

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК У РАЙОНИРОВАННЫХ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ И ИХ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ

ДОРОХОВ Д.¹, МИХАЛАКИ А.², КОМАРОВА Г.²,
ПАЛИЙ А.², НЕДОЛУЖКО А.¹, ТИХОНОВ А.¹

¹Центр Биоинженерии РАН, Москва

²Государственный Аграрный Университет Молдовы

Summary. This paper presents a brief analysis of DNA polymorphism of corn hybrids and their parental forms. It is discussed the role of the PCR-technologies and the primers used to study the effect of heterosis at the molecular level.

Key words: DNA molecules level, dominance degree, RAPD- and ISSR-technology, heterosis effect.

ВВЕДЕНИЕ

Успешное использование феномена гетерозиса в практической селекции ведущих сельскохозяйственных культур и, в частности, кукурузы является главным аргументом необходимости выбора диагностически ценных экспериментальных показателей (Наş, I. 2004).

Для расширения методологических возможностей указанной задачи необходимо исследовать специфику проявления эффекта гетерозиса на различных уровнях биологической организации растительных гибридных комбинаций. Для культуры *Zea mays* L. эксперименты, проводимые за последние годы на кафедре биологии растений агрономического факультета Государственного Аграрного Университета Молдовы, позволили выявить особенности проявления эффекта гетерозиса по следующим биологическим категориям:

а) по фенотипическим показателям, определяющим специфику проявления репродуктивного и вегетативного гетерозиса (Mihalach A., 2013);

б) по комплексу показателей водного режима листа кукурузы в условиях засухи (Mihalachi A., 2011);

в) по молекулам запасного белка зерновки кукурузы – зеина (Комарова Г., 2012).

Однако, для создания полной картины характерных черт многоуровневого проявления гетерозиса очень важно изучение специфики эффекта этого феномена на уровне молекул ДНК. Поэтому, цель настоящей работы состояла в изучении особенностей полиморфизма ДНК у районированных гибридов кукурузы и их родительских форм.

МЕТОДКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследований использовали наиболее широко распространенную в практике гетерозисной селекции культуру - *Zea mays* L. Для эксперимента были отобраны 4 простых районированных гибрида (Молдавский 291 MRf, Порумбень 457 MRf, Кишиневский 307 PL, Кишиневский 401 L), простой модифицированный гибрид Молдавский 425 MRf, 2 трехлинейных гибрида – Молдавский 257 MRf и Молдавский 411 MRf, 4 простые гибридные комбинации (Дружба С, Лиана М, Лада С, Муза М) и 16 линий кукурузы, являющихся родительскими формами изученных гибридов молдавской селекции.

В работе использованы общепринятые технологии RAPD и ISSR на основе ПЦР (Carvalho V., 2002; Colombo C., 2000). Проращивание и подготовку материала для выделения растительной ДНК проводили по ускоренному микрометоду Д. Дорохова (Метод. Указ.: МУК 2.3.2.970-00, 2000). Амплификацию ДНК - в лаборатории генома растений Центра “Биоинженерия” Российской Академии Наук. Для RAPD-анализа использовали четыре типа

случайных праймеров (D2, D8, D86 и D135), а для ISSR-анализа использовали три праймера – D97, D123 и UBC 857. Эффект гипотетического (H_{ip}), реального (H_{real}) гетерозиса, а также степень доминантности (H) определяли расчетным способом. Анализ и обсуждение полученных величин проводили по общепринятым классификациям (Mihalachi A., 2013). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программ Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Визуальный анализ полученных электрофореграмм молекулярных форм ДНК у гибридов кукурузы и их родительских форм (рис. 1 и 2) наглядно демонстрирует преимущества ISSR-технологии, позволяющей выявить более богатый полиморфизм ДНК.

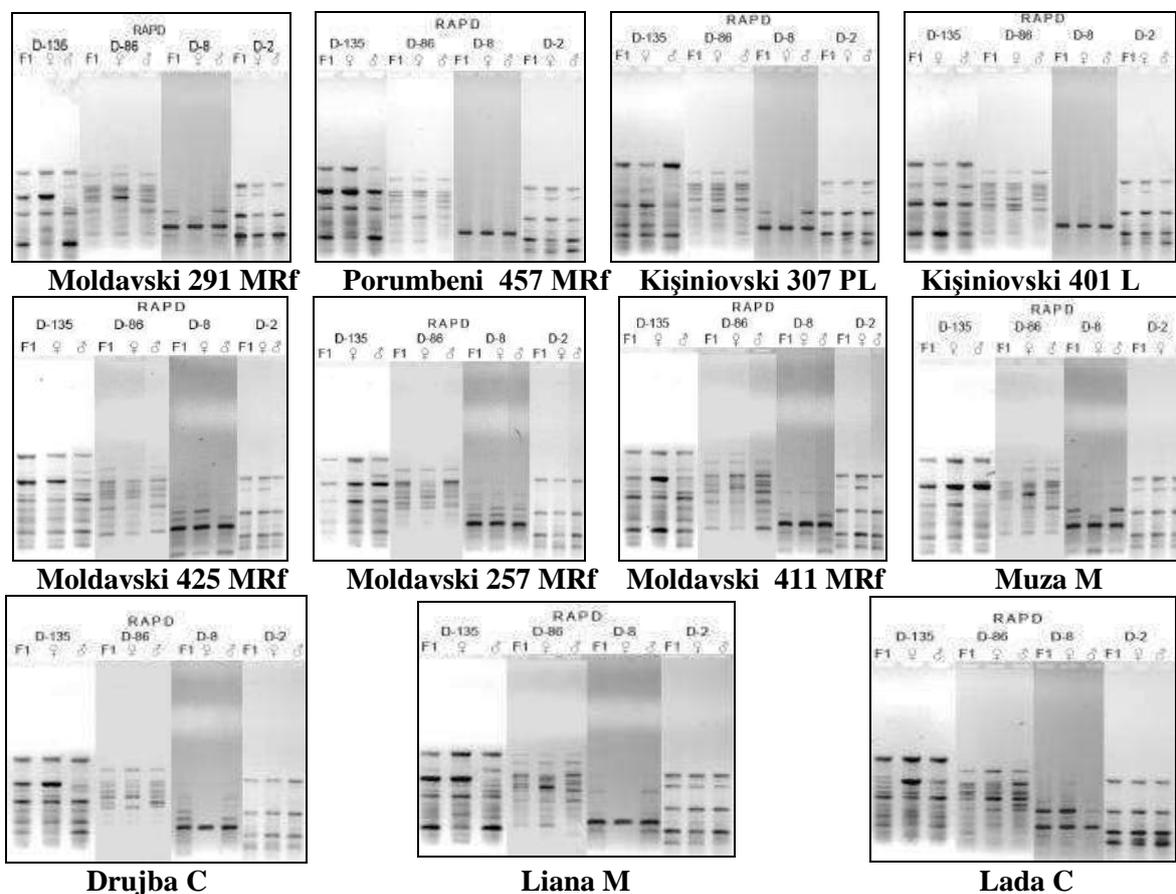


Рис. 1. Электрофореграммы молекулярных форм ДНК гибридов кукурузы и их родительских форм, полученных с помощью RAPD-технологии.

Последующий цифровой анализ спектров, а именно: присваивание каждому компоненту соответствующего порядкового номера, последующий перевод полученных данных в бинарный вид (т.е. кодировка присутствия и отсутствия компонента в спектре соответствующими цифрами 1 или 0), - позволил включить в конечную матрицу только полиморфные и воспроизводимые в ряде независимых опытов компоненты и создать количественные характеристики спектров каждого изученного генотипа.

В таблице 1 показан диапазон варьирования различных типов молекулярных форм (МФ) ДНК в зависимости от праймеров использованных технологий.

Установлено, что более высокую степень полиморфизма ДНК выявляет ISSR-технология: от 8 до 17 МФ ДНК у линий и от 9 до 18 МФ ДНК – у гибридов.

Полиморфизм ДНК, анализируемый с помощью RAPD-технологии, характеризуется меньшим количеством МФ ДНК, однако большим диапазоном варьирования: от 1 до 11 электрофоретических компонентов как для линий, так и для гибридов.

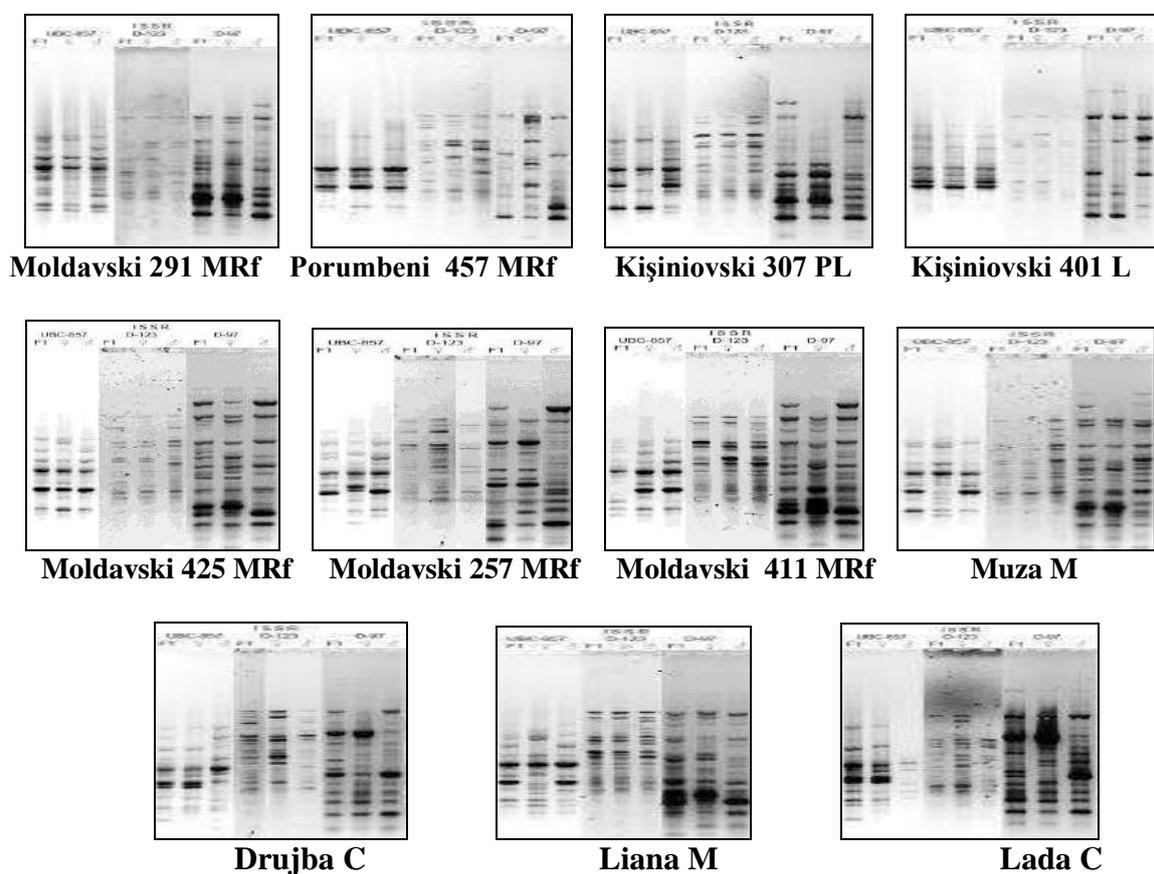


Рис. 2. Электрофореграммы молекулярных форм ДНК гибридов кукурузы и их родительских форм, полученных с помощью ISSR-технологии.

Достаточно четко прослеживается и роль праймеров, отобранных для соответствующей технологии ПЦР. Так, для RAPD-технологии в проведенном эксперименте наиболее приемлемыми для выявления относительно большей степени полиморфизма ДНК являются праймеры D86 и D135.

Таблица 1. ПОЛИМОРФИЗМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ ДНК У ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ И ИХ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ВЫЯВЛЯЕМЫХ С ПОМОЩЬЮ RAPD- И ISSR-ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ ПЦР В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСПОЛЬЗУЕМОГО ПРАЙМЕРА

Технология ПЦР	Праймер	Линии (n=16)		Гибриды (n=11)	
		min	max	min	max
RAPD	D 2	7	9	7	9
	D 8	1	9	1	10
	D 86	7	11	8	11
	D 135	7	11	6	11
ISSR	D 97	8	17	11	18
	D 123	8	17	9	17
	UBC 857	5	15	12	18

Для ISSR-технологии - праймеры D97 и D123. Использование полученных количественных характеристик спектров МФ ДНК для расчета степени проявления гипотетического и реального гетерозиса, а также степени доминирования обсуждаемых величин позволило получить достаточно интересные результаты, позволяющие проводить обсуждение феномена гетерозиса на молекулярном уровне.

Как свидетельствуют данные таблицы 2, по технологии RAPD в качестве лучшего индикатора гетерозисного эффекта кукурузы является праймер D 8 (7 гибридов из 11

изученных проявили положительный гипотетический и реальный гетерозис на уровне ДНК, а четыре гибрида – проявили эффект сверхдоминирования).

Таблица 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ (N=11) ПО ГРУППАМ ГРАДАЦИИ ЭФФЕКТА ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕТЕРОЗИСА (H_{IP} / H_{REAL}) И КОЭФФИЦИЕНТА ДОМИНИРОВАНИЯ (H) НА УРОВНЕ МОЛЕКУЛ ДНК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР И СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ПРАЙМЕРА

Технология ПЦР	Праймер	H_{ip}			H_{real}			H			
		$H_{ip} \geq 25\%$	$0 \leq H_{ip} < 25\%$	$H_{ip} < 0$	$H_r \geq 25\%$	$0 \leq H_r < 25\%$	$H_r < 0$	$H > 1$	$0 \leq H \leq 1$	$H < 0$	∞^*
RAPD	D 2	-	5	6	-	-	11	-	5	2	4
	D 8	6	1	4	7	-	3	4	4	-	3
	D 86	2	6	3	2	1	8	-	6	2	3
	D 135	-	5	6	2	2	7	2	2	3	4
ISSR	D 97	2	9	-	4	3	4	6	4	-	1
	D 123	2	9	-	2	5	4	3	7	-	1
	UBC 857	2	8	1	4	4	3	4	6	-	1

Условное обозначение к таблице 2: ∞^* - отсутствие доминирования

По технологии ISSR совокупность обсуждаемых показателей – гипотетического гетерозиса и коэффициента доминирования – продемонстрировала положительный эффект гетерозиса для 10 и 11 изученных гибридов (соответственно) при использовании праймера D97.

Следует также отметить, что при использовании RAPD-технологии многие высокоурожайные гибридные комбинации на уровне ДНК характеризуются отрицательным гетерозисом (от 30 до 100% изученной выборки по H_{ip} и H_{real}), отрицательным доминированием ($H < 0$) или полным его отсутствием (∞): от 18 до 36 % выборки гетерозиготных форм.

Преимущества ISSR-технологии очевидны и при обсуждении проявления эффекта гетерозиса и степени доминирования по ДНК. Лишь у единичных гибридных комбинаций установлено отсутствие доминирования и проявление отрицательного гипотетического гетерозиса (в зависимости от используемого праймера).

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что технология ISSR-анализа позволяет выявить более богатый полиморфизм молекул ДНК, чем технология RAPD.
2. Показана определяющая роль праймера при амплификации ДНК по каждой из использованных технологий PCR для изучения степени проявления эффекта гетерозиса на уровне ДНК: по технологии RAPD лучшим индикатором гетерозисного эффекта кукурузы является праймер D8; по технологии ISSR – праймер D97.
3. Использованный набор праймеров недостаточно информативен, что указывает на необходимость дальнейшего поиска нужных праймеров для амплификации более широкого спектра участков ДНК, контролирующих проявление гибридной силы гетерозиготного потомства растений кукурузы.

ЛИТЕРАТУРА

1. КОМАРОВА, Г., и др. Возможности использования белковых маркеров для изучения эффекта гетерозиса у районированных гибридов кукурузы молдавской селекции. В: *Селекция и генетика сельскохозяйственных растений: традиции и перспективы*: тезисы межд. конф. Одесса, 2012. с. 165-166.
2. *Методические указания*. МУК 2.3.2.970-00. 2.3.2, 2000. Пищевые продукты и пищевые добавки. «Медико-

биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников». Москва: Федер. центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 56 с.

3. CARVALHO, V. et. Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays L.*) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2002, vol. 2. p. 557- 568.
4. COLOMBO, C., SECOND, G., CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular*, 2000. v.2, p.189-199.
5. HAȘ, I. Heterozisul la porumb. In: *Porumb: studiu monografic*. București: Academiei Romane, 2004. p. 311-362.
6. MIHALACHI, A. Particularitățile manifestării efectului heterozis vegetativ și reproductiv la hibridi omologați de porumb. In: *Știința Agricolă*. Chișinău: UASM, 2013. nr.1, p. 7 - 11.
7. MIHALACHI, A., et. Study of physiological reactions particularities of leaf apparatus of maize hybrids and its parental forms in drought conditions. In: *Scientific Papers*. Bucharest: UASVM, 2011. Series A: Agronomy, vol. LIV. p. 320-325. ISSN 1222-5339.