

Аспекты молекулярной идентификации генотипов картофеля

Аникина И. Н., ПГУ им. С. Торайгырова,
Бексеитов Т.К., ПГУ им. С. Торайгырова,
Исаева К.С., ПГУ им. С. Торайгырова,
Кайниденов Н. Н. ПГУ им. С. Торайгырова, г

Summary

The article presents an overview of material about modern analytical methods of research by using protein and DNA-markers, what allows solving problems of potato genotypes identification. Molecular diagnostics is an effective addition to traditional methods of sorts and seed potatoes identification, which were held based on morphological and physiological variety features. RAPD, AFLP, SSR, ISSR and others types of DNA-markers were used for identification of potato genotypes, detection its genetic diversity and passport system of gene pool in worldwide practice, each of these markers can individually determine sorts by using some limited amount of primers. It is noted that SSR-markers have some advantages in potato sorts identification, because of their high polymorphism, rapidity and high reproducibility of assays.

* * * * *

Во многих странах мира картофель является одной из основных сельскохозяйственных культур. В результате многолетней работы отечественными и зарубежными селекционерами были получены высокопродуктивные сорта картофеля, которые отличаются комплексом признаков устойчивости как к биотическим факторам внешней среды так и к абиотическим факторам. Тем не менее в процессе размножения и длительного возделывания в условиях производства семена этой культуры, размножаемой вегетативно могут накапливать болезни, в том числе болезни вырождения которые затрагивают генетический материал и влияют на репродуктивные качества. Кроме того в процессе взаимодействия с окружающей средой возможны проявления изменчивости сортов и мутации, которые отрицательно сказываются на качестве семенного материала. Ввиду этого в процессе получения высококачественных семян важно своевременное и качественное проведение сортосмены и сортообновления. В последнее время предлагается большое разнообразие молекулярно-генетических маркеров, пригодных в том числе для данной культуры, поэтому селекция картофеля не может ограничиваться использованием только традиционных методов основанных на изменениях фенотипических признаков [1, с. 39-42]. В связи с чем использование молекулярных методов идентификации исходного семенного материала приобретает особую значимость.

В последние 2-3 десятилетия селекционная работа

в Казахстане особенно плодотворна, появилось большое количество новых отечественных сортов картофеля и эти работы продолжают. Традиционная и общепринятая методика использования сортоотличительных морфологических признаков для идентификации сорта основывается на точном ботаническом описании характерных особенностей этих признаков и оптимальных сроках их оценки [2, с. 103, 3, с. 95, 4, с. 40-58]. Однако, такой способ идентификации имеет ограничения, поскольку морфологические признаки подвержены влиянию условий выращивания и субъективности наблюдений. И, что еще более важно, большинство из этих признаков недоступны для наблюдений одновременно. Для идентификации сортов при традиционной апробации необходимо выращивание материала в строго регламентированных полевых условиях. Для описания ростков клубни на проращивание закладываются в зимнее время. Такой чрезмерно растянутый во времени процесс неприемлем, например, для сортовой идентификации рассады, растений, получаемых на различных биотехнологических модулях, растений, выращенных in vitro, когда сортоотличительные признаки исчерпываются только номером пробирки [5, с. 25].

В связи с этим большой практический интерес представляют как дополнение к традиционным методам идентификации сортов и семенного контроля на основе морфолого-физиологических сортоотличительных признаков в настоящее время успешно разрабатываемые современные аналитические методы исследования с использованием белковых и ДНК-маркеров, которые на принципиально новой основе позволяют решать задачи по идентификации генотипов [6].

Использование в качестве фенотипических маркеров белковых молекул (изоферменты, запасные белки и т.п.) - продуктов индивидуальных генов существенно расширило возможности картирования генов и их мониторинга в селекционном процессе и позволило создать новые методы идентификации и систематизации сортов и семенного контроля. По мнению Созинова А. Я. (1993), Хавкина Э. Е. (1997), биохимические методы не обладают способностью обнаруживать различия у таких близкородственных генотипов, как соматклоны, клоновые варианты, соматические мутанты [6, 7, с. 3-13]. Кроме того, полигенная природа многих признаков строения и состава растений ограничивает возможности генетического

картирования агрономически важных генов и контроля за переносом этих генов в новые формы растений.

В последнее время для сортовой и видовой идентификации генотипов картофеля широко применяются методы, основанные на анализе геномной ДНК, которые позволяют надежно различать виды, подвиды, сорта, инбредные линии и даже клоны растений, а также дать количественную характеристику их генетического и аллельного разнообразия, которая важна для поддержания и пополнения генетических коллекций, восстановления родословных и выбора форм для интрогрессии. Методы ДНК-генотипирования существенно облегчают подбор родительских пар для скрещивания и ускоряют сам процесс селекции за счет быстрой идентификации интрогрессируемого генетического материала.

Применение молекулярных маркеров в настоящее время является главным методологическим подходом в изучении генетического полиморфизма растений. Эти маркеры позволяют различать не только виды и подвиды растений, а также давать количественную характеристику их генетического и аллельного разнообразия.

С введением молекулярных маркеров в практику биологических исследований появились новые возможности детального изучения структуры и организации генома растений и количественной оценки степени сходства/различия на меж- и внутривидовом уровне. Для селекции растений особое значение имеет использование молекулярных маркеров для различения и идентификации сортов культурных растений, а также контроля за переносом генетического материала от дикорастущих сороричей при отдаленных скрещиваниях.

По мнению Hosaka K. и Ogawa K. (1994) потенциал ДНК-маркеров многократно превышает возможности белковых и изоферментных в том отношении, что их проявление не зависит от условий выращивания, они не тканеспецифичны, стабильны на любой стадии онтогенеза и нейтральны по отношению к фенотипу [1]. Микросателлитные последовательности ДНК являются наиболее доступными, простыми, удобными и относительно недорогими маркерами, пригодными, прежде всего, для идентификации генотипов растений. Их преимущество - кодоминантное наследование - позволяет различать гомо- и гетерозиготные растения. Для идентификации генотипов картофеля, выявления его генетического разнообразия и паспортизации генофонда в мировой практике были использованы такие типы ДНК-маркеров, как RAPD, AFLP, SSR, ISSR и другие, каждый из которых эффективен индивидуально при использовании некоторого ограниченного числа праймеров. Отмечено, что при сортовой идентификации картофеля из всех ДНК-маркеров определённые преимущества имеют SSR-маркеры из-за своего высокого полиморфизма, быстроты и высокой информативности данного метода.

Высокий уровень полиморфизма микросателлитов, относительно равномерное их распределение в эухроматиновой части геномов и широкая представленность сделали их чрезвычайно популярными. Гипервариабельные микросателлиты представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма популяций растений. Также использование SSR-маркеров позволяет выявить филогенетические взаимоотношения [10].

Для практических целей, высоко информативные маркеры должны позволять за один единственный шаг установить различия среди многих сортов (идеально, среди всех сортов, с которыми новый сорт должен был бы быть сравнен) (Gorg et al., 1992).

Bailey (1983) перечислил основные критерии оценки молекулярных маркеров для идентификации сортов. Они включают: 1) способность выявлять межсортовые различия; 2) минимальный уровень внутрисортовой вариабельности; 3) стабильность спектров при меняющихся условиях окружающей среды; 4) лабораторную воспроизводимость [8, с. 425].

Надежные генетические маркеры должны быть нейтральными по отношению к признакам, на которые ведется селекция, а чтобы распознавать родительские формы растений, маркеры должны быть кодоминантными и стабильно сохраняться в потомстве [8, с. 425]. Отчетливость существующих сортов должна демонстрироваться прежде, чем селекционеры растений предъявят права на предоставляемый ими новый сорт [9, с. 815-819], поскольку надежная идентификация сорта может играть важную роль в защите прав селекционеров сельскохозяйственных культур, а также для контроля семенного производства и маркетинга.

Исследование полиморфизма запасных белков и изоферментов по мнению многих авторов, а именно Созинова А. Я. (1993), Laemmli U. K. (1979), Мусина С. М., Петухова С. Н., Якуповой Р. Х. и др. (2003), является одним из важнейших путей получения информации о генотипе. Согласно их мнению биоспецифичность белков служит основой их применения в качестве генетических маркеров. Ими отмечено, что специфичность разных групп белков неодинакова и различия связаны с характером эволюционной и генетической изменчивости.

Для такого рода исследований наибольший интерес представляют полиморфные белки (прежде всего запасные белки и изоимные системы), которые могут служить маркерами гена и его аллельной структуры. С точки зрения В. Г. Конарева эволюционно консервативные белки могут использоваться как маркеры высших таксонов, а маркерами видов и геномов могут служить эволюционно более молодые белки.

Согласно положениям Н. Stegemann (1979), при использовании белковых и изоферментных маркеров основополагающим является следующее:

1) метод разделения и идентификации должен быть недорогим, легким для выполнения и не зависимым от загрязняющих анализируемый образец веществ в различных концентрациях;

2) разделение должно быть одноэтапным процессом и начинаться с сырого экстракта, для того чтобы свести к минимуму возможные нежелательные изменения при подготовке проб;

3) вначале следует испытать один генотип в различных условиях (например, изучить влияние климата, удобрений, пестицидов, регуляторов роста, возраста растений, зрелости клубней и т.д.) для уверенности в том, что спектры белков не зависят от этих условий, или для того, чтобы получить исчерпывающе точные знания о таких возможных изменениях;

4) спектр белков того или иного образца должен иметь определенное число индивидуальных, только ему присущих, особенностей, легко отличимых от других. Чем больше их число, тем представляются большие возможности для дифференциации. Для надежного сравнения образцов нужен также внутренний стандарт [11, с. 121].

Выбор конкретного вида разделения зависит как от оборудования и реактивов, имеющихся в распоряжении исследователя, так и целей и задач, на решение которых направлен эксперимент. Для сортовой дифференциации нескольких сортов достаточен практически любой тривиальный метод разделения, а для идентификации сотен сортов необходим один стандартный, полностью воспроизводимый в любой лаборатории метод, с единой методикой документации и интерпретации спектров [12].

Отработанная методика работы с белками-маркерами складывается из этапов разделения белковых смесей, идентификации белковых и изозимных компонентов в спектрах и биохимической или генетической интерпретации информации о составе белков анализируемых генотипов. Для анализа белков в денатурирующих условиях (с ДДС-Na) обычно используют диск-электрофорез в буферной системе Леммли [12, с. 680-685]. Известны анодная и катодная буферные системы для вертикального диск-электрофореза. Наилучшим приемом интерпретации информации признано проведение электрофореза в тонких пластинах полиакриламидного геля в вертикальной системе [13]. На одной пластине геля можно анализировать до 20 образцов в равных условиях, что важно для сравнения отдельных компонентов в соседних спектрах.

Преимущество использования тонких пластин геля по мнению Мусина С. М., Петухова С. Н., Якуповой Р. Х. и др. (2003) в том, что для дифференциации образцов применяются только три переменные - количество,

относительное положение и интенсивность белковых компонентов в спектрах, что также чрезвычайно важно для обработки информации путем денситометрического сканирования. Для построения дендрограммы в молекулярной диагностике в последнее время наиболее эффективен алгоритм UPGMA и компьютерная программа TREECON [14].

Анализ полиморфизма монолокусных хромосомо-специфичных микросателлитов А. К. Есимсеитова и А. А. Какимжанова (2014) проводили с использованием ПЦР с микросателлитными праймерами. Согласно их исследованиям предпочтителен следующий режим амплификации: 1) предварительная денатурация при 94°C в течение 5 мин; следующие 30 циклов: 30 с - денатурация при 94°C; 30 с - отжиг праймера (температура отжига - в зависимости от используемых в анализе SSR - праймеров); 30 с синтез при 72°C; конечная элонгация при 72°C в течении 5 мин. Разделение немеченых продуктов амплификации, полученных с праймерами к SSR-последовательностям, они проводили в неденатурирующем 8% и 12%-м полиакриламидном геле и окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали при УФ-свете с использованием аппарата GelDoc XR (BioRad). Исследователями А. К. Есимсеитовой и А. А. Какимжановой (2014) обнаружен высокий уровень полиморфизма по микросателлитным локусам для сортов и селекционных клонов картофеля. Уровень полиморфизма изученных локусов составил 97,6%. Этим, по их мнению и мнению Ghislain M., Nunez J и др. (2009) и определяется ценность данного метода для оценки генетического разнообразия и достоверной идентификации генотипов картофеля [15].

Разработка надежных, быстрых, эффективных и дешевых молекулярно-генетических методов идентификации сортов картофеля остается крайне актуальной и требует дальнейших исследований.

Список использованной литературы

1. Hosaka K., Ogawa K. Genetic diversity in Japanese and North American potato cultivars evaluated by RAPD analysis. // Sci. Rep. Fac. Agr. Kobe Univ. -1994.-V. 21.-P. 39-42.
2. Зайцева Н.Д. Методические указания по определению районированных сортов картофеля. -М.: Россельхозиздат, 1972. - 103 с.
3. Костина Л.И. Руководство по апробации картофеля. - М.: Агропром-издат, 1985.-95 с
4. Уайтхед Т., Мак-Интош Т., Финдлей У. Определение сортов картофеля по ботве. Определение сортов картофеля по генеративным органам. / Картофель.-М., 1955. - С. 40-58. (перевод с англ.).
5. Мусин С.М., Петухов С.Н., Якупова Р.Х., Симакова А.А., Дементьева З.А., Шмыгля И.В., Бирюкова В.А., Дорохов Д.Б., Игнатов А.Н., Цветков И.Л. Методические указания по использованию белковых маркеров для идентификации генотипов картофеля. - М., 2003. - 25 с.
6. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве. // Сельскохозяйственная биология, 1997. - №5. - С. 3-21.
7. Созинов А.А. Генетические маркеры у растений. // Цитология и генетика. - 1993.-т. 27.-№5.-С. 3-14.
8. Bailey D.C. Isozymic variation and plant breeder's right. / Tanksley S.D., Orton T.J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding, part A. - Elsevier, Amsterdam, 1983.-P. 425-440.
9. Gorg R., Schachtschabel U., Ritter E., Salamini F., Gebhardt C. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. // Crop Sci. - 1992. -V. 32. - P. 815-819.
10. Yumiko F., Hiroyuki F., Hiroshi Y. Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers // Breeding Science. - 2009. - Vol. 59. - P.159-167.
11. Stegemann H., Matern U., Loeschke V. Protein patterns of potato tubers regenerated from protoplasts. / Jahresbericht. Biol. Bundesanst. Braunschweig F.R.G., 1979.-P 121.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. // Nature. - 1979. - V. 227. - P. 680-685.
13. Milbourne D., Meyer R.C., Collins A.J., Ramsay L.D., Gebhardt C, Waugh R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. // Mol. Gen. Genet. - 1998. - V. 259. - P. 233-245.
14. А.К. Есимсеитова, А.А. Какимжанова. Изучение генетического разнообразия образцов картофеля микросателлитными маркерами / Вестник Каз НУ. Серия биологическая. №1/2 (60). 2014 с. 217-221.
15. Ghislain M., Nunez J., Rosario Herrera M., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic

identity kit for potato //Molecular Breeding. - 2009. - Vol. 23. - P. 377- 388.