

УДК 663.252.41: 575.22

UDC 663.252.41: 575.22

03.00.00 Биологические науки

Biology

**ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОВРЕМЕННЫХ
РОССИЙСКИХ СОРТОВ РИСА С
ПРИМЕНЕНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ***

**ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОВРЕМЕННЫХ
РОССИЙСКИХ СОРТОВ РИСА С
ПРИМЕНЕНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ**

Супрун Иван Иванович^{1,2}
к.б.н., ведущий научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ):7124-5304

Suprun Ivan Ivanovich^{1,2}
Cand.Biol.Sci., leader researcher
SPIN: 7124-5304

Ковалев Виктор Савельевич¹
д. с-х. наук, зам.директора по науке

Kovalyov Viktor Savelyevich¹
Dr.Sci.Agri., deputy director in science

Токмаков Сергей Вячеславович²
к.б.н., научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ):3196-9049

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich²
Cand.Biol.Sci., staff scientist
SPIN:3196-9049

Белан Ксения Александровна³
студент
1-Всероссийский научно-исследовательский институт риса, г. Краснодар, Россия
2-Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар, Россия
3- Кафедра генетики и микробиологии, Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия
supruni@mail.ru

Belan Kseniya Alexandrovna³
student
1-All Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Russia
2-North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Krasnodar, Russia
3 - Department of genetics and microbiology, Kuban state university, Krasnodar, Russia
supruni@mail.ru

В ходе исследования было выполнено генотипирование 22 отечественных сортов риса современной селекции с использованием микросателлитных ДНК-маркеров. ДНК-маркеры проявили различный уровень полиморфизма – от двух до восьми аллелей на локус. Для всех изученных сортов получены уникальные SSR-профили

In the presented study, we have performed genotyping of modern Russian rice cultivars using microsatellite DNA-markers. The markers showed different level of allelic polymorphism: from 2 to 8 alleles per locus. For all studied cultivars, unique DNA-fingerprints were obtained

Ключевые слова: РИС, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ДНК-МАРКЕРЫ, ДНК-ПАСПОРТ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ

Keywords: RICE, MICROSATELLITE DNA-MARKERS, DNA-PASSPORTISATION, GENETIC DIVERSITY, ALLELIC POLYMORPHISM

Doi: 10.21515/1990-4665-131-065

Введение

Изучение генетического разнообразия является важным научным направлением генетике культурных растений. Комплексная характеристика коллекций генетических ресурсов, анализ генетической

* Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-44-230244 p_a)

структуры генофонда и оценка степени генетического родства с использованием молекулярно-генетических методов является важным этапом, необходимым для наиболее эффективного использования генетических ресурсов. Наряду с этим анализ генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов, а также оценка степени генетического сходства групп генотипов, представляющих разные эколого-географические региона, позволяет получить важные знания для изучения филогенетических взаимосвязей микроэволюционных путей формирования генофонда на уровне вид/подвид.

К наиболее перспективным методам анализа генетического разнообразия следует отнести метод на основе анализа микросателлитных локусов (SSR). SSR-маркеры – простые повторяющиеся последовательности – широко используются в генотипировании и при конструировании генетических карт. Их широкое применение обусловлено равномерным распределением по геному, высоким полиморфизмом, кодоминантным характером наследования и воспроизводимостью результатов анализа. Эти характеристики сделали SSR-маркеры одними из наиболее часто используемых молекулярных ДНК-маркеров при анализе генетического разнообразия, картировании генов, популяционного анализа, выяснении филогенетических взаимосвязей на уровне вид/подвид/род и идентификации генотипов [1].

У риса было в результате работ Akagi et al (1996) и McCouch et al (1997) было выявлено, что относительная частота встречаемости различных повторов уменьшается с увеличением размера повтора. При этом скрининге геномной библиотеки, имевшейся в то время, выявил наличие около 5700-10000 микросателлитных последовательностей [2-4]. Последующее секвенирование генома риса позволило предположить, что общее количество микросателлитных последовательностей, составляет порядка 100000 [5].

Анализ мировой научной деятельности в научно-исследовательских организациях, занимающихся вопросами генетики риса, позволяет говорить о том, что данное направление исследований является актуальным в мире в настоящее время. Подтверждением этому является широкий перечень публикаций по данной тематике в мировой научной печати.

Так, к примеру, в исследовании, выполненном группой китайских и южнокорейских исследователей проанализировали 150 сортов риса, из генетических коллекций Южной Кореи, Китая и Японии. Для оценки генетических дистанций изученных групп генотипов и сравнительного анализа уровня генетического разнообразия внутри групп использовали 28 микросателлитных маркеров. Было выявлено, что наибольшим уровнем аллельного полиморфизма по изученным локусам обладает генплазма риса из Южной Кореи. Наименьшим генетическим разнообразием обладали сорта из Японии. Общий уровень генетического разнообразия внутри групп южнокорейских и китайских сортов риса был выше, чем в выборке сортов из Японии [6]. В работе другого авторского коллектива из Индии изучали генетическую структуры коллекции сортов из национального генофонда, при этом в работе были задействованы сорта разных периодов селекции – от 1970-х годов до 2000-х. Кроме того, в выборку вошло 11 стародавних сортов народной селекции. Для генотипирования использовали 64 SSR-маркера, из которых 52 оказались полиморфными в изученной выборке сортов. В результате работы получили данные о степени генетического сходства сортов в изученной выборке, и, кроме того выявили, что уровень аллельного полиморфизма увеличивался в ряду групп сортов по декадам их создания: 1970-е–1980-е–1990-е–2000-е. Это, вполне вероятно может быть связано с вовлечением большего количества исходных форм в селекцию и с диверсификацией селекционных направлений [7].

Наряду с анализом генетической структуры коллекций сортов риса, SSR-маркеры также успешно применяются и для изучения генетического разнообразия природных популяций дикорастущих предковых видов риса [8], а также для анализа генетических взаимосвязей между современными сортами, стародавними сортами народной селекции и дикорастущими формами [9, 10].

Перечень работ по данному направлению достаточно широк, как и перечень стран, в которых аналогичные исследования выполнялись. К сожалению, до настоящего времени в России не выполнялось научно-исследовательских проектов, направленных на изучение генетического разнообразия российского генофонда риса и выяснение его взаимосвязей с генофондом из других регионов мира. В связи с этим, нами поставлена задача изучить генетическое разнообразие отечественного генофонда риса с использованием микросателлитных ДНК-маркеров. На данном этапе работы выполнили SSR-генотипирование выборки из 22 современных сортов риса по 14 маркерам.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования послужили 22 современных отечественных сорта риса селекции ВНИИриса. Образцы ДНК выделяли из свежесрезанной части листовой пластинки растений, а также из 10-15 дневных проростков. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 20мл 1М Tris-HCl (pH 7.5), 5 мл 5MNaCl, 5 мл 0.5MEDTA (pH 8.0), 5 мл 10% SDS в общем объеме 100 мл. Часть листа (2-3см) растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5мл. Инкубировали образцы при 600С в течение 3 часов. Отделяли супернатант центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 500 мкл изопропанола,

оставляли для преципитации на 10-20 минут при комнатной температуре, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 300мкл 70% этанола, высушивали и растворяли в 200мкл 0,1*TE. В ПЦР смесь добавляли по 2,5 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом. ПЦР проводили по стандартным методикам, но с выполнением предварительной оптимизации ряда параметров реакции [11, 12]. Генотипирование проводили с использованием 14 SSR-маркеров: RM1, RM11, RM122, RM168, RM167, RM164, RM510, RM307, RM154, RM162, RM44, RM316, RM19, RM474. Нуклеотидная последовательность праймеров доступна на сайте www.gramene.org. Маркеры были распределены в мультиплексные наборы по 3-4 маркера.

Предварительную оценку продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 2% агарозном геле 30-50 минут при напряжении 150V. В качестве красителя использовали бромистый этидий; гелевые пластины визуализировали в ультрафиолете. Анализ размеров амплифицированных фрагментов SSR – маркеров проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130. Обработку данных осуществляли в программе GeneMapper 4.1. Для подсчета показателя «количество эффективных аллелей» и коэффициента Шеннона, характеризующего уровень информативности маркеров, использовали программу GenAlEx 6.5 [13], дендрограмму построили в программе PAST. Фрагментный анализ SSR-маркеров был выполнен на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» ФГБНУ СКЗНИИСиВ.

Результаты

В ходе генотипирования с использованием мультиплексной ПЦР, при проведении фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130. На рисунке 1 представлены результаты

фрагментного анализа сортов риса Привольный, Анаит и Ивушка по микросателлитным ДНК-маркерам RM 510, RM 307, RM154 и RM162, который вошли в один мультиплексный набор. Результаты представлены в рабочем интерфейсе программы GeneMapper 4.1.

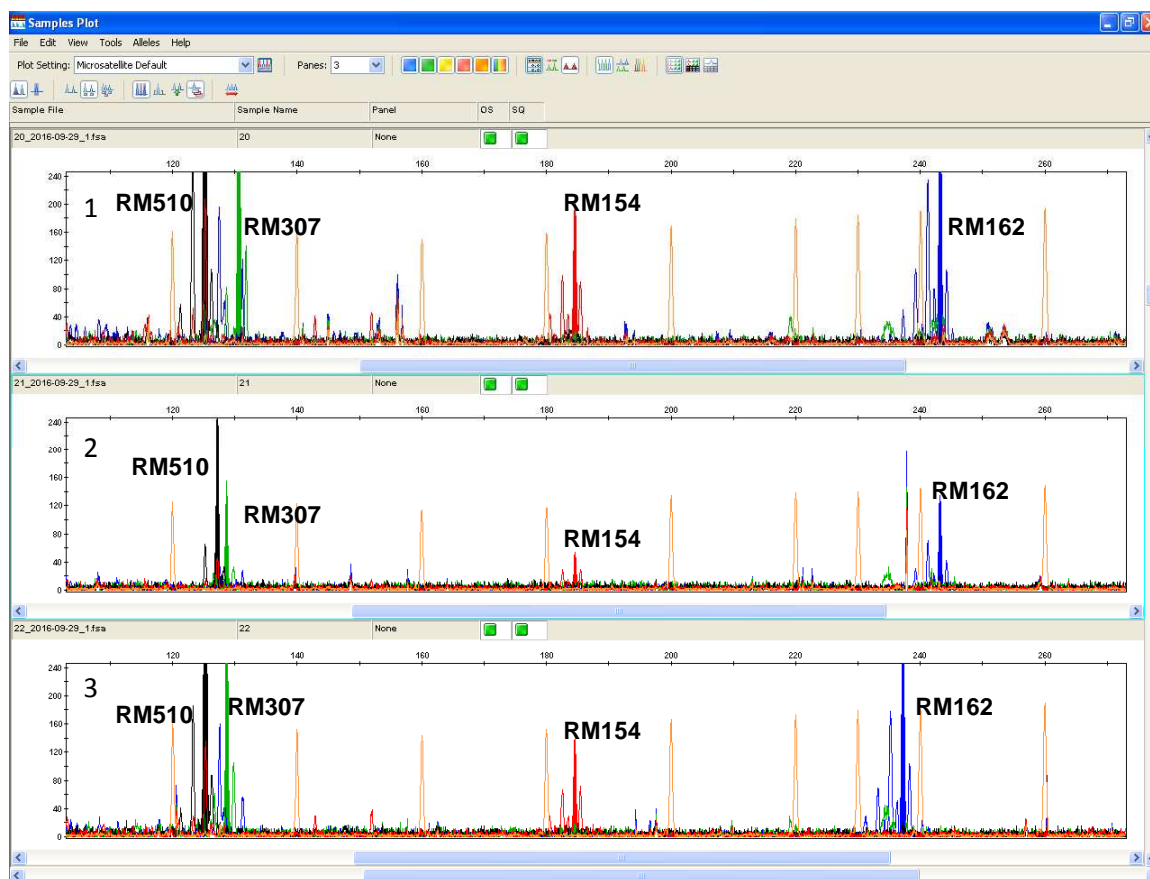


Рисунок 1. Результаты фрагментного анализа сортов риса Привольный (1), Анаит (2) и Ивушка (3) по мультиплексному набору, включающему SSR-маркеры RM 510, RM 307, RM154 и RM162.

Как видно из рисунка, для каждого из маркеров идентифицируются пики на электрофореграмме. Несмотря на близость диапазонов размером фрагментов амплификации у маркеров RM 510 и RM 307, благодаря использованию разных флуоресцентных меток для данных маркеров (черный и зеленый цвет пиков), удастся безошибочно их идентифицировать. В результате работы были получены SSR-

фингерпринты для всех сортов, задействованных в работе. ДНК – фингерпринты для некоторых приведены в таблице 1.

Таблица 1 ДНК-фингерпринты изученных сортов риса по 14 SSR-маркерам

	RM1	RM11	RM122	Rm168	Rm167	Rm164	Rm510	Rm307	Rm154	Rm162	Rm44	Rm316	Rm19	Rm474
Лиман	91	127	224	97	149	271	125	129	185	225	121	200	216	261
Кулон	94	127	230	99	153	269	123	131	189	225	121	200	216	261
Старт	93	127	224	97	149	271	125	129	184	225	121	200	216	261
Рапан	93	127	230	97	149	305	125	129	185	225	121	200	216	261
Лидер	93	133	230	99	149	259: 298	125	129	185	237	117	200	216	261
Регул	100	127	230	97	149	290	125	131	193	243	113	200	216	261
Янтарь	100	133	228	97	149	290	125	129	185	243	117	200	216	261
Сонет	93	127	226	98	149	305	125	129	185	243	121	202	216	261
Привольный	100	127	230	97	149	271	125	131	185	243	121	200	216	261
Анаит	100	127	230	97	149	271	127	129	185	243	123	200	216	261
Ивушка	96	127	229	97	149	298	125	129	185	237	121	200	216	263
Серпантин	96	127	229	99	149	298	125	129	185	237	121	200	216	259
Соната	93	127	228	98	149	259	125	129	185	204	121	200	219	257
Фаворит	100	127	228	97	149	290	125	129	185	247	93	200	216	261
Снежинка	93	134	226	97	129	298	123	131	191	204	93	200	216	261
Ренар	93	127	230	97	149	290	125	131	193	225	117	200	216	261
Визит	96	133	230	99	149	298	125	129	185	237	117	200	216	261
Славянец	93	127	224	97	149	269	125	129	185	237	117	200	216	261
Олимп	100	127	228	97	145	271	125	129	185	237	117	200	216	261
Дружный	93	127	230	97	145	298	125	129	185	243	117	200	216	261
Вираз	93	127	224	97	145	271	125	129	189	225	123	200	216	261
Полевик	93	127	230	97	149	301	125	129	185	225	119	200	216	261

Как видно из таблицы 1, каждый из сортов обладает уникальным SSR-фингерпринтом. При этом очевидно, что маркеры проявили различный уровень полиморфизма. Количество аллелей, выявленных по использованным в работе SSR-маркерам варьировало от двух аллелей на локус – по маркерам RM1, RM316, RM19 и RM307 до восьми аллелей на локус – по маркеру RM164. Для оценки информативности использованных в работе SSR-маркеров рассчитали показатели количество эффективных

аллелей и индекс информативности Шеннона. Они представлены в таблице 2.

Таблица 2 Анализ информативности, использованных в работе SSR-маркеров

Маркер	N*	Na	Ne	I
RM1	22	5,000	2,881	1,254
RM11	22	2,000	1,424	0,474
RM122	22	5,000	3,457	1,414
RM168	22	3,000	1,754	0,760
RM167	22	4,000	1,613	0,752
RM164	22	8,000	5,290	1,833
RM510	22	3,000	1,322	0,485
RM307	22	2,000	1,541	0,536
RM154	22	5,000	1,820	0,949
RM162	22	5,000	3,841	1,432
RM44	22	6,000	3,457	1,447
RM316	22	2,000	1,095	0,185
RM19	22	2,000	1,095	0,185
RM474	22	4,000	1,330	0,548

*N – количество образцов в выборке,

Na– количество аллелей,

Ne– количество эффективных аллелей,

I – индекс информативности Шеннона.

Как видно из таблицы, SSR-маркеры проявили различный уровень аллельного полиморфизма. При этом следует отметить, что один их маркеров в группе маркеров, проявивших более высокий уровень полиморфизма (5 и более аллелей на локус) – это RM154, обладает более низкими показателями «количество эффективных аллелей» и индекс информативности Шеннона. Это связано с неравномерным распределением частот встречаемости его аллелей в изученной выборке образцов. Несмотря на то, что по нему было идентифицировано 5 аллелей, два из них встречаются всего по одному разу, а еще два – по два раза в

изученной выборке генотипов. На долю аллели с размером фрагмента 185 п.н. приходится 72% образцов из изученной выборки.

На основе полученных данных нами было также выполнен кластерный анализ изученных сортов (рисунок 2).

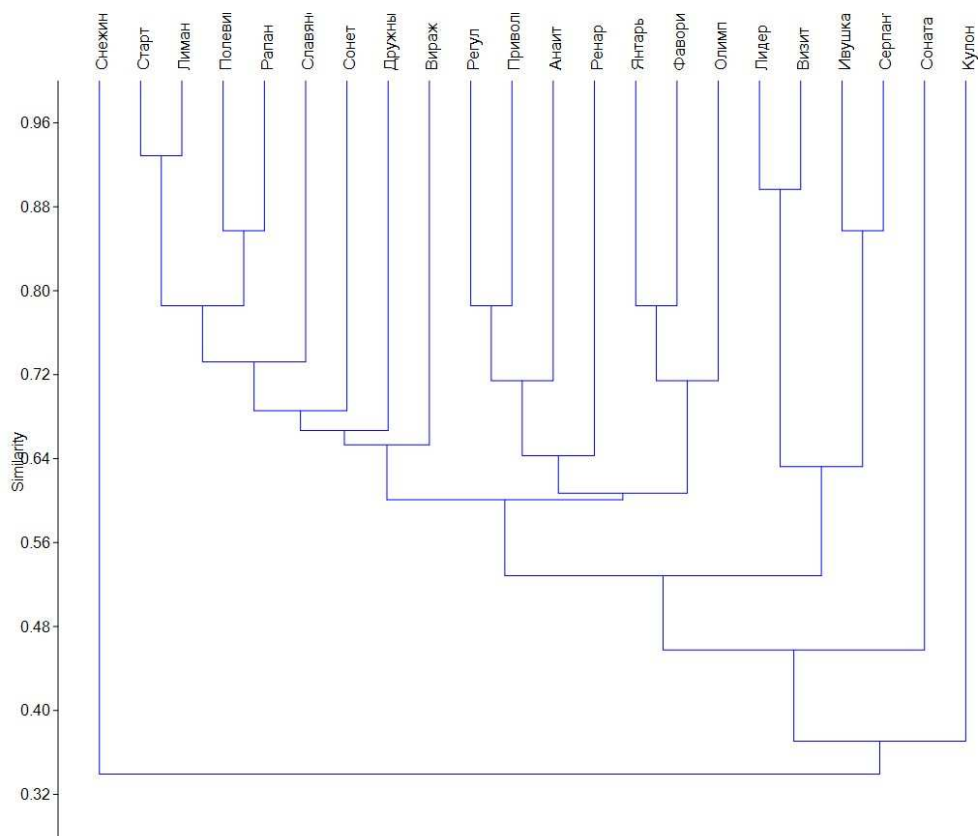


Рисунок 2 UPGMA кластеризация изученных сортов риса

В целом, результаты кластеризации отразили гетерогенность изученной выборки сортов, в которую вошли сорта с разным морфотипом, длиной вегетационного периода, а также длиной зерновки. Примечательно, что длиннозерный сорт Снежинка, выделен в отдельную ветвь кластера на уровне с минимальным показателем генетического сходства с изученными сортами. Это может быть связано со значительным уровнем присутствия в его ДНК-профиле аллелей, специфичных для подвида *indica*.

Таким образом, в результате выполненной работы было выполнено SSR-генотипирование 22 современных сортов риса российской селекции,

для всех изученных сортов получены уникальные ДНК-фингерпринты и выполнена оценка уровня полиморфизма использованных в работе SSR-маркеров. В дальнейшем нами планируется расширение выборки используемых SSR-маркеров и проведение масштабного анализа генетического разнообразия отечественных генетических коллекций риса что позволит изучить их генетическую структуру и получить ДНК-паспорта сортов.

Литература

1. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве / Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология, 1997.- №5.- С.3-19.
2. Wu K.S. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice/ K.S. Wu, S.D. Tanksley // Mol. Gen. Genet., 1993.-V.241.- P. 225-235.
3. Akagi H. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes / H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura // Theor. Appl. Genet., 1996.- V. 93.- P. 1071-1077.
4. McCouch S.R. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding / S.R. McCouch, X. Chen, O. Panaud., et al. // Plant Mol. Biol., 1997. - V.35.- P. 89-99.
5. McCouch S.R. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications/ S.R. McCouch, S. Temnykh, A. Lukashova, et al. // Rice genetic 4. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium.- Los Banos., 2001.- P. 117-135.
6. Weiguo Z., Jong-Wook C., Kyung-Ho Ma et al. Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars from Korea, China and Japan using SSR Markers/ Z.Weiguo, C. Jong-Wook, Kyung-Ho Ma. et al // Genes and Genomics, 2009.- V. 31.- № 4.- P. 283-292.
7. Choudhary G, Ranjitkumar N, Surapaneni M, Deborah DA, Vipparla A, et al. (2013) Molecular Genetic Diversity of Major Indian Rice Cultivars over Decadal Periods. PLoS ONE 8(6): e66197. doi:10.1371/journal.pone.0066197.
8. L.-Z.Gao. Comparisons of microsatellite variability and population genetic structure of two endangered wild rice species, *Oryza rufipogon* and *O. officinalis*, and their conservation implications/ L.-Z.Gao, C.-H. Zhang // Biodiversity and Conservation, 2005.- V. 14. – P. 1663–1679.
9. Michael J. Thomson. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers/Michael J. Thomson, Endang M. Septiningsih, Fatimah Suwardjo. et al. // Theor Appl Genet, 2007.- V. 114. P. 559–568.
10. Basabdatta Das. Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India/ Basabdatta Das, Samik Sengupta, Swarup K. Parida //BMC Genetics, 2013. V. 14. P. 71.
11. Шибата Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // Молекулярная клиническая диагностика.- М.: Мир, 1999.- С. 395-427.
12. Супрун И.И. Апробация мультиплексного SSR-анализа для ДНК-паспортизации сортов риса / И.И. Супрун, В.С. Ковалев // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета

(Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2015. – №10(114). С. 1417 – 1427.– Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/10/pdf/103.pdf>.

13. Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

References

1. Khavkin E.E. *Molekularnye marker v rastenievodstve* / E.E. Havkin // *sel'skochozyaistvennaya biologiya*, 1997.- №5.- S.3-19.

2. Wu K.S. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice/ K.S. Wu, S.D. Tanksley // *Mol. Gen. Genet.*, 1993.-V.241.- P. 225-235.

3. Akagi H. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes / H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura // *Theor. Appl. Genet.*, 1996.- V. 93.- P. 1071-1077.

4. McCouch S.R. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding / S.R. McCouch, X. Chen, O. Panaud., et al. // *Plant Mol. Biol.*, 1997. - V.35.- P. 89-99.

5. McCouch S.R. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications/ S.R. McCouch, S. Temnykh, A. Lukashova, et al. // *Rice genetic 4. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium.*- Los Banos., 2001.- P. 117-135.

6. Weiguo Z., Jong-Wook C., Kyung-Ho Ma et al. Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars from Korea, China and Japan using SSR Markers/ Z.Weiguo, C. Jong-Wook, Kyung-Ho Ma. et al // *Genes and Genomics*, 2009.- V. 31.- № 4.- P. 283-292.

7. Choudhary G, Ranjitkumar N, Surapaneni M, Deborah DA, Vipparla A, et al. (2013) Molecular Genetic Diversity of Major Indian Rice Cultivars over Decadal Periods. *PLoS ONE* 8(6): e66197. doi:10.1371/journal.pone.0066197.

8. L.-Z.Gao. Comparisons of microsatellite variability and population genetic structure of two endangered wild rice species, *Oryza rufipogon* and *O. officinalis*, and their conservation implications/ L.-Z.Gao, C.-H. Zhang // *Biodiversity and Conservation*, 2005.- V. 14. – P. 1663–1679.

9. Michael J. Thomson. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers/Michael J. Thomson, Endang M. Septiningsih, Fatimah Suwardjo. et al. // *Theor Appl Genet*, 2007.- V. 114. P. 559–568.

10. Basabdatta Das. Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India/ Basabdatta Das, Samik Sengupta, Swarup K. Parida // *BMC Genetics*, 2013. V. 14. P. 71.

11 Shibata D.K. *Polimeraznaya tsepnaya reaktsiya i molekularno-geneticheskiy analiz bioptatov* // *molekularnaya klinicheskaya diagnostika.*-M.: Mir, 1999.- P. 395-427.

12. Suprun I.I. Aprobatsiya multiplexnogo SSR-analiza dlya DNA-pasportizatsii sortov risa / I.I. Suprun, V.S. Kovalyov// *Polytemeticheskiy setevoj elektronniy zhurnal Kubanskogo gosudrsvennogo agrarnogo universiteta (Nauchiy zhurnal KubGAU)*–Krasnodar: KubGAU, 2015. – №10(114). С. 1417 – 1427.– Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2015/10/pdf/103.pdf>.

13. Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.