

Промышленная экология и биотехнологии. Экология (по отраслям)

УДК 577.2:633.511:631.526.32

DOI 10.24411/2409-3203-2020-12346

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОТИПОВ ХЛОПЧАТНИКА

Антонов Валерий Алексеевич

д.м.н., профессор кафедры «Перерабатывающие технологии и продовольственная безопасность»

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Россия, г. Волгоград

Кимсанбаев Ойбек Хужамуратович

д.с.-х.н., профессор кафедры «Садоводства и защиты растений»

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Россия, г. Волгоград

Подковыров Игорь Юрьевич

к.с.-х.н., доцент кафедры «Садоводства, селекции и семеноводства»

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Россия, г. Волгоград

Приходько Светлана Алексеевна

ведущий специалист

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Россия, г. Волгоград

Шаронов Дмитрий Сергеевич

старший лаборант

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Россия, г. Волгоград

Аннотация. Создание новых сортов хлопчатника в современных условиях основано на применении методов молекулярной биологии. Для расширения границы культивирования хлопчатника и получения новых сортов необходим поиск генотипов, отличающихся высоким полиморфизмом и адаптационной способностью к новым условиям произрастания. Опыты проведены на лабораторной и полевой базе Волгоградского ГАУ с 2014 по 2020 годы. Для микросателлитного анализа выбраны генетически отдалённые образцы с волокном белого, зелёного и рыжего цвета в сравнении с районированным сортом ПГССХ 1. Использовали метод ПЦР - Simple Sequence Repeats –SSR. Установлено, что для выведения новых сортов наиболее перспективен хлопчатник с рыжим волокном. Для генетической идентификации определены 3 микросателлитных локуса.

Ключевые слова: хлопчатник, микросателлитный анализ, локусы, SSR-маркеры.

THE USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR ANALYSIS OF COTTON GENOTYPES

Antonov Valery A.

Ph.D., Professor of the Department of Processing Technologies and Food Safety

Volgograd State Agrarian University, Russia, Volgograd

Kimsanbaev Oybek K.

Ph.D., Professor of the Department of Horticulture and Plant Protection

Volgograd State Agrarian University, Russia, Volgograd

Podkovyrov Igor Y.

Ph.D., Associate Professor of the Department of Horticulture, Breeding and Seed Production

Volgograd State Agrarian University, Russia, Volgograd

Prikhodko Svetlana A.

leading specialist

Volgograd State Agrarian University, Russia, Volgograd

Sharonov Dmitry S.

senior laboratory assistant.

Volgograd State Agrarian University, Russia, Volgograd

Annotation. The creation of new varieties of cotton in modern conditions is based on the application of methods of molecular biology. To expand the boundaries of cotton cultivation and obtain new varieties, it is necessary to search for genotypes characterized by high polymorphism and adaptive ability to new growing conditions. The experiments were carried out at the laboratory and field base of the Volgograd State Agrarian University from 2014 to 2020. For microsatellite analysis, genetically distant samples with white, green and red fiber were selected in comparison with the zoned variety PGSSKh 1. The PCR method was used - Simple Sequence Repeats –SSR. It has been established that red fiber cotton is the most promising for breeding new varieties. For genetic identification, 3 microsatellite loci were identified.

Key words: cotton, microsatellite analysis, loci, SSR markers

Введение. В настоящее время сложились предпосылки для продвижения хлопчатника в регионы юга России. Возросла актуальность создания сортов с коротким периодом вегетации и высокими показателями качества волокна. Потребности российских предприятий в сырье составляют более 200 тыс. тонн в год [8]. Использование в селекционной работе традиционных методов увеличивает срок получения новых сортов. В настоящее время актуально применение методов молекулярной биологии для оценки гибридного материала растений и ускорения процесса селекции [1, 6]. Количественные признаки имеют сложное строение наследственной основы, контролирующая большое число генов и в значительной степени подвержены модифицирующему воздействию внешней среды. Применение ДНК-маркеров открывает большие перспективы для изучения генетических особенностей количественных признаков путем маркирования локусов, которые определяют их развитие, и на этой основе практического повышения эффективности подходов селекции. Одним из таких подходов является метод оценки полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК - повторов простых последовательностей (Simple Sequence Repeats –SSR), позволяющего проводить как идентификацию и паспортизацию сортов, так и осуществлять подбор родительских пар при скрещивании.

Использование SSR-маркеров в сравнении с другими методами обеспечивает не только высокий уровень надежности, но и воспроизводимости. Сами маркеры по своей структуре имеют кодоминантный характер, что в свою очередь позволяет различать гомо- и гетерозиготные растения, что также важно для раннего выявления гибридов и значительно экономит время при создании новых селекционно-значимых исходных форм [2]. Подвергаясь генетическим мутациям, эти последовательности имеют свойство изменять свою структуру гораздо чаще, чем структурированные гены, и обозначают высокие уровни полиморфизма из-за изменения их длины [3,7].

Микросателлитные маркеры отличаются генетической стабильностью, высокой воспроизводимостью и кодоминантностью, поэтому их часто применяют для паспортизации сортов растений [4, 5].

Целью нашего исследования являлось выявление генетических маркеров для идентификации, паспортизации сортов, определения генетического родства между сравниваемыми образцами и полиморфизма признаков на основе микросателлитного анализа.

Материалы и методы. Исследования проведены в научном центре молекулярно-генетических технологий ФГБОУ ВО Волгоградский ГАУ. Материалом для исследования генетического разнообразия послужили пять генотипов хлопчатника с волокном различной окраски (белый, зеленый, рыжий, ПГССХ 7, ПГССХ 1).

Геномную ДНК выделяли из свежих листьев индивидуальных растений с использованием коммерческого набора реагентов для выделения геномной ДНК «Проба-ЦТАБ» («ДНК-Технология», Россия). Для проведения ПЦР олигонуклеотидные праймеры синтезировали в НПК «Синтол», Москва. Амплификацию ДНК продолжительностью 30 циклов проводили в 25 мкл ПЦР смеси в программируемом термоциклере «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва) с использованием «горячего старта». Амплификационная смесь содержала 0.2 мМ dNTP, 1.5 мМ MgCl₂, 1 ед. Taq-полимеразы, 0.12 мкМ каждого праймера, PCR-буфер и 100 нг ДНК. На поверхность смеси наслаивали 30 мкл минерального масла. Температурный режим ПЦР: денатурация – 95 °С 1 мин (95 °С в течение 10 сек; отжиг праймеров – 60 °С в течение 10 сек; элонгация цепи – 72 °С продолжительностью 10 сек), финальная полимеризация при 72 °С в течение 3 мин. Электрофоретический (фрагментный) анализ проводили на базе НПК «Синтол», Москва.

SSR-типирование с последующим определением степени родства исследуемых генотипов сортов хлопчатника проводили на основе данных, полученных после фрагментного анализа локусов по 12 исследуемым маркерам (таблица 1).

Анализ данных, полученных после исследования, обрабатывали с использованием программы Peak Scanner Software v1.0. Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили с помощью программного обеспечения DARwin 6.lnk на основании метода ближайшего соседа Neighbor Joining.

Результаты и обсуждение. Метод микросателлитного анализа позволяет стандартизовать и сопоставить результаты, полученные в различных лабораториях, при условии использования идентичных хромосомных локусов.

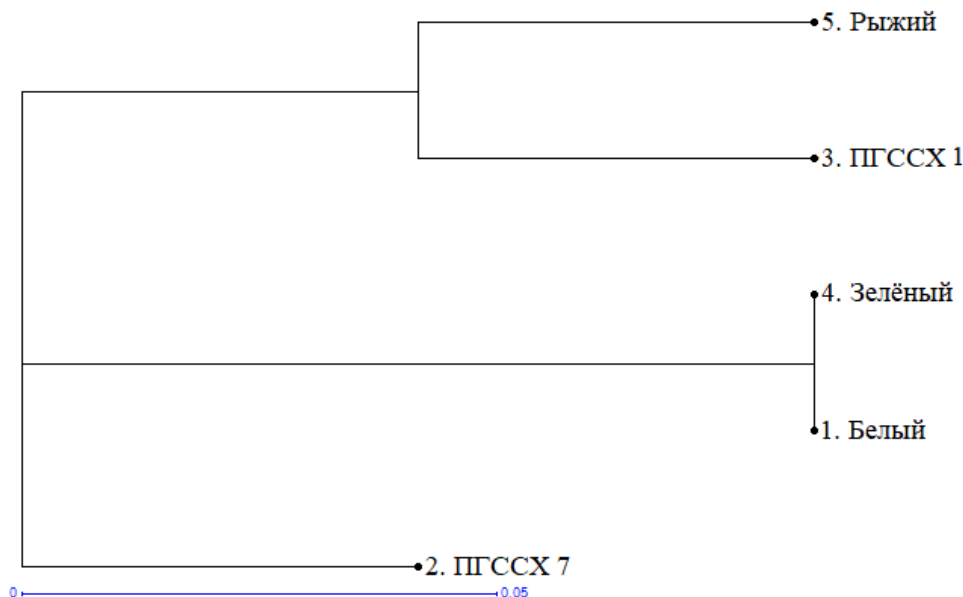
В данной работе нами было протестировано 5 генотипов (сортов) хлопчатника при помощи 12 SSR-маркеров, расположенных на разных хромосомах. Используемые ДНК-маркеры имели различную степень варибельности и, соответственно, информативности при исследовании изучаемых генотипов. Так, из 12 использованных пар праймеров полиморфные участки удалось выявить по 3 ДНК-фрагментам. В сумме, для группы образцов обнаружено 22 аллели для 12 SSR-маркеров.

Таблица 1. Результаты анализа 5 генотипов хлопчатника с применением SSR-маркеров

Наименование образца	Размер продуктов амплификации в п.н. в результате применения SSR-маркеров											
	BNL 0299	CGR 5238	CGR 5249	CGR 5253	CGR 5260	CGR 5264	NAU 3299	TMB 0641	SHIN 1409	CM 43	С М 50	СМ 129A -1
Белый	126/130	175/190	129	121/124/128/132	109/124	142	180	213	198	110	166	64
ПГССХ 7	126/130	175/190	129	121/124/128/132	109/124	142	180	213	198	103/110	164	64
ПГССХ 1	126/130	175/190	129	121/124/128/132	109/124	133/142	180	213	198	103/118	164	64
Зеленый	126/130	175/190	129	121/124/128/132	109/124	142	180	213	198	110	166	64
Рыжий	126/130	175/190	129	121/124/128/132	109/124	133/142	180	213	198	103/118	166	64

В результате установлено, что SSR-маркеры BNL 0299, CGR 5238, CGR 5249, CGR 5253, CGR 5260, NAU 3299, TMB 0641, SHIN 1409, CM 129A-1 идентичны у всех исследованных образцов. Различия наблюдаются в маркерах CGR 5264, CM 43, CM 50. Эти различия имеются даже у генетически близких сортов ПГССХ 1 и ПГССХ 7, которые получены в результате работы с одними и теми же селекционными линиями.

На основании величин генетических расстояний, полученных после микросателлитного анализа, была получена дендрограмма генетических взаимоотношений (рисунок 1).



1- Белый; 2- ПГССХ 7; 3- ПГССХ 1; 4- Зелёный; 5- Рыжий

Рисунок 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенная на основании величин генетических дистанций, рассчитанных по распределению SSR-маркеров по принципу Neighbor Joining в 5 генотипов хлопчатника

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее генетически отдалённым является сорт ПГССХ 7. Наиболее близки между собой сорт ПГССХ 1 и хлопчатник с рыжим волокном. Эти образцы отличаются коротким периодом вегетации 110-115 дней. Белый и зелёный образцы сходны по длине волокна. Они относятся к длинноволокнистой группе и имеют длительный период вегетации 140-150 дней. Сорт ПГССХ 7 является новым генетическим донором хозяйственно ценных признаков. Он отличается повышенной урожайностью, коротким периодом вегетации и волокном высокого качества.

Таким образом, определены 3 микросателлитных локуса, пригодных для идентификации исследуемых генотипов хлопчатника. При использовании кластерного анализа удалось сформировать отдельные группы для всех сортов, которые в свою очередь позволяют наглядно отобразить степень сходства (генетическую дистанцию) исследуемых образцов.

Следует отметить, что, несмотря на выявленные отличия, сорта Волгоградской коллекции имели более высокую степень родства. Полученная база данных может быть использована для паспортизации и идентификации исследуемых сортов, на основе их выявленных генетических особенностей. Однако для получения более тонких генетических характеристик при формировании маркер-ассоциированной селекции хлопчатника необходимо проведение дополнительных генотипических исследований с расширением генетических локусов и ДНК-маркеров.

Список использованной литературы:

1. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции 2013 г. // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, Том 17, № 4/2. 1044-1054 с.
2. Аркатова Е.И. Селекция длинноволокнистых сортов хлопчатника /Е.И. Аркатова // В сб.: Итоги исследований по вопросам генетики, селекции и семеноводства за 50 лет. – Ташкент: Фан. 1970. – С. 75.
3. Карлов, Г. И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.23; 03.00.15 / Г. И. Карлов; Рос. госуд. аграрн. унив. МСХАим. К.А.Тимирязева.– М., 2009. – 50 с.
4. Овчинников А.С., Кимсанбаев О.Х., Конотопская Т.М., Подковыров И.Ю. Агротехнологическая оценка изучаемых сложных межлинейных гибридов F1 - F2 на общее число коробочек в растениях хлопка // Евразийский союз учёных, 2015. – С. 16-19.
5. Баймухаметова Э.А., Лаштабова С.В., Головина В.Ю., Кимсанбаев О.Х., Кулуев Б.Р. Применение индуцированного мутагенеза для увеличения генетического полиморфизма хлопчатника // Биомика, Т.9, №4, 2017 г. – С. 370-379.
6. R. Davydov, M. Sokolov, W. Hogland, A. Glinushkin, A. Markaryan. The application of pesticides and mineral fertilizers in agriculture. // MATEC Web of Conferences, 2018.
7. A. Glinushkin, T. Akimov, O. Beloshapkina, M. Diuldin, J. Molnár. Fungicidal activity of seed disinfectants against root rot of wheat in various types of soils. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019.
8. A.P. Glinushkin, V.I. Startsev, L.V. Startseva. Biological Aspects of Economic Efficiency of Crop Farming. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020.

