0,194	0,142
22	0,135	0	14	0,055	0
23	0,045	0,029	22	0,111	0,114
24	0,023	0	23	0,055	0,028
25	0	0,058	24	0,027	0
26	0,045	0	33	0,222	0,085
33	0,246	0,235	35	0	0,085
35	0	0,058	44	0,027	0,114
34	0,023	0	46	0,027	0,114
36	0,023	0	55	0,027	0,114
44	0,113	0,206	66	0	0,028
45	0	0,058			
46	0,045	0,029			
55	0,090	0,118			
66	0,068	0,058			
phi083			phi070		
11	0,209	0,467	11	0,772	0,676
12	0,116	0	12	0,113	0,117
22	0,534	0,533	13	0	0,147
33	0,093	0	22	0,113	0,058
phi113			phi091		
11	0,772	0,676	11	0,652	0,285
12	0,113	0,117	12	0,043	0,057
13	0	0,147	13	0,065	0
22	0,113	0,058	22	0,195	0,628
			33	0	0,029
nc030			phi051		
11	0,261	0,437	11	0,439	0,457
12	0,047	0	22	0,561	0,514
13	0,119	0,031	33	0	0,028
14	0,047	0			
22	0,309	0,406			
23	0,071	0,031			
33	0,071	0,093			
phi047			phi027		
11	0,162	0,085	11	0,342	0,296
12	0,186	0,142	12	0,195	0,208
13	0,255	0,285	14	0,024	0
14	0	0,028	22	0,269	0,496
22	0,116	0,171	23	0,024	0
23	0,209	0,171	33	0,122	0
33	0,046	0,028	34	0,024	0
34	0	0,085			
phi021			phi115		
11	0,447	0,469	11	0,444	0,294
12	0,213	0,125	12	0,333	0,411
22	0,329	0,375	22	0,222	0,294
33	0,021	0,031			

ных локусов в двух выборках. Сравнительный анализ частот встречаемости аллелей показал, что самые высокочастотные аллели (выделены в таблице жирным шрифтом) одинаковы в двух выборках по четырем SSR-локусам. Наиболее высокочастотные аллели восьми локусов различны в выборках Южного и Восточного регионов.

В табл. 4 приведены значения частот встречаемости генотипов 12 исследованных локусов в двух выборках. Сравнительный анализ частот встречаемости генотипов кукурузы Южного и Восточного регионов показал, что самые высокочастотные генотипы (выделены в таблице курсивом) одинаковы в двух выборках по шести локусам. По остальным шести локусам отмечены различия в составе высокочастотных генотипов для разных агроклиматических зон. Следует отметить, что для выборки Восточного региона характерно большее количество вариантов генотипов, т.е. большее разнообразие сочетания аллелей, что, возможно, связано с более разнообразной зародышевой плазмой, представленной в выборке генотипов этой зоны.

Различия между составом наиболее высокочастотных аллелей и генотипов, возможно, связаны с наибольшей адаптивностью генотипов к определенным агроклиматическим условиям, так как исследованные микросателлиты входят в состав генов, имеющих значение для формирования систем адаптивности у кукурузы.

Выводы. В результате проведенных исследований полиморфизма микросателлитных локусов выявлены наборы аллелей, индивидуальные для каждого генотипа кукурузы, оценен дискриминационный потенциал использованной маркерной системы, осуществлен сравнительный анализ частот встречаемости аллелей и генотипов в выборках из различных агроклиматических зон и показано возможное участие маркируемых исследованными SSR-локусами участков хромосом в формировании систем адаптивности у кукурузы.

SUMMARY. Microsatellite loci PCR-analysis of 80 maize lines and hybrids from two regions of Ukraine has been carried out. Allelic sets individual for each maize genotype have been revealed and discrimination potential of applied marker system has been determined. Comparative analysis of frequencies of alleles and genotypes occurrence in both samples has been carried out and possible participation of the investigated SSR-loci in formation of maize adaptability system has been shown.

РЕЗЮМЕ. Проведено ПЛР-аналіз 12 мікросателітних локусів 80 ліній і гібридів кукурудзи двох регіонів України.

Виявлено набори алелів, що індивідуальні для кожного генотипу кукурудзи, оцінено дискримінаційний потенціал використаної маркерної системи, здійснено порівняльний аналіз частот зустрічальності алелів і генотипів в обох вибірках і показана можлива участь досліджених SSR-локусів у формуванні систем адаптивності у кукурудзи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Козубенко Л. В., Гурьева И. А. Селекция кукурузы на раннеспелость. — Харьков, 2000. — С. 5—97.
2. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1986. — 51. — P. 263—273.
3. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культур. растений. — 2002. — 34, № 4. — С. 279—296.
4. Wright J., Bentzen P. Microsatellites: Genetic markers for the future // Rev. Fish Biol. Fish. — 1994. — 4. — P. 384—388.
5. Smith G. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover // Science. — 1976. — 191. — P. 528.
6. Wierdl M., Greene C., Datta A., Jinks-Robertson S., Petes T. Destabilization of simple repetitive DNA sequences by transcription in yeast // Genetics. — 1996. — 143. — P. 713—721.
7. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. — 2002. — 38, № 9. — С. 1173—1195.
8. Taramino G., Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize // Genome. — 1996. — 39, № 2. — P. 277—287.
9. Senior M., Heun M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer // Genome. — 1993. — 36. — P. 884—889.
10. Lu H., Romero-Severson J., Bernardo R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize // Theor. Appl. Genet. — 2001. — 105. — P. 622—628.
11. Sharopova N. et al. Development and mapping of SSR markers for maize // Plant Mol. Biol. — 2002. — 48. — P. 463—481.
12. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Вареник Б.Ф. Идентификация инбредных линий кукурузы с помощью произвольно праймированной ПЦР и SSR-ПЦР // Докл. РАХН. — 1999. — № 6. — С. 3—6.
13. Kozhukhova N., Sivolap Yu. Maize genotypes differentiation, identification and registration by SSR-markers // Draft report on the Seventh Session of the working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT) of UPOV. Hanover, Germany. 21—23 November 2001. Document BMT/7/19 Prov. Annex III. P. 11—15.
14. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э. Спосіб реєстрації генотипів кукурудзи // Деклараційний патент на винахід 62244А. Заявл. 07.02.2003; Опубл. 15.12.2003. Бюл. № 12.
15. Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. — 2004. — 40, № 1. — С. 59—66.

16. Сиволоп Ю.М., Календарь Р.Н. Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦП с произвольными праймерами // Генетика. — 1995. — **31**, № 10. — С. 1358—1364.
17. www.maizegdb.org
18. Budowle B., Smith J., Moretti T., DiZinno J. DNA typing protocols // Molecular biology and forensic analysis. — 1991. — P. 130—131.
19. Pejik I., Taramino G. et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs // Theor. Appl. Genet. — 1998. — **97**. — P. 1248—1255.
20. Smith J.S.C. et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree // BMT/4/2, 1997. — 29 p.
21. Enoki H., Chin E. C. L., Shu S. et al. SSR analyses of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan // Theor. Appl. Genet. — 2002. — **104**. — P. 1270—1277.
22. Lu H., Bernardo R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds // Theor. Appl. Genet. — 2001. — **103**. — P. 613—617.
23. Chin E., Senior M., Shu H., Smith J. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation // Genome. — 1996. — **39**. — P. 866—873.

Поступила 18.10.04