

Изучение генетического сходства сортов и линий гороха в Республике Башкортостан*

*К.П. Гайнуллина, к.б.н.,
Башкирский НИИСХ УФИЦ РАН*

Горох – основная зернобобовая культура в Российской Федерации и Республике Башкортостан [1]. Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), по посевным площадям зернового гороха (1039,9 тыс. га) наша страна занимает второе место в мире, уступая лишь Канаде [2]. Наибольшие посевы гороха сосредоточены в Среднем Поволжье, Татарстане, Башкортостане, Центрально-Чернозёмной зоне. Большое распространение гороха объясняется его высокой урожайностью, питательностью зерна, сбалансированностью аминокислотного состава, замечательными вкусовыми качествами [3, 4].

Важная роль в селекции новых высокопродуктивных сортов гороха отведена исходному материалу [5]. На протяжении многих лет в Чишминском селекцентре по растениеводству используется принцип подбора родительских пар методом контрастных признаков, в основе которого лежит генетическая отдалённость [6]. Применение современных методов молекулярной биологии позволяет снизить трудоёмкость работы, сократить время анализа и дополнить результаты полевой оценки генетического разнообразия сортообразцов, используемых в качестве исходного материала для селекции гороха [7].

Как показано рядом исследователей, наиболее удобными маркёрами для выявления генетического

полиморфизма являются микросателлиты, которые представляют собой tandemно повторяющиеся последовательности, состоящие из мономеров длиной от 1 до 6 пар оснований. При этом для многих культурных растений установлено, что динуклеотидные повторы встречаются в их геномах чаще остальных [8, 9]. Как правило, микросателлиты относятся к эухроматиновой части генома, и темпы их мутирования очень высоки, что обуславливает существование множественных кодоминантных аллелей. Это позволяет с успехом использовать данный тип ДНК-маркёров для определения генетического разнообразия и степени генетического родства [10].

Целью исследования стала оценка ДНК-полиморфизма сортов гороха посевного и определение степени их генетического сходства на основе анализа микросателлитных локусов.

Материал и методы исследования. Исследование проводили в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН. Материалом для исследования послужили 12 сортообразцов гороха местной, 4 отечественной и 17 зарубежной селекции.

Молекулярно-генетический анализ образцов гороха проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по 5 динуклеотидным локусам микросателлитов (STR), взятым из геномной библиотеки микросателлитных локусов Agrogene® (Moissy Cramayel, Франция). Их описание представлено в таблице.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Республики Башкортостан молодым учёным и молодёжным научным коллективам в 2018 г. (Постановление Правительства Республики Башкортостан от 7 февраля 2018 г. № 56)

Характеристика исследованных микросателлитных маркёров гороха посевного

STR-маркёр	Последовательность праймера 5'→3'	Число аллелей	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Группа сцепления
AA200	accgaagagcattttcctaag tccatcagttccctaattcacc	4	220	VI
AA255	acaagtattccaagagatggg gcatttgtgtagttacaatttgg	3	295	II
AB28	cctgagtcacacataggagat gcagaagtatttgacttgatggaa	4	377	I
AD147	gcccaagttcttctgaatcc aaattcgagagcgtttgttac	7	330	I
D21	tattctcctccaaaatttcctt gtcaaaattagccaaattcctc	6	200	I

Примечание: п.н. – пар нуклеотидов

С праймером AA255 амплифицировалось три несцепленных локуса, среди которых наиболее информативным оказался микросателлитный локус, детектируемый в диапазоне 295 п. н., который мы и использовали для оценки ДНК-полиморфизма сортообразцов гороха.

Семена гороха проращивали в чашках Петри. ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (компания «Fermentas»). ПЦР проводили в амплификаторе ДТ-322 (ДНК-технология). Конечный объём реакционной смеси составлял 26 мкл и содержал 2 мкл раствора тотальной геномной ДНК, 10 мкл раствора Dream Taq™ PCR Master Mix (компания «Fermentas»), по 2 мкл каждого из пары праймеров (ЗАО «Евроген») и 10 мкл стерильной деионизированной воды. Амплификация проводилась по следующей программе: денатурация при 94°C – 1 мин.; три цикла: денатурация при 94°C – 30 сек., отжиг праймеров при T_m – 20 сек., элонгация при 72°C – 5 сек.; 33 цикла: денатурация при 94°C – 15 сек., отжиг праймеров при T_m – 20 сек., элонгация при 72°C – 1 мин.; конечная элонгация при 72°C – 30 мин. Температуру отжига праймеров длиной более 20 нуклеотидов рассчитывали исходя из количества пуриновых (A, G) и пиримидиновых (T, C) оснований по упрощённой формуле:

$$T_m = 22 + 1,46 \cdot (2 \cdot (G + C)) + (A + T), \text{ } ^\circ\text{C}, \quad (1)$$

где G – количество нуклеотидов с гуанином в составе праймера;

C – количество нуклеотидов с цитозином в составе праймера;

A – количество нуклеотидов с аденином в составе праймера;

T – количество нуклеотидов с тиминем в составе праймера.

Затем полученную температуру отжига олигонуклеотидов корректировали эмпирическим путём.

Продукты амплификации размером более 250 п.н. (AA255, AB28, AD147) разделяли методом электрофореза в 3-процентном агарозном геле, менее 250 п. н. (AA200, D21) – в 6-процентном полиакриламидном геле.

Информативность изученных SSR-маркёров оценивали по величине PIC (Polymorphism Information Content), рассчитанной по формуле:

$$PIC_j = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2, \quad (2)$$

где i – i-й аллель j-го маркёра;

n – количество аллелей j-го маркёра;

P – частота аллелей.

Математическую обработку данных проводили общепринятыми методами, кластерный анализ – с помощью программы StatSoft Statistica 6.0.

Результаты исследования. В нашем исследовании при оценке 33 сортообразцов гороха посевного с помощью пяти пар SSR-праймеров суммарно было выявлено 23 полиморфных маркёра, в среднем 4,6 маркёра на локус. Аллели по каждому изученному локусу визуализировались достаточно чётко (рис. 1).

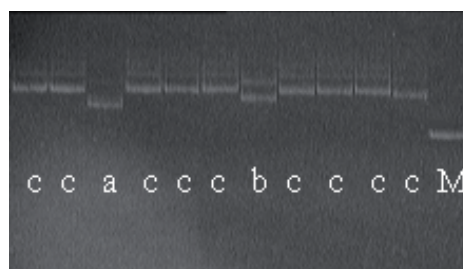


Рис. 1 – SSR-спектры сортов и линий гороха в полиакриламидном геле, полученные при амплификации с праймером AA200:

a, b, c – аллели локуса AA200; M – маркёр молекулярного веса 1 kb (фракция 200 п.н.)

Индекс полиморфизма (PIC), характеризующий генетическое разнообразие популяции в зависимости от количества аллелей и распределения их частот, варьировал от 0,38 до 0,78, в среднем 0,63 на локус.

На основании полученных данных по аллельному состоянию пяти микросателлитных локусов был проведён кластерный анализ для определения степени генетического сходства сортообразцов гороха местной, отечественной и зарубежной селекции и построена дендрограмма. Результаты кластеризации

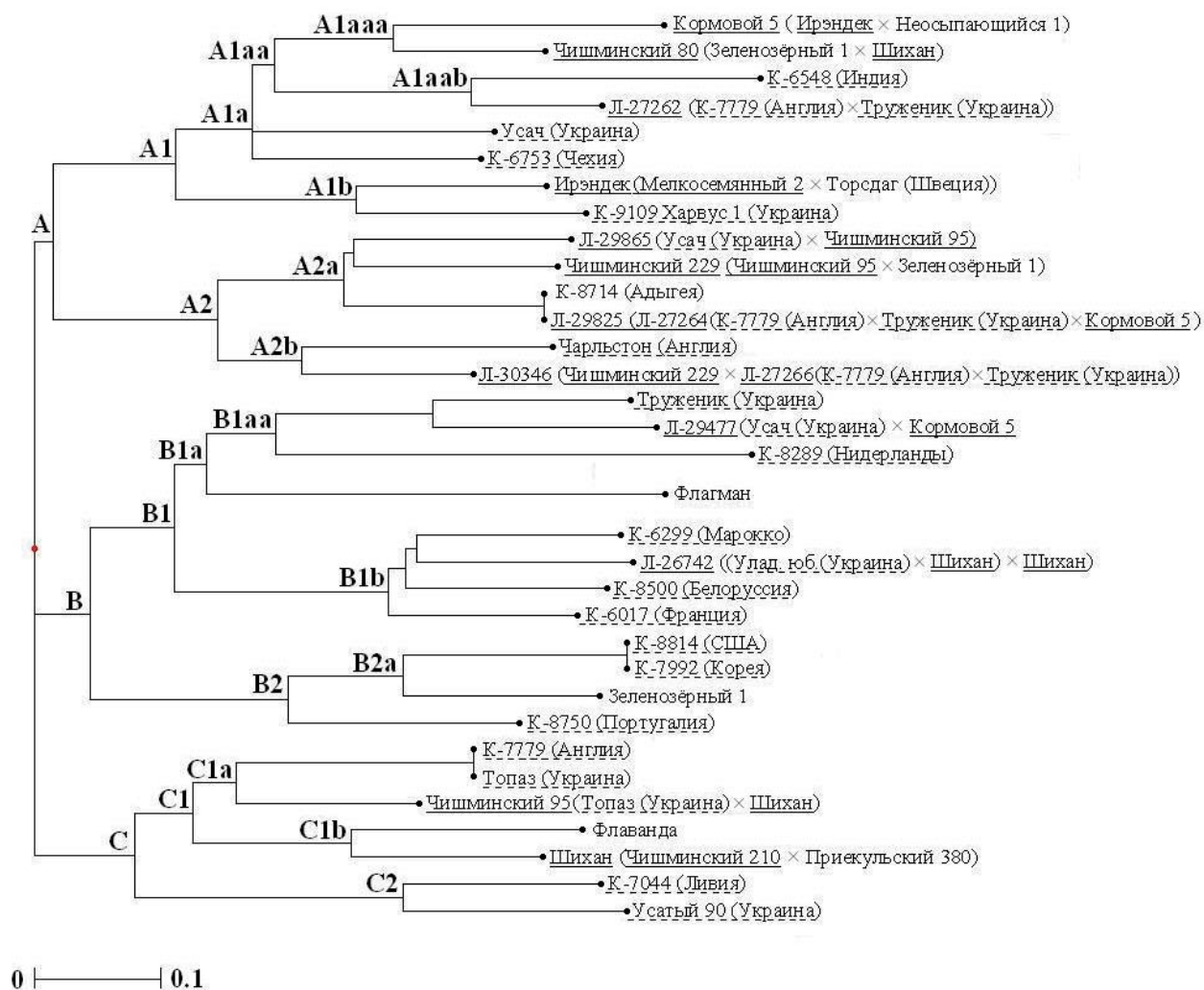


Рис. 2 – Дендрограмма, построенная на основе ДНК-анализа сортообразцов гороха посевного

представлены на рисунке 2. Для интерпретации дендрограммы мы использовали знания о родословных, которые были доступны преимущественно для сортов и линий местной селекции, выделенных на рисунке подчёркиванием сплошной линией; сортообразцы зарубежной селекции подчёркнуты пунктирной линией, сортообразцы отечественной селекции – без подчеркивания.

Как видно по рисунку, на дендрограмме чётко обособлены три больших кластера – А, В и С, имеющие в своём составе более мелкие минорные группы.

Стоит отметить, что в кластере А находятся 8 из 12 изученных нами сортообразцов местной селекции. Выявлена тесная связь между линией Л-29865 (Усач × Чишминский 95) и сортом Чишминский 229, которые имеют в своей родословной сорт Чишминский 95. Наряду с этим сорт Чишминский 229 находится в соседнем минорном кластере с линией Л-30346 (Чишминский 229 × Л-27266), созданной на основе данного сорта. Сорта местной селекции Кормовой 5 и Чишминский 80, обладающие признаком неосыпаемости, белыми цветками, розовыми округлыми семенами и относящиеся к

одной ботанической разновидности – var. *ecaducum* Makash. – неоппадающая, также обнаруживают тесную близость.

Линии местной селекции Л-29477 (Усач × Кормовой 5) и Л-26742 [(Уладовский юбилейный × Шихан) × Шихан], также относящиеся к разновидности *ecaducum* и созданные на основе сортов украинской и местной селекции, находятся в одной группе В.

Сорта местной селекции Шихан и Чишминский 95 – разновидности *ecaducum* – расположены в соседних минорных группах кластера С. При этом сорт Шихан был создан путём отбора из гибридной популяции Чишминский 210 × Приекульский 380, а сорт Чишминский 95 имеет в своей родословной и сорт Чишминский 210, и сорт Шихан. Линия Л-26742 [(Улад. юб. × Шихан) × Шихан] из соседнего кластера В также была создана с участием сорта Шихан.

Выводы. Установлено, что в родословной сортов и линий местной селекции присутствует разнообразный по происхождению, генетически гетерогенный исходный материал из коллекции мировых генетических ресурсов ВИР и различ-

ных селекционных учреждений. Полученный в результате кластеризации иерархический дендрит позволяет визуализировать степень генетического сходства или различия изученных сортообразцов, а также предоставляет дополнительную информацию для эффективного подбора пар при гибридизации, основанной на генетической отдалённости.

Литература

1. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П. Наследование морфологических признаков у гороха // Роль науки в инновационном развитии сельского хозяйства. Ч. 2. Инновационные технологии – основа конкурентоспособности сельского хозяйства: сб. науч. тр., посвящ. 75-летию со дня рождения У.Г. Гусманова. Уфа, 2010. С. 83.
2. FAOSTAT : электронная статистическая база данных Food and Agriculture Organization of the United Nations [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/faostat/ru/#data/QC> (дата обращения: 14.06.2018).
3. Макашева Р.Х. Горох. Л.: Колос, 1973. 312 с.
4. Шурхаева К.Д. Оценка генофонда гороха и перспективы его селекционного использования в условиях Среднего Поволжья: автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук. Казань, 2011. 23 с.
5. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П., Ашиев А.Р. Особенности роста и развития сортов и линий гороха различных морфотипов в условиях Южного Урала // Зерновое хозяйство России. 2011. № 5. С. 22–31.
6. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П. Влияние метеорологических условий на результаты гибридизации // Аграрный вестник Урала. 2011. № 4. С. 5.
7. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П. Изучение полиморфизма микросателлитных локусов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2013. № 2 (26). С. 10–13.
8. Zhang Z. et al. A genome-wide microsatellite polymorphism database for the indica and japonica rice // DNA Research. 2007. Vol. 14. P. 37–45. doi: 10.1093/dnares/dsm005.
9. Qu J., Liu J. A genome-wide analysis of simple sequence repeats in maize and the development of polymorphism markers from next-generation sequence data // BioMed Central Research Notes. 2013. Vol. 6. P. 403. doi: 10.1186/1756-0500-6-403.
10. Гайнуллина К.П. Генетическое разнообразие исходного материала для селекции гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях Предуральской степи Башкортостана: дисс. ... канд. биол. наук. СПб., 2013. 19 с.