

УДК 577.2:633.511:631.526.32  
DOI 10.24411/2409-3203-2020-12403

## **РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДОНОРОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ХЛОПЧАТНИКА**

**Антонов Валерий Алексеевич**

д.м.н., профессор

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии»  
Россия, г. Волгоград

**Кимсанбаев Ойбек Хажумуратович**

д.с.-х.н., профессор кафедры «Садоводство, селекция и семеноводство»

**Подковыров Игорь Юрьевич**

к.с.-х.н., доцент кафедры «Садоводство, селекция и семеноводство»

**Конотопская Таисия Михайловна**

к.с.-х.н., доцент кафедры «Садоводство, селекция и семеноводство»

**Приходько Светлана Алексеевна**

ведущий специалист «Научно-образовательный центр молекулярно-генетических технологий»

**Шаронов Дмитрий Сергеевич**

старший лаборант «Научно-образовательный центр молекулярно-генетических технологий»  
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»  
Россия, г. Волгоград

**Аннотация.** Хлопчатник является стратегически важной сельскохозяйственной культурой. Исследование молекулярно-генетических особенностей селекционных образцов хлопчатника представляет актуальную задачу в связи с разработкой методов маркер-ассоциированной селекции. В центре молекулярно-генетических технологий исследованы селекционные образцы средневолокнистого (ПГССХ 1 и ПГССХ 7) и цветного (зелёный, рыжий, белый) хлопчатника, созданных в Волгоградском государственном аграрном университете. В работе были применены общепринятые методы выделения ДНК, амплификации и электрофореза. В результате, маркировано пять генотипов с использованием произвольных праймеров и получено 68 генетических маркеров. Найдены специфичные праймеры, которые можно использовать для паспортизации селекционных образцов. Кластерный анализ образцов хлопчатника позволил выявить различный уровень генетического сходства между изученными образцами. Полученные данные генотипирования позволят эффективно подбирать селекционные образцы для гибридизации при создании сортов нового поколения.

**Ключевые слова:** хлопчатник, RAPD анализ, праймер, генетические маркеры, селекция.

## **THE RESULTS OF A MOLECULAR GENETIC STUDY OF DONORS OF ECONOMIC SECURITIES SIGNS OF COTTON**

**Antonov Valery Alekseevich**

Ph.D., Professor

Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology  
Russia, Volgograd

**Kimsanbaev Oybek Khazhumuratovich**

Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the Department of «Gardening, selection and seed production»

**Podkovyrov Igor Yurievich**

Ph.D., Associate Professor of the Department of «Gardening, selection and seed production»  
**Konotopskaya Taisiya Mikhailovna**  
Ph.D., Associate Professor of the Department of «Gardening, selection and seed production»  
**Prikhodko Svetlana Alekseevna**  
leading specialist of the Scientific and Educational Center for Molecular Genetic Technologies  
**Dmitry Sergeevich Sharonov**  
Senior Laboratory Assistant, Scientific and Educational Center for Molecular Genetic  
Technologies  
«Volgograd State Agrarian University»  
Russia, Volgograd

**Annotation.** Cotton is a strategically important crop. The study of the molecular genetic characteristics of cotton selection samples is an urgent task in connection with the development of marker-associated selection methods. At the center of molecular genetic technologies, breeding samples of medium-fiber (PGSSH 1 and PGSSH 7) and colored (green, red, white) cotton, created at the Volgograd State Agrarian University, have been studied. In the work, the generally accepted methods of DNA extraction, amplification and electrophoresis were used. As a result, five genotypes were marked using the RAPD assay and RA primers. 68 genetic markers were obtained. Specific primers have been found that can be used for certification of breeding samples. Cluster analysis of the results revealed genetic similarities between the studied samples. The data obtained will make it possible to select breeding samples for hybridization when creating varieties of a new generation.

**Key words:** cotton, RAPD analysis, primer, genetic markers, breeding

Исследование геномов растений гораздо сложнее, нежели исследование генома других живых существ (человека или животного). Причиной этому является далеко не один фактор. Основная проблема исследования генома растений, в первую очередь, заключается в его огромных размерах. У большинства растений они значительно больше чем геном человека или животного. Геномы основных хозяйственно важных культур (за исключением льна, риса и хлопка) по своим размерам либо близки к геному человека, либо превышают его во много раз. Трудности исследований могут возникнуть из-за большого количества полиплоидных форм, которые близки, но не идентичны изучаемому геному, а также из-за отсутствия возможности выделения индивидуальных хромосом в чистом виде, методами, которые обычно применяют для получения хромосом человека или животного и многих других факторов.

Большую популярность набирают исследования хромосом дикорастущих видов растений, используемых для улучшения качеств основных сельскохозяйственных культур [3]. Новые растительных формы создаются путем скрещивания и отбора. Изучение ДНК растений дает огромные перспективы для улучшения хозяйственно-ценных признаков основных сельскохозяйственных культур. Одной из таких культур является хлопчатник (лат. *Gossypium*). Важность этой культуры трудно переоценить, это растение в прямом смысле слова одевает едва ли не половину мира и помимо текстильной индустрии, волокна этого растения используют для изготовления различных взрывчатых веществ. Молекулярно-маркерные системы, основанные на профилировании ДНК, открыли широкие перспективы для идентификации, регистрации и определения генетической чистоты линий на уровне гибридности сортов [1]. Одним из методов выявления молекулярных маркеров является RAPD-метод, являющийся одним из разновидностей полимеразной цепной реакции с использованием олигонуклеотидных последовательностей [2, 4].

Целью нашего исследования являлось выявление генетических маркеров хозяйственно ценных признаков хлопчатника для создания селекционного материала нового поколения для северных регионов культивирования.

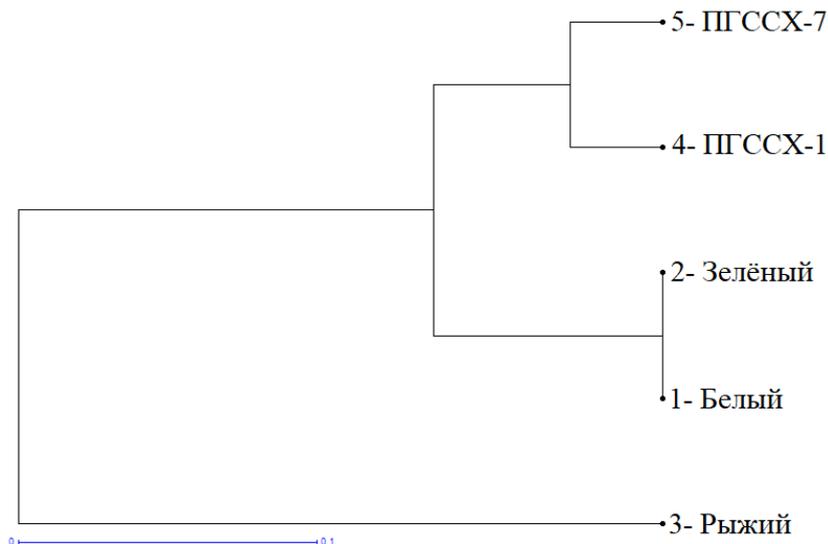
**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили пять сортов хлопчатника селекции учёных Волгоградского ГАУ (Белый, Зеленый, Рыжий, ПГССХ-1, ПГССХ-7). При выделении ДНК использовали коммерческий набор реагентов для выделения геномной ДНК «Проба-ЦТАБ» («ДНК-Технология», Россия). Для проведения ПЦР использованы произвольные праймеры [5, 6]. Амплификацию ДНК продолжительностью 45 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, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. Taq-полимеразы, 0.10 мкМ каждого праймера, PCR-буфер и 100 нг ДНК растений. На поверхность смеси наслаивали 30 мкл минерального масла. Температурный режим ПЦР: денатурация – 95 °С 5мин (95 °С в течение 30 сек; отжиг праймеров – 36 °С в течение 30 сек; элонгация цепи – 72°С продолжительностью 2 мин), финальная полимеризация при 72 °С в течение 7 мин. Электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле проводили по стандартной методике, описанной в источнике [7].

Для проведения статистического анализа составляли бинарные матрицы, на основании которых методом кластерного анализа «UPGMA», была построена дендрограмма, при использовании программного обеспечения DARwin 6.lnk.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного RAPD анализа с использованием произвольных праймеров (РА) было маркировано 5 генотипов хлопка, для каждого из которых был получен характерный паттерн - RAPD спектр. В общей сложности для 5 сортов было получено 68 амплифицированных маркеров. Для нескольких сортов определены уникальные ДНК-фрагменты, которые, по всей видимости, можно считать видоспецифичными, но в определенном сочетании могут быть использованы и в качестве родоспецифичных маркеров.

С помощью компьютерной обработки по методу кластерного анализа (UPGMA) на основании фрагментов RAPD спектров была построена дендрограмма генетического сходства исследованных сортов хлопка (рис.1).



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

Рисунок 1 - Дендрограмма генетических расстояний исследуемых сортов хлопчатника полученная с использованием метода иерархического кластерного анализа «UPGMA»

Сорта ПГССХ 1 и ПГССХ 7 отличаются скороспелостью. Их вегетационный период составляет 110-115 дней. Также они способны произрастать в условиях длинного светового дня, что позволяет их успешно выращивать в южных районах России. Сортообразцы с цветным волокном отличаются его естественной окраской. Их использование в селекции позволит получить различные оттенки и окраски у новых сортов.

Совершенствование метода молекулярно-генетического анализа селекционного материала хлопчатника позволяет выявить генетические маркеры для быстрой оценки новых генотипов при подборе пар для гибридизации.

Опыты показали, что признаки окраски волокна, скороспелости и качества по длине и микронейру кодируются различными нуклеотидными последовательностями. Для выявления генетических маркеров необходим комплексный анализ, проведённый по нескольким методикам и способам обработки данных.

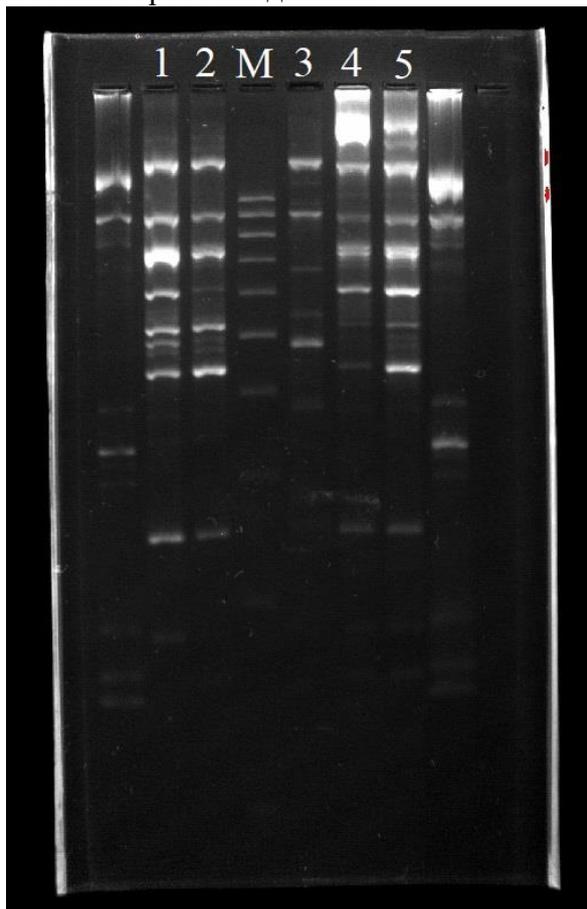


Рисунок 2 - Электрофореграмма RAPD-фрагментов сортов томата, полученных при ПЦР с использованием праймера RA: 1- Белый; 2- Зелёный; 3- Рыжий; 4- ПГССХ-1; 5- ПГССХ-7

В результате исследований установлено, что анализируемые селекционные образцы имеют как сходные, так и различающиеся фрагменты ДНК. На их основе возможно выявление перспективных для гибридизации сортообразцов и ускорение процесса селекционной работы, а при использовании дополнительных методов генотипирования в перспективе можно проследить процесс наследования хозяйственно ценных признаков у потомства.

Результаты, полученные в данной работе, представляют практическую ценность для паспортизации и идентификации исследуемых сортов на основе их выявленных генетических особенностей. Для выявления более тонких генетических характеристик при формировании маркер-ориентированной селекции хлопчатника необходимо проведение дополнительных генотипических исследований с расширением числа ДНК-маркеров.

**Список литературы:**

1. Jaroslaw Przet Kiewicz, Anna Nadolska-Orczyk, Wacław Orczyk. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L // Cellular and Molecular Biology Letters. — 2002. — V. 7. — P. 671—676.
2. Genetic analysis using amplified polymorphic DNA markers. / J. Williams, M. Hanafey, A. Rafalski, S. Tingey // Meth. Enz. — 1993. — С. 704- 740.
3. Муравенко О.В., Лемеш В.А., Саматадзе Т.Е. и др. Сравнение геномов трех близкородственных видов льна и их гибридов с использованием хромосомных и молекулярных маркеров // Генетика. 2003. Т. 39. С. 510-518
4. Антонов В.А., Алтухова В.В., Савченко С.С., Замараев В.С., Илюхин В.И., Алексеев В.В. Использование мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и амплификации с произвольными праймерами (RAPD) для дифференциации штаммов возбудителя сапа // Мол. генет. микробиол. вирусол.- 2007.- N3.- С3-9.
5. Antonov V.A., Tkachenko G.A., Altukhova V.V., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Viktorov D.V., Zamaraev V.S., Ilyukhin V.I., Alekseev V.V. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. - 2008.- N.102/S1, 563-568.
6. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ./Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.-М.: Мир, 1984. - 157-175 с.

