

УДК 631.147:582.951.4

А.К. Есимсеитова, А.А. Какимжанова*
 РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, Казахстан,
 *e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

Изучение генетического разнообразия образцов картофеля микросателлитными маркерами

В работе использовали следующие методы исследований: выделение и очистка ДНК из образцов картофеля, определение количества и чистоты выделенной ДНК, амплификация ДНК с SSR-праймерами, электрофорез в полиакриламидном геле, построение дендрограммы с использованием алгоритма UPGMA и компьютерной программы TREECON.

В исследованиях использовали 7 пар микросателлитных праймеров для оценки полиморфизма 48 сортов казахстанской и зарубежной селекции, которые в совокупности генерировали 41 амплификационных фрагментов размером от 111 до 244 п.н. Уровень полиморфизма изученных локусов оказался достаточно высоким и составил 97,6%. На основе полученных SSR-аллелей методом кластерного анализа были определены генетические расстояния между 48 генотипами картофеля и построена дендрограмма.

Ключевые слова: картофель, сорт, ДНК, SSR-маркер, локус, аллель

А.Қ. Есимсеитова, А.Ә. Кәкімжанова

Микросателлитті маркерлермен картоп үлгілерінің генетикалық әр түрлілігін зерттеу

Зерттеу жұмысында келесі әдістер қолданылды: картоптың селекциондық клоны мен сорттарынан ДНК-ны бөліп алу және тазалау, бөлініп алынған ДНК-ның тазалығы мен санын анықтау, ДНК-ны SSR праймерімен амплификациялау, полиакриламид гелінде электрофорез жүргізу, TREECON компьютерлік бағдарламасы мен UPGMA алгоритмін қолданып дендрограмма құрастыру.

Зерттеу жұмысында шетелдік және қазақстандық селекциясының 48 сортының полиморфизміне баға беру үшін 7 жұп микросателлитті праймер қолданылған. Олар өз кезегінде өлшемі 111 - 244 ж.н. болатын 41 амплификациялық фрагмент берді. Зерттелген локустардың полиморфизм деңгейі жоғары болды және ол 97,6 %-ды құрады. SSR аллельдердің негізінде кластерлік талдау әдісімен картоптың 48 генотиптер арасындағы генетикалық алшақтық анықталды және дендрограмма құрылды

Түйінді сөздер: картоп, сорт, ДНК, SSR-маркер, локус, аллель.

A.K. Esimseitova, A.A. Kakimzhanova

Study of genetic diversity potato samples microsatellite markers

We used the following methods: isolation and purification of DNA from potato, quantification and purity of the isolated DNA, DNA amplification primers, SSR- polyacrylamide gel electrophoresis, the construction of a dendrogram using UPGMA algorithm and a computer program TREECON.

The studies used 7 pairs of microsatellite primers to assess polymorphism 48 grades of Kazakhstani and foreign selection, which together generate 41 amplification fragments ranging in size from 111 to 244 bp. Polymorphism loci studied was quite high and amounted to 97.6% . On the basis of SSR- alleles method of cluster analysis were identified genetic distances between 48 genotype of potatoes and tree was constructed.

Keywords: potato variet, DNA, SSR- marker locus, allele.

В последние годы проблема идентификации видов и сортов растений становится все более актуальной в связи с ускорением селекционного процесса и появлением большого числа новых форм. Особое внимание уделяется разработке эффективных методов для использования в сортоиспытании, селекции, семеноводстве и контроле семенного материала. Для улучшения и создания перспективных сортов картофеля в мире все

шире используются биотехнологические методы, которые значительно сокращают сроки проведения традиционной селекции и снижают затраты ручного труда.

Одним из главных методологических подходов в изучении генетического полиморфизма растений является применение молекулярных маркеров. Эти маркеры позволяют различать виды и подвиды растений, а также давать количественную характеристику

их генетического и аллельного разнообразия. С введением молекулярных маркеров в практику биологических исследований появились новые возможности детального изучения структуры и организации генома растений и количественной оценки степени сходства/различия на меж- и внутривидовом уровне. Для селекции растений особое значение имеет использование молекулярных маркеров для различения и идентификации сортов культурных растений, а также контроля за переносом генетического материала от дикорастущих сороричей при отдаленных скрещиваниях.

Микросателлитные последовательности ДНК являются наиболее доступными, простыми, удобными и относительно недорогими маркерами, пригодными, прежде всего, для идентификации генотипов растений. Их преимущество - кодоминантное наследование - позволяет различать гомо- и гетерозиготные растения. Использование SSR-маркеров для генотипирования основано на высокой информативности данного метода. Высокий уровень полиморфизма микросателлитов, относительно равномерное их распределение в эухроматиновой части геномов и широкая представленность сделали их чрезвычайно популярными. Гипервариабельные микросателлиты представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма популяций растений. Также использование SSR-маркеров позволяет выявить филогенетические взаимоотношения [1].

Материалы и методы

В качестве объектов исследований по генотипированию использовали 48 генотипов картофеля, районированных в Казахстане, из них 27 сортов казахстанской селекции, 3 сорта зарубежной селекции, 6 сортов российской селекции и 9 сортов белорусской селекции. Также для идентификации использовали 3 линии картофеля, полученные методами биотехнологии в лаборатории биотехнологии и селекции растений НЦБ.

Использовали SSR-праймеры длиной 18-24 нуклеотида для индивидуальных картированных ядерных микросателлитов

картофеля отобранные по литературным источникам [2].

Выделение ДНК из ростков глазков клубней картофеля проводили по методике Edwards, 1991 [3].

Для SSR-анализа ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 30 мкл состава: 10x Tag буфер - 3,0 мкл; смесь 4 dNTPs (10 mM) - 2,4 мкл; MgCl₂ (25 mM) - 3,0 мкл; прямой и обратный SSR - праймер (10 pM) по 2,0 мкл; Tag ДНК полимеразы (5 ед/мкл) - 0,4 мкл; ДНК (10 нг/мкл) - 3,0 мкл.

Использовали следующий режим амплификации: 1) предварительная денатурация при 94°C в течение 5 мин; следующие 30 циклов: 30 с - денатурация при 94°C; 30 с - отжиг праймера (температура отжига - в зависимости от используемых в анализе SSR - праймеров); 30 с синтез при 72°C; конечная элонгация при 72°C в течении 5 мин.

Разделение немеченых продуктов амплификации, полученных с праймерами к SSR-последовательностям, проводили в неденатурирующем 8% и 12%-м полиакриламидном геле и окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали при УФ-свете с использованием аппарата GelDoc XR (BioRad). Для построения дендрограммы использовали алгоритм UPGMA и компьютерную программу TREECON.

Результаты и их обсуждение

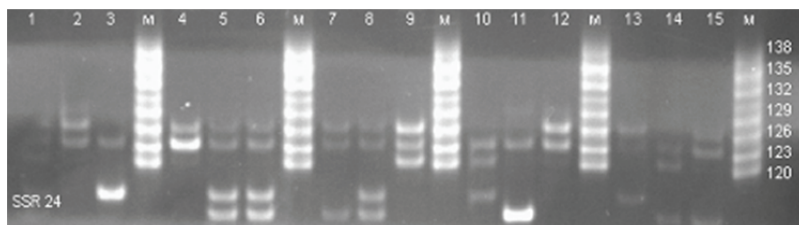
Одним из основных этапов проведения молекулярно-генетических исследований, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) является выделение и очистка ДНК из растительной ткани. С помощью метода Edwards провели выделение и очистку ДНК сортов и селекционных клонов картофеля. Концентрация выделенной ДНК сортов и селекционных клонов картофеля варьировала от 180,0 до 3597,9 нг/мкл. Чистота выделенных образцов ДНК сортов и селекционных клонов (отношение D₂₆₀/D₂₈₀) колебалась от 1,73 до 2,13. Выделенную ДНК сортов и селекционных клонов картофеля использовали в ПЦР в концентрации 10 нг/мкл.

Оценку полиморфизма 48 сортов картофеля казахстанской и зарубежной селекции, допущенных к посеву, проводили с использованием 7 пар SSR-праймеров, которые

в совокупности генерировали 41 фрагментов амплификации длиной от 111 до 244 п.н.

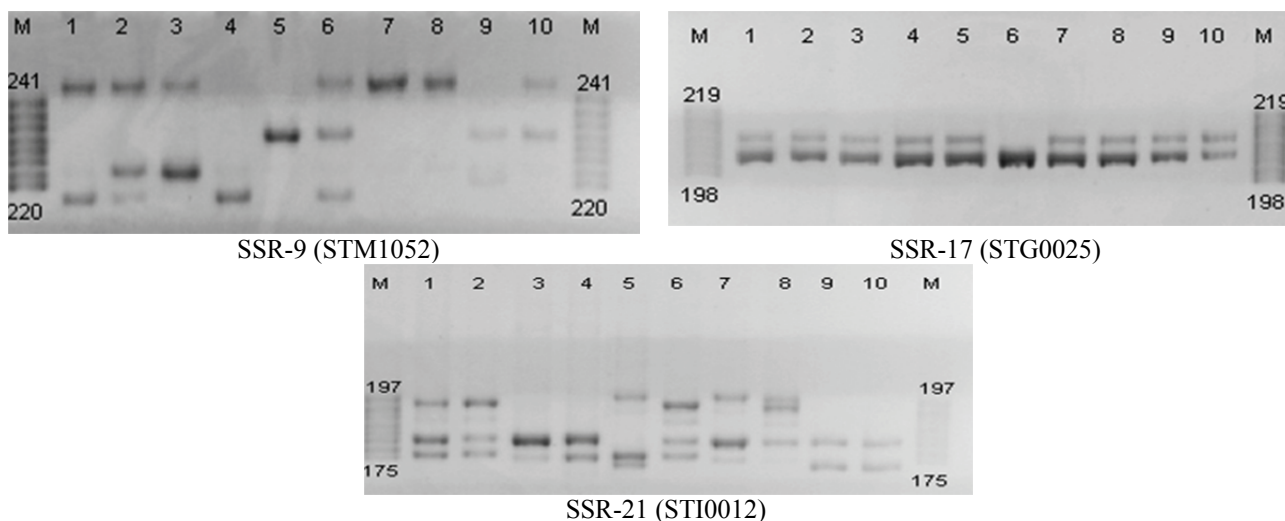
Число аллелей на локус в изученной выборке сортов варьировало от трех до 10 и в среднем составило 5,9. Уровень полиморфизма изученных локусов оказался достаточно высоким и составил 97,6%.

Аллельный состав микросателлитных локусов для каждого сорта определяли по набору индивидуальных фрагментов ДНК, амплифицированных парой праймеров, специфичных к уникальным последовательностям, фланкирующим определенный микросателлит (рисунки 1-2).



М – маркер 120-141 п.н., 1-Аладин, 2-Алая Заря, 3-Альянс, 4-Астана, 5-Ауыл, 6-Жанайсан, 7-Кокчетавский ранний, 8-Латона, 9-Мирас, 10-Невский, 11-Никитка, 12-Фирменный, 13-Ресурс, 14-Лорх, 15-Жуковский ранний

Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов микросателлитного анализа для 15-ти сортов картофеля с праймером SSR-24



М – маркер 220-241 п.н. (SSR-9), М-маркер 198-219 п.н. (SSR-17) М-маркер 175-197 п.н. (SSR-21); 1-Журавинка, 2-Вектар, 3-Манифест, 4-Янка, 5-Лад, 6-Зорачка, 7-Уладар, 8-Лиляя, 9-Бриз, 10-Скарб

Рисунок 2 – Электрофореграммы SSR-анализа для 10-ти сортов картофеля с праймерами SSR-9, SSR-17, SSR-21

Частота встречаемости различных аллелей 7 микросателлитных локусов в изученных сортах и селекционных клонах картофеля варьировала от 2% до 100%. При этом подавляющее большинство аллелей встречалось с частотой до 50%.

У анализируемых образцов картофеля оценивали полиморфизм по семи локусам, учитывали частоту встречаемости уникальных

аллелей, которые присутствовали только у одного сорта и редких аллелей, частота встречаемости которых не превышала 5%. В зависимости от локуса, число редких аллелей варьировало от нуля (STM001b, STM1104, STI0012) до трех (STM0031).

С использованием полученных данных методом кластерного анализа были определены генетические расстояния между 48 генотипами

картофеля и построена дендрограмма (рисунок 5). Генетические расстояния между изученными генотипами картофеля варьировали от 0,1 до 0,5. На основе таблицы попарных генетических расстояний была построена дендрограмма по методу UPGMA, отражающая филогенетические отношения сортов картофеля, районированных в Казахстане, и российских и белорусских сортов. На дендрограмме, отражающей генетические отношения между сортами,

выделяются два кластера, которые соответствуют географическому происхождению сортов. В первый кластер вошли сорта казахстанской и российской селекции. Второй кластер сформирован из сортов картофеля белорусской селекции, которые у нас не возделываются. Таким образом, районированные сорта картофеля Казахстана, российской и белорусской селекции генетически охарактеризованы с использованием 7-ми SSR-маркеров.

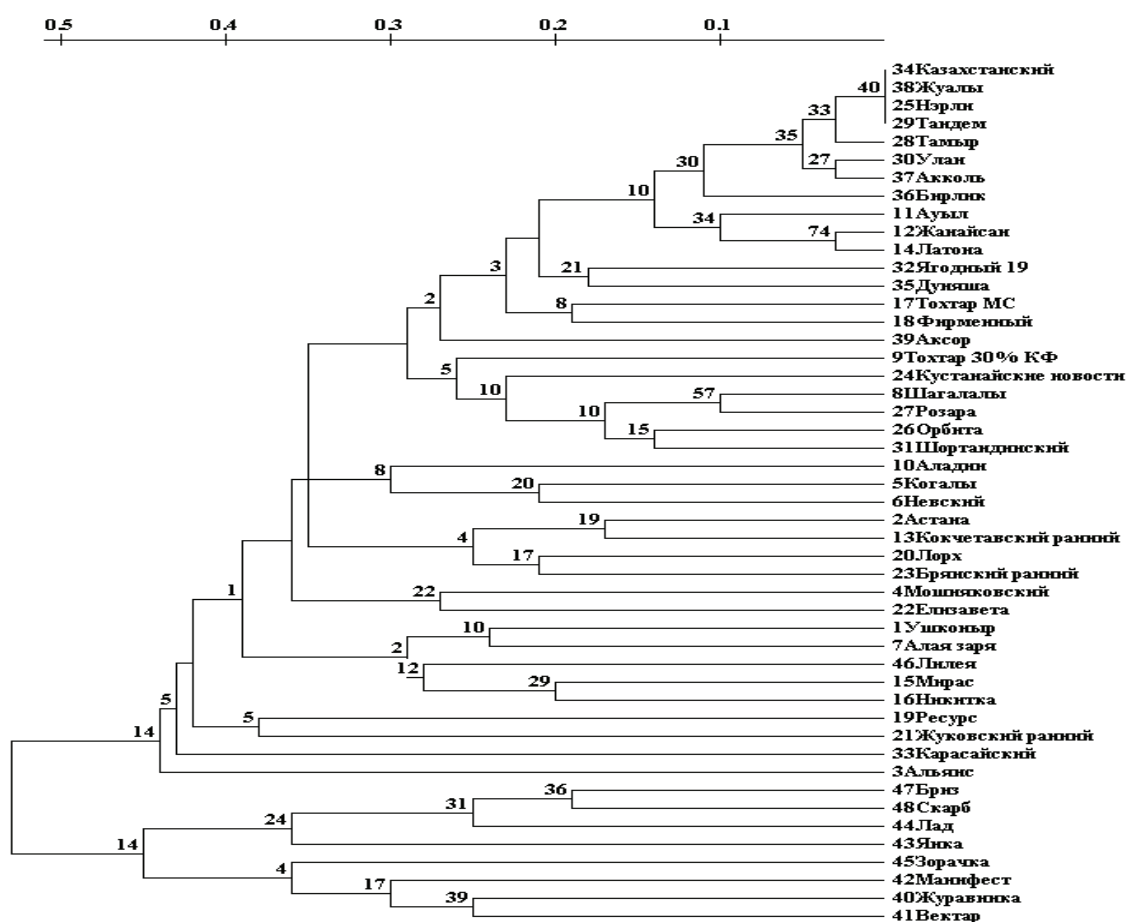


Рисунок 3 – Филогенетическое древо сортов картофеля, районированных в Казахстане, а также сортов российской и белорусской селекции при использовании 7-ми SSR-маркеров

Для сортов и селекционных клонов картофеля высокий уровень полиморфизма удалось обнаружить по микросателлитным локусам. Этим и определяется ценность данного метода для оценки генетического разнообразия и достоверной идентификации генотипов картофеля. Анализ полиморфизма

монолокусных хромосомо-специфичных микросателлитов проводили с использованием ПЦР с микросателлитными праймерами. Оценку полиморфизма 48 сортов и селекционных клонов картофеля казахстанской и зарубежной селекции проводили с использованием 7 пар SSR-праймеров, которые

в совокупности генерировали 41 фрагмент амплификации длиной от 111 п.н. до 244 п.н. На основе изученных SSR-аллелей методом кластерного анализа были определены

генетические расстояния между 48 сортами картофеля и построена дендрограмма. Генетические расстояния между изученными сортами картофеля варьировали от 0,1 до 0,5.

Литература

- 1 Yumiko F., Hiroyuki F., Hiroshi Y. Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers // *Breeding Science*. - 2009. - Vol. 59. - P.159-167.
- 2 Ghislain M., Nunez J., Rosario Herrera M., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato // *Molecular Breeding*. - 2009. - Vol. 23. - P. 377-388.
- 3 Edwards S.K., Johnstone C., Thompson C. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* – 1991. - Vol. 19. - № 6. - P.1349.