

М. Н. Шаптуренко, ст. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
А. В. Якимович, ст. науч. сотрудник Института овощеводства;
Т. В. Печковская, лаборант 2-й категории ИГиЦ НАН Беларуси;
В. Н. Леонтьев, доцент; Л. В. Хотылева, гл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси

ДНК-ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КОЛЛЕКЦИИ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ (*BRASSICA OLERACEAE* L.) НА ОСНОВЕ RAPD-МАРКЕРОВ

Studying of molecular-genetic heterogeneity of white cabbage collection on a basis polymerasic chain reaction with arbitrary primers. DNA-polymorphism of an experimental material is estimated. DNA-fingerprinting has allowed to carry out clustering of white cabbage samples and to select polymorphic groups of genotypes for using in hybridization.

Введение. Успех селекционной работы в значительной степени определяется не только использованием эффективных методов и схем селекционного процесса, наличием соответствующего исходного материала, но и степенью его генетической изученности. Это позволяет целенаправленно использовать сортовое разнообразие и подбирать комбинации скрещивания, что имеет первостепенное значение для повышения эффективности рекомбинационной селекции.

Развитие новых технологий улучшения качества и продуктивности растений во многом зависит от прогресса в исследовании полиморфизма макромолекул. Более эффективно дискриминировать генотипы позволяют ДНК-маркеры, так как они охватывают большую часть генома, включая структурную и неструктурную зоны. Для исследований геномной организации селективируемых форм в настоящее время используют методы ПЦР-анализа [1–3].

ПЦР-технология, основанная на амплификации участков ДНК, фланкированных олигонуклеотидными затравками, широко используется в различных направлениях исследований, в том числе генетике растений. С помощью методов ПЦР конструируют генетические карты, проводят генотипирование и анализ структуры популяций, картируют локусы количественных признаков, маркируют признаки [4, 5]. Различным аспектам применения ДНК-технологий посвящен ряд обзоров [1, 6].

Кооперативное использование ДНК-маркеров с методами классической генетики повышает разрешающую способность эксперимента, а выявление сцепления между молекулярными маркерами и характером проявления признака(ов) способно в значительной степени повысить эффективность отбора в селекции, при этом сократив экономические затраты. В связи с этим в прогрессивных странах ведется маркерсопутствующая селекция, где объединены усилия селекционеров и молекулярных биологов [7].

В основе метода ПЦР лежит способность фермента ДНК-полимеразы осуществлять на-

правленный синтез комплементарной цепи ДНК по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы. Каждая из вновь синтезированных копий ДНК может служить матрицей для новых копий ДНК в последующих циклах амплификации.

Наиболее простым и доступным является использование метода полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA), позволяющий анализировать некодирующие участки структурных генов и последовательности ДНК, отношение которых к структурным генам, как правило, неизвестно [8]. Метод отличается высокой технологичностью и возможностью проследить одновременно вариабельность большого числа локусов, что особенно ценно для генетического типирования линий и сортов растений.

Благодаря простоте и надежности метод используется для решения ряда задач при создании селекционно-значимых форм в биотехнологии и селекции. RAPD-анализ широко применяется для идентификации и паспортизации (сортов, линий, видов, клонов), установления филогенетических взаимоотношений между различными группами организмов, изучения генетического разнообразия популяций [9].

Целью настоящей работы было изучение молекулярно-генетической гетерогенности коллекции капусты белокочанной белорусской селекции.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 20 линий капусты белокочанной: Er-5, Ep7ms, Br, Khar-4, Upt-8, Ant-1, Meg-S2, Rd8S2, Tr-6, Rus-5, Dt-46, I-34, Cm-3, Sf-1, Par-4, Par-9, Sus-1, Et-1, Dn-26, Et-3 из коллекции Института овощеводства.

Использовали методы полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами (RAPD PCR).

ДНК выделяли из 7-дневных этиолированных проростков, гомогенизированных в лизирующем буфере, содержащем 0,05M ЭДТА; 0,1M трис-HCl pH 8.0; 0,5M NaCl; 1,25% SDS. Депротеинизировали смесью фенол – хлороформ, ДНК осаждали этанолом и растворяли до концентрации 10 нг/мкл.

Для полимеразной цепной реакции использовали 10-членные произвольные праймеры, синтезированные по аналогам фирмы Oregon Technology (OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-20, OPA-06, OPB-01, OPW-01, OPW-02, OPW-04, OPW-05, OPW-06, OPW-08, OPW-11, OPW-13, OPW-15, OPK-08, OPT-08, OPW-09, OPW-10, OPW-15, P 336, P 37, P 46, P 53). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Bio-Rad».

Реакционная смесь для проведения RAPD PCR объемом 20 μ l содержала: 0,2 mM каждого dNTP, 10 pM праймера, 2,5 mM MgCl₂, 10 ng ДНК, 0,15 ед. Taq-полимеразы в 1x буфере.

Генетические дистанции рассчитывали по Nei (Nei and Li, 1979):

$$GD_{xy} = 1 - \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y},$$

где N_{xy} – число полиморфных фрагментов образца x и y ; N_x – число фрагментов образца x ; N_y – число фрагментов образца y .

Условия реакции амплификации:

- первая денатурация – 94°C 4 мин;
- 1–5 циклов – 94°C 1 мин, 35°C 2 мин, 72°C 2 мин;
- 40 циклов – 94°C 1 мин, 38–42°C 1,40 мин, 72°C 2 мин;
- заключительная элонгация – 72°C 6 мин.

Продукты амплификации разделяли в 1,8%-ном агарозном геле и фотодокументировали.

Кластеризацию экспериментального материала осуществляли методом UPGMA с помощью программного пакета Treeconw (version 1.3b). Достоверность проведенной кластеризации оценивали на основе bootstrap-анализа.

Результаты и их обсуждение. При проведении RAPD PCR с ДНК 30 образцов капусты белокочанной из коллекции РУП «Институт овощеводства» все праймеры эффективно обеспечивали синтез наборов ампликонов, число которых варьировалось от 2 до 13 в зависимости от праймера (рис. 1, 2). Основная зона распределения фрагментов располагалась в диапазоне от 200 до 1300 п. н. Общее количество различных по молекулярной массе ампликонов, генерируемых амплификацией участков

ДНК с произвольными праймерами, у анализируемых линий составило 208, из них 33 полиморфны (15,8%). Полиморфные фрагменты расценивали как единичные RAPD-локусы. Рассматривали присутствие-отсутствие продуктов амплификации.

Анализ внутримолекулярной гетерогенности ДНК позволил дискриминировать генотипы образцов капусты белокочанной. На основании анализа фрагментов, генерируемых в результате полимеразной цепной реакции, проведена оценка генетических взаимоотношений между образцами коллекции невзвешенным парногрупповым методом UPGMA (рис. 3).

В результате выделено два субкластера со сложной иерархией. В первый субкластер вошли линии Er-5, Ep7ms, Br, Har-4, Upt-8, Ant-1, Meg-S2, Rd8-S2, Tr-6, Rus-5, причем пары Er-5 и Ep7ms, Upt-8 и Ant-1, Tr-6 и Rus-5 образовали общие кластеры с удалением GD = 0,2. Второй субкластер составили парные кластеры линий Dt-46 и I-34, Cm-3 и Sf-1, Par-4 и Par-9, Sus-1 и Et-1. Селекционные образцы Et-3 и Dn-26 образовали внешние ветви с максимальным удалением (GD) 0,42 и 0,38 соответственно.

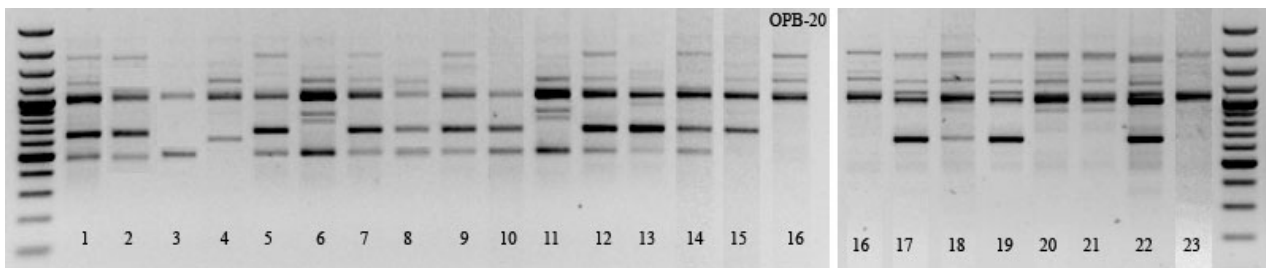


Рис. 1. Фингерпринтинг амплификации с праймером OPB-20

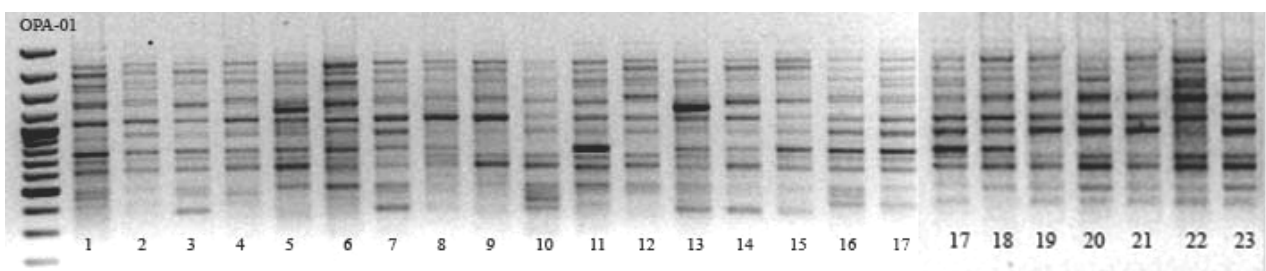


Рис. 2. Фингерпринтинг амплификации с праймером OPA-01

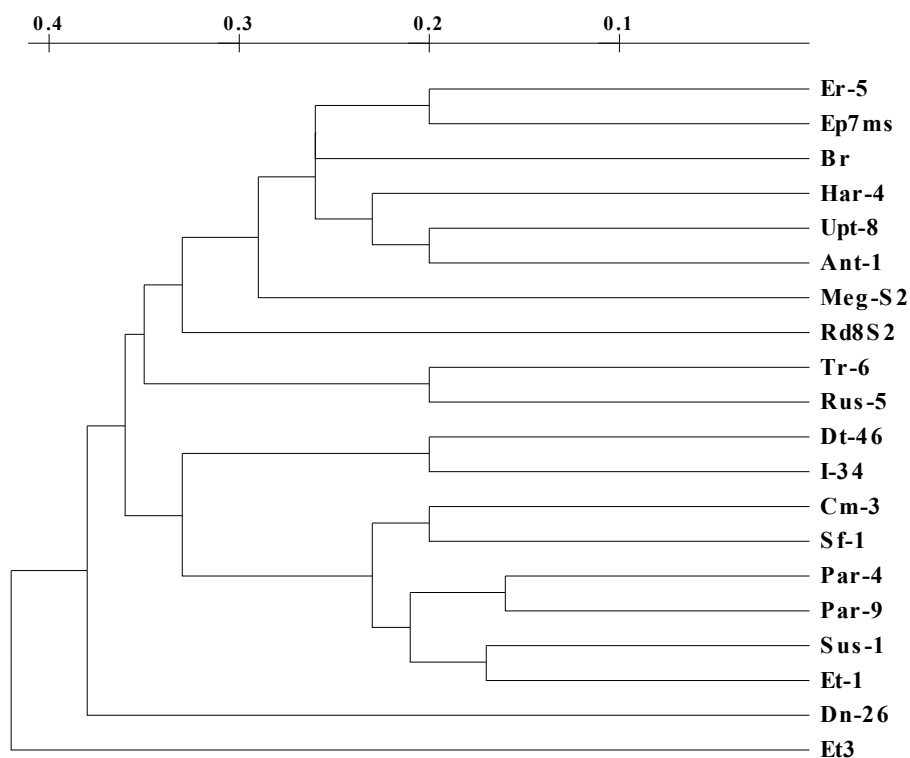


Рис. 3. Древоподобная кластеризация образцов капусты белокочанной, построенная на основе невзвешенного парного группового метода (UPGMA)

Выводы. Полученные данные позволили выделить полиморфные группы, которые можно рекомендовать для использования в гетерозисной селекции (межгрупповые скрещивания – субкластеры I-II), а также линии Et-3 и Dn-26 как наиболее генетически удаленные для использования в качестве одного из компонентов скрещивания с группами I и II.

Литература

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: науч.-метод. р-во / под ред. Ю. М. Сиволапа. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.
2. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 175 с.
3. Tingey, S. V. Genetic analysis with RAPD markers / S. V. Tingey, J. A. Rafalski, M. K. Hanafey // *Plant. Mol. Biol.* – 1994. – V. 81. – P. 491–498.
4. Farinho, M. SCAR and CAPS markers flanking the *Brassica oleraceae* L. Pp523 downy mildew resistance locus demarcate a genomic re-

gion syntetic to the top arm end of *Arabidopsis thaliana* L. chromosome 1 / M. Farinho, P. Coelho, A. Monteiro // *Euphytica*. – 2007. – V. 157. – P. 215–221.

5. Shen, J. Prediction of heterosis using QTLs for yield traits in rapeseed (*Brassica napus* L.) / J. Shen, T. Fu, G. Yang // *Euphytica*. – 2006. – V. 151. – P. 165–171.

6. Cardoza, V. Brassica Biotechnology: Progress in cellular and molecular biology / V. Cardoza, C. Stewart // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2004. – V. 40. – P. 542–551.

7. Arunachalam, V. Marker-aided genetic divergence analysis in *Brassica* / V. Arunachalam, Sh. Verma, V. Sujata // *J. Genetics*. – 2005. – V. 84. – P. 123–130.

8. Календарь, Р. Н. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами / Р. Н. Календарь, Ю. М. Сиволап // *Биополимеры и клетка*. – 1995. – № 3. – С. 55–65.

9. Lazaro, A. I. Genetic diversity in *Brassica oleraceae* L. (Crutifiraea) and wild relative (2n=18) using RAPD markers / A. Lazaro, I. Aguinagalde // *Annals of Botany*. – 1998. – V. 82. – P. 829–833.