

УДК 633.853.52:575

Абугалиева С.И., Волкова Л.А., Жидовинова А.В., Ледовской Ю.С., Турусбеков Е.К.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ СОИ КАЗАХСТАНА

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МАРКЕРОВ

(Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан)

Осуществлен скрининг сортов сои на основе использования ISSR-маркеров. Изучены филогенетические связи генофонда сои Казахстана. Дана оценка уровня генетического разнообразия сортов сои Казахстана на основе использования ISSR-маркеров.

Постоянное возрастание значения сои в мировой экономике обусловлено комплексом ценных свойств культуры и ее многоцелевым использованием. По мнению американских экспертов сое суждено стать самым главным источником белка для потребления человеком в 21 веке.

Семена культурной сои *Glycine max* (L.) Merrill содержат обычно 38-42% белка с варьированием этого показателя от 30 до 50%; 18-25% масла (при этом не содержат холестерина); 10-25% углеводов, а также различные микро- и макроэлементы. Благодаря своему богатому и разнообразному химическому составу, соя, широко используется как продовольственная, кормовая и техническая культура [1-3].

Селекция сои в Казахстане успешно ведется в учреждении МСХ РК, основным из которых является КазНИИЗР [4, 5]. Мировая практика показывает, что в последнее время одним из наиболее актуальных направлений повышения эффективности селекционного процесса, определения чистоты и подлинности семян, паспортизации и защиты интеллектуальных прав селекционеров является использование ДНК-технологий [6-9]. В результате наших исследований впервые осуществлено ДНК-генотипирование сортов сои отечественной селекции с использованием ISSR- и SSR-маркеров, двух классов маркеров, выявляемых в результате полимеразной цепной реакции. В данной работе приведены результаты исследований с использованием ISSR-маркеров, являющиеся одними из высоко полиморфных и эффективных типов маркеров. ISSR (*inter-simple sequence repeats*) – фрагменты ДНК, расположенные между микросателлитными участками, то есть фланкированные микросателлитными локусами [9]. ISSR праймеры, по сравнению с SSR, амплифицируют участки ДНК, связывающие микросателлитные повторности. В качестве праймеров для ПЦР используют ди- и тринуклеотидные микросателлитные повторы. Нуклеотидный состав «якоря» должен отличаться от такового повторов микросателлита, а не служить его аналогичным продолжением. ISSR-праймер при амплификации отжигается только с одного конца микросателлита, расположенного в матричной ДНК. Использование ISSR (как и RAPD) не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров. ISSR характеризуются доминантным типом наследования, относительно высокой точностью и улучшенной воспроизводимостью по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймеров (19-23 п.н.) и более высокой температурой отжига.

По мнению ряда исследователей ISSR-метод является наиболее эффективным для дифференциации генотипов культурной сои [10, 11].

Изучено генетическое разнообразие и филогенетические связи отечественных сортов сои.

Материалы и методы

Материалом исследований служили 48 образцов сортов и линий, в том числе 12 перспективных и допущенных к производственному использованию в Республике Казахстан сортов сои отечественной селекции [4], любезно предоставленные основным автором сортов Ю.Г. Карягиным [10] в рамках проекта «Разработка и внедрение в селекционную практику методов генотипирования и длительного сохранения генофонда сои». Сорта, допущенные к производственному использованию в РК, относятся к раннеспелым (Жалпаксай, Радость), среднеранним (Алматы, Казахстанская 2309, Мисула 1092) и среднеспелым (Вита, Эврика 357) [4].

Выделение тотальной ДНК проводили по стандартной методике Деллапорта с модификациями [11].

Для генотипирования сои использованы ISSR маркеры (*inter simple sequence repeats*), являющиеся одним из высоко полиморфных и эффективных типов маркеров. Для обнаружения ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам (4-12 единицам повтора), несущие на одном из концов последовательность из двух-четырех произвольных нуклеотидов. Использование ISSR-праймеров позволяет амплифицировать фрагменты ДНК, находящиеся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. Использовали 20 ISSR-праймеров от компании University British Columbia (Канада). Длина праймеров варьирует от 15 до 23 нуклеотидов. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Amplifron (США) в 20 мкл реакционного объема, содержащего 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ dNTP, 0,2 мкМ праймера, 1X буфера и 1 единица Taq-полимеразы. Условия ПЦР были следующими: денатурация ДНК в течении 5 минут, 40 циклов из следующих этапов – денатурация 1 мин., отжиг от 45°C до 55°C в зависимости от длины праймера, элонгация 72°C в течении 30 сек. На конечной стадии ПЦР использовали элонгацию в течение 5 мин. Продукты амплификации, полученные в результате ПЦР, разделяли электрофоретически в 1,5% агарозном геле и окрашивали в 0,01% растворе бромистого этидия.

Результаты и их обсуждение

Проведен ПЦР-скрининг сортов и линий сои казахстанской селекции по 14 ISSR-маркерам. При анализе 48 сортов и линий казахстанской и зарубежной селекции в результате скрининга ISSR праймеров было выявлено по 2 аллеля у UBC809 и UBC818; по 3 аллеля у маркеров UBC807, UBC 811, UBC 815, UBC827, UBC835, и UBC 857; по 4 аллеля по маркерам UBC817, UBC 839, UBC 840, UBC 856, UBC 864 и UBC 891, соответственно. Однако, при изучении 12 сортов отечественной селекции было выявлено не более 2 аллелей на локус (табл. 1).

По результатам скрининга всех ISSR-маркеров изучено генетическое разнообразие генофонда сои Казахстана и составлен первичный ДНК-паспорт для всех исследованных коммерческих сортов и линий сои Казахстана (табл. 1).

Таблица 1 – ДНК-паспорт коммерческих сортов сои Казахстана на основе использования 14 ISSR-маркеров

№ п.п.	Сорт	ISSR-маркеры													
		250a	250b	817a	842a	851a	856a	856b	857a	864a	864b	864c	881a	881b	891a
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Алматы	a	b	a	a	b	a	a	a	b	a	b	b	b	a
2	Вита	b	b	a	a	b	a	a	b	b	a	b	a	a	b
3	Гибридная 670	b	b	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	a	a
4	Жалпаксай	a	b	a	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	a
5	Казахстанская 2309	b	b	a	b	a	a	b	b	a	b	a	a	b	a
6	Ласточка	b	b	b	b	b	a	b	a	a	b	a	a	b	b
7	Мисула	b	b	b	a	b	a	a	a	a	b	a	a	a	a
8	Надежда	b	b	a	a	b	a	a	b	a	b	b	a	b	a
9	Нина	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	b	a	b	a
10	Радость	b	b	b	a	b	a	b	a	a	b	a	a	a	a
11	Риза	b	b	a	a	b	b	b	a	b	b	b	a	b	a
12	Эврика	a	b	a	a	b	a	a	a	a	b	b	a	a	b

Таблица 2 – Генетическое сходство и генетические расстояния по Nei (1972) для сортов сои Казахстана

№	Сорт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Алматы	****	0,6429	0,7143	0,7143	0,3571	0,3571	0,5000	0,6429	0,7143	0,4286	0,6429	0,6429
2	Вита	0,4418	****	0,7857	0,6429	0,4286	0,4286	0,5714	0,7143	0,5000	0,5000	0,5714	0,7143
3	Гибридная 670	0,3365	0,2412	****	0,8571	0,5000	0,5000	0,7857	0,6429	0,5714	0,7143	0,6429	0,6429
4	Жалпаксай	0,3365	0,4418	0,1542	****	0,5000	0,5000	0,6429	0,5000	0,5714	0,7143	0,6429	0,6429
5	Казахстанская 2309	1,0296	0,8473	0,6931	0,6931	****	0,7143	0,5714	0,7143	0,5000	0,6429	0,5714	0,4286
6	Ласточка	1,0296	0,8473	0,6931	0,6931	0,3365	****	0,7143	0,5714	0,5000	0,7857	0,5714	0,5714
7	Мисула	0,6931	0,5596	0,2412	0,4418	0,5596	0,3365	****	0,7143	0,6429	0,9286	0,5714	0,7143
8	Надежда	0,4418	0,3365	0,4418	0,6931	0,3365	0,5596	0,3365	****	0,7857	0,6429	0,7143	0,7143
9	Нина	0,3365	0,6931	0,5596	0,5596	0,6931	0,6931	0,4418	0,2412	****	0,5714	0,6429	0,78,57
10	Радость	0,8473	0,69,31	0,3365	0,3365	0,4418	0,2412	0,0741	0,4418	0,5596	****	0,6429	0,6429
11	Риза	0,4418	0,5596	0,4418	0,4418	0,5596	0,5596	0,5596	0,3365	0,4418	0,4418	****	0,5714
12	Эврика	0,4418	0,3365	0,4418	0,4418	0,8473	0,5596	0,3365	0,3365	0,2412	0,4418	0,5596	****

Примечание: Выше диагонали показано генетическое сходство по Нею (1978), ниже диагонали генетические расстояния

С использованием статистической программы POP GENE 32 установлены генетические расстояния для изученного генофонда по Nei (1972) (табл. 2). Показано, что средний уровень генетического разнообразия для сортов сои Казахстана равен 0,351. Для сравнения, индекс генетического разнообразия китайских сортов сои,

определенный с помощью SSR-маркеров варьировал в пределах 0,456-0,928 (в среднем 0,815) [13], низкий уровень генетического разнообразия был отмечен среди сортов Северной Америки [14]. При сравнении сортового генофонда и диких предшественников сои были выявлены генетические расстояния в пределах 0.08-0.76 со средним значением 0.52.

В результате филогенетического анализа было идентифицировано три отчетливых кластера для 12 сортов сои. На приведенном ниже рисунке представлена дендрограмма, полученная с использованием метода UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with averages*). В первый кластер вошли сорта Алматы, Жалпаксай, по данным В.Г. Карягина и С.В. Дидоренко (2010) отличающиеся низкорослостью, наименьшим количеством продуктивных узлов (9,8-10,6), урожайностью 37,0-37,2 ц/га; Гибридная 670, превосходящий все изученные районированные сорта по массе 1000 семян, кол-ву бобов с растения [12], и Вита.

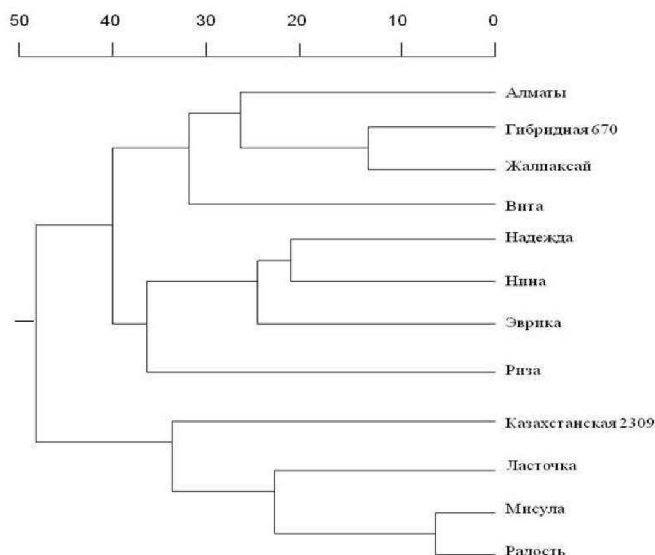


Рисунок – Филогенетическое древо сортов сои Казахстана, построенное на основе использования 14 полиморфных ISSR-маркеров и метода UPGMA

Во второй кластер вошли сорта Надежда, Нина, Эврика и Риза, отличающиеся урожайностью 32,2-33,2 ц/га. Третий кластер составили сорта Казахстанская 2309, Ласточка, Мисула и Радость. Сорта Мисула 1092, Ласточка, Казахстанская 2309 характеризовались наименьшей массой 1000 семян (г) – 155-160 г против 190 г у Гибридной [12]. В то же время данные по урожайности за 2007-2009 гг. составила у сортов Мисула 1092 и Ласточка – 37,73 и 39,73. Сорта Казахстанская 2309, Радость и Ласточка характеризовались сходным вегетационным периодом – от 127 до 129 дней, соответственно. Таким образом, генофонд районированных в Казахстане сортов сои паспортизован и дифференцирован по ряду ISSR-маркеров.

Проведена оценка генетического разнообразия и создан ДНК-паспорт 12 сортов сои Казахстана на основе использования 14 полиморфных ISSR-маркеров (inter simple sequence repeats). Установлено генетическое расстояние и уровень разнообразия для изученного материала. На основе анализа 14 ISSR-маркеров показано, что средний уровень генетического разнообразия для сортов сои Казахстан равен 0,35. Филогенетический анализ позволил идентифицировать три отчетливых кластера для 12 сортов сои.

Для увеличения продуктивности и адаптационных возможностей сорта необходимо расширение его генетической основы. В селекционный процесс должен привлекаться материал с известным спектром изменчивости признаков и идентифицированными генами. Выявлению диапазона изменчивости способствует широкомасштабный скрининг генофонда по продуктивности, скороспелости, качеству зерна, устойчивости к болезням, а также по признакам, лимитирующим производство культур.

Литература

- 1 Теплякова Т.Е. Соя // В сб.: Теоретические основы селекции. Том III. Генофонд и селекция зернобобовых культур. Под ред. Б.С. Карловича и С.И. Репьева. С-Пб., 1995. – С.196-217.
- 2 Зеленцов С.В. Современное состояние систематики культурной сои *Glycine max (L.) Merrill.* / С.В. Зеленцов, А.В. Кочегура Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. Краснодар. – 2006. – Вып.1(134). – С.34-48.
- 3 Бойко А.Т., Карягин Ю.Г. Соя - высокобелковая культура / ОАО Vita .- Алматы: Б.и. 2004.- 18с.
- 4 Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан. Сорта растений. (Официальное издание). Алматы. 2009.
- 5 Каталог допущенных к использованию сортов и гибридов сельскохозяйственных культур селекции Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства. «Асыл кітап». С.98-107.
- 6 Archak S. Plant DNA fingerprinting: an overview // AgBiotechNet. – 2000. – V.2 – P.1-5.

- 7 Ovesna J., Polakova K., Leisova L. DNA analyses and their application in plant breeding // *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. – 2002. – V.1. – P. 29-40.
- 8 Глазко В.И. Сохранение биоразнообразия с использованием молекулярно-генетических маркеров // *Аграрная наука*. – 2000. – №8. – С. 13-14.
- 9 Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // *Аграрная Россия*. – 2006. – №6. – С. 4-21.
- 10 Глазко В.И., Дубинин А.В., Календарь Р.Н., Глазко Г.В., Шерепитко В.И., Созинов А.А. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров // *Цитология и генетика*. – 1999. – Т. 33. – № 5. С. 47-51.
- 11 Брик А. Ф., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетический полиморфизм сои, детектированный ПП ПЦР, SSRP и ISSR // *Цитология и генетика* // - 2001. – т. 35. – N. 5. – P. 3-9.
- 12 Карягин Ю.Г., Дидоренко С.В. Результаты сравнительного изучения сортов сои отечественной селекции в условиях юго-востока Казахстана // *Международная научно-практическая конференция «Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур», 24-25 июня 2010 г. С. 133-135.*
- 13 Delaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA minipreparation. Version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – V.4. – P. 19-21.
- 14 Nei M. Genetic distance between populations // *Amer. Nat.* – 1972. – V.106. – P. 283-292.
- 15 Wang L.X., Guan R.X., Li Y.-H., Luan W.J., Li W., Ma Y.S., Liu Z.X., Chang R.Z., Qiu L. Genetic diversity of Chinese spring soybean germplasm revealed by SSR markers // *J. Plant Breed.* – 2008. – V. 127, № 1. – P. 56-61.
- 16 Brown-Guedira G.L., Thompson J.A., Nelson R.L., Warburton M.L. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers // *Crop Science*. – 2000. – V.40. – P.815-823.

Summary

ISSR-analysis of soybean cultivars was done. Phylogenetic relationships among Kazakhstan's cultivars were studied. The level of genetic diversity of soybean of Kazakhstan was evaluated.

Тұжырым

ISSR- маркерлерін қолдану негізінде соя сорттарының скринингі өткізілді. Қазақстандағы соя генофондының филогенетикалық ерекшеліктері талданды. ISSR – маркерлерін қолдану негізінде Қазақстандағы соя сорттарының генетикалық дәрежесінің әр түрлілігінің бағасы берілді.

Алыбаева Р.А., Кенжебаева С.С.

СКРИНИНГ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КАДМИЮ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

Были исследованы различные генотипы озимой пшеницы в Восточно-Казахстанских агроценозах, с целью оценки накопления кадмия. Показано, что при количествах кадмия, превышающем ПДК в почве, содержание его в зерне превышает ПДК для семян. Исследование также выявило значительные различия в накоплении кадмия по генотипическому признаку. Скрининг различных генотипов озимой пшеницы на устойчивость к кадмию в лабораторных условиях позволил выявить устойчивые и чувствительные к кадмию формы озимой пшеницы.

Загрязнение биоты, атмосферного воздуха и питьевых вод токсичными веществами является одной из основных проблем крупных урбанизированных центров [1,2]. Особую опасность, среди загрязнителей окружающей среды, представляют экотоксиканты - тяжелые металлы и их соединения, пестициды и радионуклиды [3,4]. Считается, что среди химических элементов тяжелые металлы являются наиболее токсичными [5]. Поскольку тяжелые металлы поступают в организм человека и травоядных животных в основном с растительной пищей, то исследования загрязнения сельскохозяйственных растений в техногенных агроценозах приобретают особое значение.

Исследованиями ряда авторов показано, что растения, выращиваемые на загрязненных почвах, показывают значительные межвидовые различия в ответных реакциях на загрязнение [6,7]. Отдельные сорта различных видов продовольственных культур также проявляют существенные различия по устойчивости к действию почвенных загрязнителей, что указывает на возможность управления признаками техногенной устойчивости селекционным методом. Создание толерантных к загрязнителям сортов является составной частью проблемы общего гомеостаза и адаптивной превентивной селекции. На первой стадии этого процесса необходимо изучение генофонда культурных и дикорастущих растений и выделения доноров, накапливающих минимальное количество экотоксикантов в товарной части урожая [6].

Наиболее острая проблема, решение которой имеет практическое значение, является загрязнение тяжелыми металлами агроценозов вблизи крупных промышленных центров. Город Усть-Каменогорск является крупным промышленным центром Казахстана. В последние годы реализация многих природоохранных