

УДК: 633. 18:632. 488.42:575

UDK: 633. 18:632. 488.42:575

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИОННО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**MOLECULAR MARKERS AND HOW TO USE
THEM IN BREEDING AND GENETIC
RESEARCHERS**

Мушина Жанна Михайловна
к.б.н., доцент

*ФГОУ «Региональный институт агробизнеса»,
Краснодар, Россия*

Mukhina Zhanna Mikhailovna
Cand.Biol.Sci., senior scientific worker

Regional Institute of Agrobusiness, Krasnodar, Russia

Дубина Елена Викторовна
к.б.н., старший научный сотрудник

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт риса, п.Белозёрный, Краснодар, Россия*

Dubina Elena Viktorovna
Cand.Biol.Sci., senior scientific worker

*All Russian Rice Research Institute, Belozerny,
Krasnodar, Russia*

Прогресс молекулярной генетики привел к развитию различных типов ДНК-маркеров, основанных на анализе полиморфизма нуклеотидной последовательности ДНК. Их использование коренным образом изменило методы оценки генетического разнообразия, паспортизации и классификации сортов растений

Progress of molecular genetic developed different types of DNA-markers, which are founded on analysis of DNA-polymorphism. Using of these markers has changed methods of genetic diversity estimation as well as plant cultivars passportisation and classification

Ключевые слова: ДНК-МАРКЕР,
МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ,
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

Keywords: DNA-MARKER, MOLECULAR
MARKING, GENETIC DIVERSITY

«Маркерная технология» вошла в биологию довольно давно. В генетике маркером называют ген известной локализации, по которому можно выявлять другие гены.

Любая субстанция, претендующая на роль маркера, должна отвечать определенным требованиям. По мнению ряда исследователей, молекулярные маркеры должны обладать определенными свойствами и отвечать определенным требованиям: высокий уровень полиморфизма; кодоминантный характер наследования; оптимальный уровень встречаемости в геноме для решения конкретных задач; равномерное распределение в геноме по хромосомам; селективно нейтральное поведение; легкая оценка параметров маркера; возможность автоматизации оценки параметров маркера; высокая воспроизводимость

оценки параметров маркера; возможность легкого обмена данными между лабораториями.

Преимущество белковых и ДНК-маркеров в том, что они расположены ближе других субстанций к носителю наследственной информации или сами являются ею [1].

Белковые маркеры. В качестве маркеров для решения самых разных проблем биологии наиболее широко используются две основные группы белков – изоферментные системы и запасные белки семян (клубней).

Изоферменты. *Изоферментами* называются генетически детерминированные множественные молекулярные формы ферментов, выявляемые у особей одного и того же вида, обладающие одинаковой субстратной специфичностью, но различающиеся своей первичной структурой и физико-химическими свойствами: подвижностью в электрическом поле, сродством к субстрату и ингибиторам, термостабильностью и т. д.

Начало развития генетики изоферментов положено работами Хантера и Маркерта, Маркерта и Меллера [2].

Основным методом исследования изоферментов является электрофоретическое разделение экстрактов белков в различных гелях: крахмальном, полиакриламидном, полиацетатном, агаровом – с последующей специфической гистохимической окраской с целью непосредственного выявления в геле зон локализации фермента.

Ниже представлены некоторые ферменты растений, успешно выявленные в крахмальном геле [3]:

АСР, кислая фосфотаза; АСО, аконитаза; АК, аденилаткиназа; АЛАТ, аланинаминотрансфераза, АДН, алкогольдегидрогеназа, АЛД, альдолаза; АКР, щелочная фосфатаза, АМР, аминопептидаза, САТ, каталаза; СОХ, катехолоксидаза; DIA, диафораза; EST, эстераза; FDH, формиаатдегидрогеназа; FDP, фруктозо-1, 6-дифосфотаза; FUM, фумараза; α -

GAL, α -галактозидаза; β -GAL, β -галактозидаза; G-6-PDH, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; β -GLU, β -глюкозидаза; GDH-глютаматдегидрогеназа; GS, глютаминсинтетаза; G-3-PDH, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; GLDH, глицератдегидрогеназа; α -GPDH, α -глицерофосфатдегидрогеназа; НК, гексокиназа; IDH, изоцетратдегидрогеназа; (Номенклатура изоферментов разработана и принята Международной комиссией (IUPAC-IUB, 1971)).

Запасные белки злаков как маркеры. Запасные белки сельскохозяйственных культур наряду с изоферментами представляют удобный объект для проведения прикладных и фундаментальных исследований в генетике и селекции. Принципиально важно, что семя – фиксированная фаза онтогенеза. Запасные белки семян остаются неизменными в течение многих лет.

Белки семян интенсивно исследуются на протяжении более двух столетий. По классификации, предложенной Осборном [4; 5], белки зерна делятся на: альбумины, растворимые в воде и включающие в себя в основном белки-ферменты; глобулины, растворимые в разбавленных растворах солей и присутствующие в мембранно-связанных белковых телах, т. е. это запасные белки в строгом смысле этого слова; проламины, растворимые в водно-спиртовых растворах и также являющиеся истинно запасными белками; глютелины, растворимые в кислых или щелочных растворах и являющиеся в основном структурными или запасными белками, хотя некоторые из них могут иметь метаболические функции.

Основная масса запасных белков накапливается в эндосперме и семядолях и служит источником питательных веществ для прорастающих семян. У пшеницы, ячменя, кукурузы, сорго, ржи, риса запасные белки представлены в основном проламинами и глютелинами. Проламины пшеницы называют глиадинами, ячменя – гордеинами, кукурузы – зеинами, ржи – секалинами, овса – овенинами. У овса и зернобобовых

культур запасные белки в основном представлены глобулинами и глютелинами, риса – проламинами и глютелинами.

С помощью белков был сделан настоящий прорыв в исследованиях популяционной генетики. Однако со временем стали заметны и существенные ограничения белковых маркеров, основным из которых можно считать тот факт, что анализ белков позволяет тестировать изменения только в белоккодирующих последовательностях, а также их зависимость от модифицирующих условий среды, в том числе органа, ткани и фазы развития растения.

В настоящее время в связи со стремительным развитием ДНК-технологий белковые маркеры оказались практически вытесненными из популяционной генетики изучением полиморфизма на уровне ДНК, что позволяет тестировать генетическую изменчивость не на уровне продуктов экспрессии гена, а на уровне генома.

ДНК-маркеры характеризуются повсеместностью распространения, менделеевским типом наследования для ядерной ДНК и материнским – для ДНК клеточных органелл, множественностью аллелей и высокой гетерозиготностью, кодоминантным выражением и стабильностью наследования, селективной нейтральностью, в большинстве случаев простотой и надежностью тестирования, а также отсутствием плейотропного эффекта в отношении хозяйственно важных признаков. К тому же в качестве исходного материала возможно использование любых тканей и органов, независимо от места синтеза кодируемого данным геном белка.

Полиморфные последовательности ДНК используются для маркирования генов, участков хромосом, генома, особей, популяций и видов в решении различных задач, в том числе и для селекции.

Из них можно выделить следующие: генетическое картирование; оценку генетического полиморфизма (гетерозиготность популяции,

микроэволюция); филогению и таксономию; генотипирование (фингерпринтинг – дактилоскопия) особей, линий, семейств, популяций, видов; использование в селекции (MAS, marker assistant selection – селекция с помощью маркеров); выявление дефектных генов, ответственных за развитие наследственных болезней; диагностику инфекций, сложных для фенотипического определения, вызываемых латентными вирусами [6].

Типы ДНК-маркеров. ДНК-полиморфизм тестируют различными способами, включая прямое определение нуклеотидной последовательности интересующего исследователя участка (секвенирование).

ДНК-маркерные технологии условно можно разделить на две основные группы: с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и без такового.

Использование полиморфизма длины рестриктных фрагментов (restriction fragment length polymorphism-RFLP) является основным методом молекулярного маркирования без применения ПЦР. Для анализа данного полиморфизма выделенная из растительных тканей ДНК «разрезается» специфичными бактериальными ферментами – рестриктазами, мишенью которых служат короткие специфические последовательности ДНК – сайты рестрикции [7]. Продукты рестрикции разделяют электрофорезом в агарозном геле.

После электрофоретического разделения их переносят из агарозного геля на нейлоновую мембрану с помощью Саузерн-блоттинга, «проявляют» путем гибридизации с радиоактивными зондами-фрагментами ДНК и затем анализируют по положению на радиоавтографах [8].

В качестве зондов могут служить случайные продукты рестрикции геномной ДНК, однако чаще всего используют клоны уникальных и редко

повторяющихся последовательностей ДНК, применяемых для составления молекулярных карт геномов и физического картирования генов [9].

В отличие от морфологических маркеров RFLP-маркеры кодоминантны, что позволяет различать гомо- и гетерозиготы. С применением данной маркерной системы составлены генетические карты для многих видов растений. У риса, например, картировано 3500–4000 RFLP-маркеров [10].

Понятие полимеразной цепной реакции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была открыта в 1983 г. Кэрри Б. Мюллисом, за что автор был удостоен Нобелевской премии. Впервые ПЦР была осуществлена в 1985 г. фирмой Cetus, а последующее использование термостабильной ДНК-полимеразы в ПЦР существенно расширило возможности ее применения [11].

Эта реакция позволяет многократно воспроизвести (амплифицировать) целевые участки генома.

Для того чтобы осуществить этот процесс *in vitro*, используют две генетические пробы, называемые праймерами, которые и служат в качестве затравки для синтеза выбранного маркерного участка ДНК. Помимо праймеров основными компонентами ПЦР являются: фермент Taq – ДНК-полимераза; 4 типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ); копируемая ДНК (матрица); ионы Mg^{+2} . Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

При внесении в исследуемую пробу праймеры присоединяются к комплиментарному им фрагменту ДНК, образуя таким образом двунитиевый стартовый участок. После присоединения праймеров начинается воспроизведение специфического участка, расположенного между 5' концами праймеров с помощью фермента ДНК-полимеразы. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации. Это и есть цепная

реакция в ПЦР. В течение 30–40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное для того, чтобы визуально учитывать результаты реакции после электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.

В настоящее время экспериментально опробованы десятки маркерных систем, основанных на полиморфизме ДНК. Ниже описаны наиболее значимые.

Первым появился метод случайно выбранных последовательностей ДНК (randomly amplified polymorphic DNA – **RAPD**), в котором используют стандартные наборы праймеров; он основан на анализе случайно амплифицированной полиморфной ДНК. При выполнении данного вида анализа полиморфизм определяется как присутствие – отсутствие в электрофоретических спектрах специфических фрагментов ДНК и обусловлен различиями последовательностей ДНК в местах посадки праймеров. (12)

AFLP-технология (amplified fragment length polymorphism). Эта технология позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участках посадки праймеров (присутствие или отсутствие в спектре) и небольшими вставками-делециями внутри рестрикционного фрагмента (изменение полосы в спектре) [13].

Технология AFLP представляет собой нечто промежуточное между RFLP и RAPD-анализом. AFLP – сложный метод и состоит из нескольких этапов: геномная ДНК рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI) с образованием фрагментов с выступающими 3'-концами. Затем рестрикционная геномная ДНК лигируется с адаптером, содержащим «липкие» концы для данных рестрикционных сайтов. После этого проводятся две последовательные ПЦР. В первой (преамплификация) используют праймеры, полностью комплементарные адаптерам EcoRI и MseI. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов

амплификации, которые невозможно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэтому во второй ПЦР праймеры с адаптерами EcoRI и MseI содержат на 3'-конце дополнительные и некомплементарные адаптерам основания (от 1 до 3) для селективной амплификации. Разделение фрагментов ДНК проводят в полиакриламидном геле с радиоактивной или флуоресцентной меткой. Получаемый фингерпринт ДНК обычно высокополиморфен и, как правило, хорошо воспроизводим.

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). В этом методе, также как и в RAPD, используется один или несколько праймеров длиной 15–24 нуклеотида. Но в данном случае праймеры состоят из тандемных коротких 2–4 нуклеотидных повторов, например: 5'-CA CA CA CA CA CA CA CA G, и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера. Продукты ISSR-амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера. Но изучаемые последовательности остаются анонимными [14].

Одна из наиболее информативных ДНК-систем молекулярного маркирования сельскохозяйственных культур – так называемые **микросателлитные последовательности ДНК (SSR).**

В геномы эукариот сплошь встроены простые последовательности, которые могут состоять из 4, 3, 2 и даже одного нуклеотида. Позже эти регионы были названы «микросателлитами» [15].

Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в ДНК высших растений. Они были обнаружены у 34 видов. Средняя частота встречаемости на ДНК – каждые 50 килобаз. Обследование баз данных для 54 видов растений показало, что среди SSR последовательностей в геноме ядра преобладают ди-, три- и тетрануклеотидные повторы [16].

Источник полиморфизма этих последовательностей – в сайт-специфическом варьировании длины повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора.

Эксперименты по изучению генетического разнообразия культурного риса обнаружили до 25 аллелей на один микросателлитный локус. В результате работ Akagi et al (1996) и McCouch et al (1997) [17] при скрининге геномной библиотеки риса общее количество микросателлитов было оценено в 5700–10000, причем относительная частота встречаемости различных повторов уменьшается с увеличением размера повтора.

Последующее секвенирование генома риса позволило предположить, что общее количество микросателлитных последовательностей составляет порядка 100 000. Около 10 000 микросателлитных маркеров локализованы на генетической карте риса, вся информация о них доступна благодаря сети Интернет на сайте www.gramene.org.

SSR-маркеры стабильны в соматических клетках, их наследование носит кодоминантный характер, распределены по всему геному.

ДНК-фингерпринт с помощью ретротранспозонов. В настоящее время методы RAPD, ISSR, AFLP и SSR легли в основу создания новых маркерных систем, использующих последовательности ретротранспозонов для анализа геномов. Длинные концевые повторы (LTR) ретротранспозонов несут регуляторные сайты, опознаваемые некоторыми ядерными факторами.

SSAP. Метод SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism) – это модификация метода AFLP. Отличие заключается в двухступенчатой ПЦР. ДНК исследуемых образцов расщепляется рестриктазами PstI и MseI, образуя фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная ДНК лигируется с PstI-а MseI-адапторами. Первая ПЦР (преамплификация) проводится с праймерами от PstI- и MseI-адапторов, т. е. амплифицируются все возможные комбинации сочетания этих адаптеров

в рестрицированной геномной ДНК. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов амплификации фрагментов ДНК, локализованных между праймерами и адаптерами. ПЦР-продукты разбавляются и используются для второй, селективной ПЦР, которая проводится с меченым праймером к LTR и любым праймером адаптеров, с PstI или MseI. В результате амплификации образуется фрагмент ДНК между LTR и адаптером.

IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – полимеразная цепная реакция между праймерами, комплементарными последовательностям двух рядом расположенных LTR ретротранспозонов [18].

REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism). REMAP – впервые описана как метод ДНК «отпечатков» для ячменя. ПЦР проходит между праймером к фрагменту LTR ретротранспозона и праймером рядом расположенного простого микросателлитного повтора (SSR-праймер). В данном случае позиция амплифицируемого фрагмента ретротранспозона «заякоривается» путем использования праймера к микросателлитному локусу. В REMAP применяют варианты LTR-праймеров как для 5'-, так и для 3'-конца LTR, как и в IRAP. К достоинствам метода относятся относительная простота и потенциально большое количество комбинаций праймеров из различных ретротранспозонов и микросателлитов (REMAP) [18].

Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что применение ДНК-маркеров выводит селекцию сельскохозяйственных растений на качественно новый уровень, позволяя оценивать генотипы напрямую, а не через фенотипические проявления, что в конечном счете реализуется в создании сортов и гибридов, обладающих комплексом ценных признаков, ускоренными темпами.

Список литературы:

1. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 245 с.
2. Markert C. L., Moller F. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species patterns // *Proc. Nat. Acad. Sci. Us.* – 1959. – V. 45. – P. 753–763.
3. Wendel J. F., Stuber C. W., Goodman M. M. Plant isozymes: Enzymes studied and buffer systems for their electrophoretic resolution in starch gels. – *Isozyme bulletin*, 1984. – V. 17. – P. 4–11.
4. Osborne T. B. The proteins of the wheat kernels. Wash. (D.C.): Carnegie Inst., 1907.
5. Osborne T. B. The vegetable proteins. 2nd ed. L.: Longmans, green and Co, 1924.
6. Jaisval P., Ware D., Ni J., Chang K. et al. Gramene: Development and integration of trait and gene ontologies for rice // *Comparative and functional genomics.* – 2002. – Vol. 3. – P.132–136
7. Льюин Б. Гены. – М.: Мир, 1987. – 544 с.
8. М. Чан В.– Т. В. Гибридизация нуклеиновых кислот // *Молекулярная клиническая диагностика.* – М.: Мир, 1999. – С. 375–394.
9. Kurata N., Umehara Y., Tanoue H., Sasaki T. Physical mapping of the rice genome with YAC clones // *Plant. Mol. Biol.* – 1977. – V. 35. – P. 101–113.
10. Sasaki T. Genome mapping, molecular marker and marker assisted selection in crop plants // *Molecular Breeding.* – 1977. – V. 3. – P. 87–103.
11. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // *Молекулярная клиническая диагностика.* – М.: Мир, 1999. – С. 395–427
12. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Боброва В. К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // *Генетика.* – 1999. – Т. 35. – С. 1538–1549.
13. Хавкин Э. Е. Молекулярные маркеры а растениеводстве // *Сельскохозяйственная биология.* – 1997. – № 5. – С. 3–19.
14. Глазко В. И., Глазко Т. Т. ДНК-технологии в генетике и селекции: Курс лекций. – Краснодар: ВНИИ риса, 2006. – 399 с.
15. Litt M., Luty J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene // *Am. J. Hum. Genet.* – 1989. – V. 44. – P. 388–396.
16. Diwan N., Cregan P. B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – V. 95. – P. 723–733.
17. McCouch S. R., Chen X., Panaud O., Temnykh S., Xu Y. et al. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – V. 35. –P. 89–99.
18. Powell W., Morgante M., Andre C., Hamfey M. A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis // *Mol. Breed.* – 1996. – V. 2. – P. 225–238.