

ОТ ТРАДИЦИОННОЙ СЕЛЕКЦИИ К СЕЛЕКЦИИ ПРИ ПОМОЩИ ДНК-МАРКЕРОВ

© 2011 З.М. Айшаева, Б.А. Алоева, А.Ю. Паритов

Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова,
г. Нальчик

Поступила в редакцию 03.05.2011

Количественные признаки имеют сложную наследственную основу, контролируются большим числом генов и в значительной степени подвержены модифицирующему воздействию внешней среды. Применение молекулярных маркеров открывает широкие перспективы для изучения генетической природы количественных признаков путем маркирования локусов, что определяют их развитие, и на этой основе практического повышения эффективности методов селекции. Проведен RAPD-анализ линий кукурузы селекции КБГУ с использованием коротких праймеров длиной 10 нуклеотидов.

Ключевые слова: *геном, кукуруза, количественные признаки, коэффициент наследуемости, полиморфизм, ДНК-маркеры*

Успешные работы по расшифровке геномов вирусов, бактерий, дрожжей, круглых червей, дрозофил сделали возможным переход к масштабному изучению крупных и сверхкрупных геномов растений [1]. Изучение геномов растений – задача значительно более сложная, чем исследование генома человека и других животных [2]. Это связано с огромными размерами геномов, достигающими для отдельных видов растений десятков и даже сотен миллиардов пар нуклеотидов: геномы основных хозяйственно важных растений (кроме риса, льна и хлопка) по размерам либо близки к геному человека, либо превышают его во много раз. Расшифровка геномов растений открывает перед наукой и практикой широкие перспективы. Обнаружение, выделение, размножение (клонированием) и секвенирование генов, отвечающих за такие важнейшие функции растительного организма, как размножение и продуктивность, процессы изменчивости, устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов среды связаны с выходом селекционных работ на качественно новый уровень. Полное секвенирование генома дает близкие к истинным сведения об общем количестве генов данного организма, позволяет поместить в банки данных более или менее подробные и достоверные сведения об их структуре, облегчает работу по выделению и изучению индивидуальных генов.

Количественные признаки имеют сложную наследственную основу, проявляющуюся в непрерывной фенотипической изменчивости в расщепляющихся гибридных потомствах. Они контролируются большим числом генов и в значительной степени подвержены модифицирующему воздействию внешней среды. Уже более 40 лет мы ведем исследования, посвященные изучению комбинационной способности и генетического контроля количественных признаков самоопыленных линий кукурузы. Самоопыленные линии были заложены на гибридах и местных популяциях белозерной кукурузы. Семена обрабатывали мутагенами – нитрозозтилмочевинной и нитрозометилмочевинной в концентрациях 0,01 и 0,025. После многократного инбридинга и строгой браковки были выделены константные, сравнительно продуктивные многопочатковые самоопыленные линии [3, 4]. Характеристика 6 линий по некоторым количественным признакам дается в таблице 1.

Информацию о генетической структуре изучаемого количественного признака в конкретном наборе самоопыленных линий получали, используя схему диаллельных скрещиваний методом Хеймана [5]. Коэффициенты наследуемости ряда количественных признаков самоопыленных многопочатковых линий кукурузы по некоторым хозяйственно-ценным признакам представлены в табл. 2. Значительная вариабельность большинства из них объясняется, прежде всего, нормой реакции генотипа на условия выращивания. Величины коэффициентов наследуемости, как в узком, так и в широком смысле, как показали исследования, близки, что свидетельствует о том, что отбор по фенотипу будет близок отбору соответствующих им генотипов [6].

Айшаева Зульфия Мухадиновна, аспирантка. E-mail: Aishaeva@mail.ru

Алоева Бэлла Арзуевна, аспирантка. E-mail: bella.aloeva@mail.ru

Паритов Анзор Юрьевич, кандидат биологических наук, декан биологического факультета. E-mail: Paritov@mail.ru

Таблица 1. Характеристика мутантных самоопыленных линий кукурузы селекции КБГУ

Линии	Обработка мутагенами (конц.%)	Вегетационный период	Количество початков на растении	Масса початка с растения, г	Высота растений, см
4	НЭМ-0,025	128-135	2,2	81-85	200-210
6	НММ-0,025	130-145	1,9	82-85	100-108
8	НЭМ-0,01	125-130	1,9	77-85	130-135
23	НЭМ-0,025	130-140	2,0	76-79	180-185
28	НЭМ-0,025	128-130	1,8	78-82	205-210
30	НЭМ-0,025	128-130	2,1	85-90	185-192

Таблица 2. Коэффициенты наследуемости количественных признаков самоопыленных многопочатковых линий кукурузы

Признак	Коэффициенты наследуемости	
	в широком смысле	в узком смысле
число початков	0,98	0,63
масса зерна с растения	0,99	0,60
высота растения	0,97	0,52
масса 1000 зерен	0,99	0,63
число рядков	0,95	0,54
число зерен в рядке	0,96	0,72
урожай зерна	0,99	0,69
длина первого початка	0,99	0,68
высота прикрепления верхнего початка	0,88	0,79

В настоящее время накопленный в результате многолетней работы на кафедре селекционный материал используется для изучения молекулярно-генетического полиморфизма методом полимеразной цепной реакции и детекции ДНК-маркеров к хозяйственно-ценным признакам. Селекция при помощи маркеров – это новая, развивающаяся наука. Экстенсивное развитие сельского хозяйства приводит к глобальному уничтожению природы, а применение новых методов селекции позволит перейти на интенсивное хозяйство, получить растения гораздо более устойчивых к различным негативным факторам среды. Без увеличения посевных площадей и числа применяемых удобрений и пестицидов возможно значительное повышение продуктивности сельскохозяйственных культур. В селекции при помощи маркеров используются только природные комплексы генов, характерные для данного вида. Эти комплексы отобраны в результате длительного эволюционного процесса, поэтому их присутствие в геноме является естественным и безопасным как для самого растения, так и в качестве продуктов питания для человека [7]. ДНК-маркеры используются

для решения вопроса о наличии, отсутствии или состоянии той или иной генетической системы – гена, хромосомы (целой или ее части), генома. Полиморфизм ДНК широко применяются для идентификации и анализа генетической дифференциации биоразнообразия. На полиморфизме нуклеиновых кислот основано ДНК маркирование [8].

Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) расширило возможности изучения полиморфизма геномной ДНК. Вариантов использования ПЦР при выявлении полиморфизма множество. Для амплификации различных участков ДНК с неизвестной локализацией в геноме может использоваться RAPD анализ (Random Amplified Polimorphic DNA), основанный на использовании одного или более произвольных олигонуклеотидных праймеров. Функцию прямого и обратного праймеров выполняет один и тот же олигонуклеотид. В результате ПЦР с произвольными праймерами образуются воспроизводимые фингерпринты, представляющие собой спектр уникальных (представленных в геноме по своей общей структуре в единичном числе) продуктов, часто полиморфных. ПЦР с произвольными праймерами пригодна для детального анализа геномов любых организмов. Различные варианты ПЦР с произвольными праймерами различаются по количеству продуктов амплификации, длине используемых праймеров, условиям амплификации и способу электрофоретического разделения продуктов.

Выделяли ДНК тризольным методом. Для RAPD-анализа применялись короткие праймеры длиной 10 нуклеотидов. Разделение фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле на TAE буфере. Окрашивали бромистым этидием с последующей детекцией в ультрафиолетовом свете. В пробной амплификации на 2 линиях селекции КБГУ (8 и 17) и 1 линии из коллекции ВИРа (A297) очень хорошо прослеживается разница по паре праймеров.

Была проведена повторная амплификация тех же образцов вместе с другими самоопыленными линиями по этой же паре праймеров. Анализируемые линии четко разделились на две группы по молекулярной массе амплифицированных участков. Линии 8, 10, 19, 25, 31 характеризуются сходными результатами амплификации (110 п.н.), подобная картина и по линиям – 17, 18, 23, 28 (140 п.н.). Линии 6, A297, 30 по данному праймеру не идентифицировались.

Выявляемый с помощью ПЦР с произвольными праймерами генетический полиморфизм может быть использован при исследованиях видовой идентификации, для генетического картирования и паспортизации генотипов [9]. Также данные о локализации RAPD могут применяться для создания генетических маркеров локусов количественных признаков сельскохозяйственных культур.

Проблемы исследования генома сельскохозяйственных растений одно из ведущих направлений научно-исследовательских работ, поскольку перед лицом ожидаемого громадного увеличения населения продовольствие становится важнейшим стратегическим ресурсом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Зеленин, А.В. Введение в геномику растений / А.В. Зеленин, Е.Д. Бадаева, О.В. Муравенко // Молекулярная биология. 2001. Т. 35. С. 339-348.
2. Паритов, А.Ю. Селекция на многопочатковость как один из методов повышения урожайности кукурузы // Известия Самарского научного центра РАН. 2010. Т. 12. № 1(3). С. 791-795.
3. Паритов, А.Ю. Изучение гетерозиса у кукурузы в системе диаллельных скрещиваний / А.Ю. Паритов, С.Х. Шогенова // Материалы научной конференции аспирантов и студентов агрономического факультета КБГСХА, посв. 95 летию К.Н. Керефова, 2007., С. 24-26.
4. Паритов, А.Ю. Методы определения генетических параметров на основе диаллельных скрещиваний / А.Ю. Паритов, М.К. Керефова // Вестник КБГУ. Серия биологические науки. 2006. Вып. 8. С. 109-111.
5. Федин, М.А. Кукуруза. – Орловское книжное издательство, 1963. С. 28-51.
6. Паритов, А.Ю. Изучение стабильности признака многопочатковости у самоопыленных линий кукурузы селекции КБГУ / А.Ю. Паритов, М.К. Керефова // Материалы III международной заочной научной конференции «Проблемы сохранения рационального использования биоразнообразия прикаспия и сопредельных регионов», Элиста, 2005. С. 55-56.
7. Харченко, П.Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П.Н. Харченко, В.И. Глазко. – М: Воскресенье, 2006. 480 с.
8. Weising, K. DNA fingerprinting in plants and fungi / K. Weising, H. Nybom, K. Wolff, W. Meyer. – CRC Press, 1995. 322 p.
9. Link, W. Genetic diversity in European and Mediterranean Faba bean germ plasm revealed by RAPD markers / W. Link, C. Dixkens, M. Singh et al. // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 27-32.

FROM TRADITIONAL SELECTION TO SELECTION BY MEANS OF DNA-MARKERS

© 2011 Z.M. Ayshaeva, B.A. Aloeва, A.Yu. Paritov

Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov, Nalchik

Quantitative attributes have a complex hereditary basis, are controlled by a great number of genes and are substantially subject to modifying influence of environment. Application of molecular markers opens wide prospects for studying the genetic nature of quantitative attributes by locus marking, that define their development, and on this basis practical increase of efficiency the selection methods. The RAPD-analysis of corn lines by KBSU selection with the use short primers in the length of 10 nucleotides is spent.

Key words: *gene, corn, quantitative attributes, heredity coefficient, polymorphism, DNA-markers*