

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕГІОНІВ МІТОХОНДРІОНУ, АСОЦІЙОВАНИХ З ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЮ ЧОЛОВІЧОЮ СТЕРИЛЬНІСТЮ, У КУКУРУДЗИ



Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм 86 ліній кукурудзи світової та української селекції з S-, C- та T-типами цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) та нормальним мітохондріоном дикого типу за допомогою ПЛР-аналізу регіонів мітохондріону. Система молекулярних маркерів дозволила детектувати та ідентифікувати певний тип ЦЧС у ліній кукурудзи, а також диференціювати лінії з певним типом ЦЧС як від ліній з іншим типом ЦЧС, так і від ліній з нормальною цитоплазмою дикого типу.

Вступ. Досягнення молекулярної генетики у дослідженні зв'язку особливостей структури геному з певними агрономічними ознаками зробили вагомий внесок у розвиток рослинництва. Розробка і впровадження системи молекулярних маркерів, що генеруються в процесі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), надало широкі можливості для аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму ДНК. Яскравим прикладом впливу досягнень молекулярної генетики на селекційний процес є впровадження добору за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection).

Цитоплазматична чоловіча стерильність – ознака, що контролюється генами мітохондріону і генами, локалізованими в хромосомах ядра. ЦЧС вперше знайдена саме у кукурудзи [1–3], однак зустрічається у багатьох інших важливих сільськогосподарських культур, наприклад, у рису [4], перцю [5], соняшника [6], цукрового буряку [7], бавовнику [8]. Взагалі ж феномен ЦЧС, тобто неспроможності рослини продукувати фертильний пилок, описано у понад 150 видів рослин [9].

Для кукурудзи відомо декілька типів ЦЧС, пов'язаних з різними регіонами мітохондріону і генами – відновниками фертильності *Rf* [10]. Найбільш розповсюдженими є T-тип ЦЧС (так званий техаський), C-тип (парагвайський, або чарруа) та S-тип (молдавський, в літературі, що видається на території колишнього СРСР, більш відомий як M-тип).

Гени відновлення фертильності *Rf* для різних типів ЦЧС такі: для T-типу *Rf1* (хромосома 3), *Rf2* (хромосома 9); для M-типу *Rf3* (хромосома 2); для C-типу *Rf4*, *Rf5*, *Rf6*. Домінантні алелі генів *Rf1-Rf3* в природних популяціях зустрічаються значно рідше, ніж рецесивні. Абсолютна більшість ліній і зразків містять рецесивні алелі *rf*. Концентрація доміантних алелів *Rf* вище у форм, що мають загальне походження з джерелом стерильності.

Відновлення фертильності відбувається лише за умови наявності доміантних алелів генів – відновників фертильності в клітині з певним типом стерильної цитоплазми.

ЦЧС широко використовується в насінництві кукурудзи, тому біотехнологічні підходи, а саме дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму регіонів мітохондріону, асоційованих з ЦЧС, і генів – відновників фертильності кукурудзи та розробка ДНК-технології

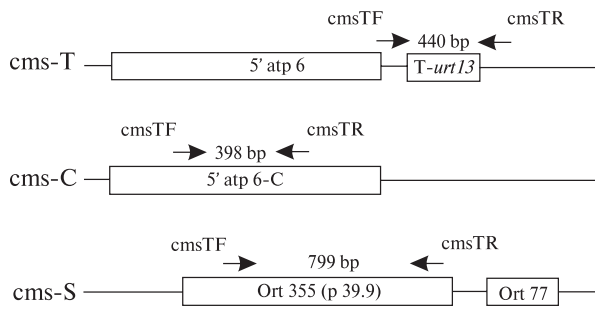


Рис. 1. Розташування праймерів на мітохондріоні кукурудзи [12]. Стрілками позначено сайти зв'язування праймерів

добору стерильних генотипів набуває підвищеного значення. ДНК-технологія визначення типовості ліній і гібридів, а також детекції та ідентифікації типу ЦЧС і алельного складу генів – відновників фертильності має важливу перевагу перед традиційним ґрунтовим контролем.

Мета нашої роботи полягала в дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму регіонів мітохондріону, асоційованих з ЦЧС, у кукурудзи.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на 86 фертильних лініях кукурудзи, стерильних аналогах, закріплювачах та лініях відновлювачах фертильності селекції Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (Одеса), Інституту зернового господарства (Дніпропетровськ) та світової селекції, отриманих з Maize Genetics Cooperation – Stock Center (США).

Тотальну ДНК екстрагували з семидобових паростків за методикою, наведеною в [11]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в 500 мкл мікропробірках на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Реакційна суміш містила буфер (50 мМ КСl; 20 мМ Трис-НСl рН 8,4; 2 мМ MgCl₂; 0,01 % Твін-20), по 200 мкМ кожного дНТФ; 250 пМ праймера; 30 нг ДНК; 1 од. Таq-полімерази. Нашаровували 20 мкл мінеральної олії поверх реакційної суміші.

Температурний та часовий режим для проведення ПЛР такий: перша денатурація 96 °С 2 хв; 30 циклів: денатурація 94 °С 1 хв; відпалювання праймерів 55 °С 30 с; елонгація 72 °С 1 хв; заключна елонгація 72 °С 2 хв.

Використали три пари праймерів до мікросателітних локусів *phi065*, *umc1172* та *umc1203* для перевірки генетичної чистоти ліній та три пари STS-праймерів cms-S, cms-C та cms-T (таблиця) для ПЛР-аналізу регіонів, що асоційовані з ЦЧС [12, 13].

Розподіл STS-ампліконів проводили методом електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі у ТВЕ-буфері (0,089 М Трис-НСl рН 8,0; 0,089 М борна кислота; 0,002 М Na₃ ЕДТА) за постійної напруженості електричного поля 2,5 В/см та кімнатної температури впродовж 2–3 год у апараті для горизонтального гелі-електрофорезу («Req-lab Biotechnologie GmbH», Німеччина). Агарозний гель фарбували у ТВЕ-буфері з 5 мкг/мл етидіум броміду протягом 15 хв. SSR-амплікони розподіляли методом денатуруючого електрофорезу в 10%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) в ТВЕ-буфері за постійної напруженості електричного поля 25 В/см та температури 60 °С 3–4 год у апараті для вертикального гелі-електрофорезу VE3 («Геликон», РФ). ПААГ фарбували з використанням нітрату срібла.

Відеозображення електрофореграм розподілу продуктів ампліфікації та оцінку довжини ампліконів отримували за допомогою системи документації і аналізу гелів «Image Master VDS» («AmershamPharmacia Biotech», ОКВ) згідно з інструкцією користувача.

Результати досліджень та їх обговорення. *Перевірка генетичної чистоти ліній.* Перевірка генетичної чистоти рослинного матеріалу є необхідним етапом будь-якого молекулярно-генетичного дослідження. Тестування ліній на генетичну чистоту проводили за допомогою ПЛР з парами праймерів до мікросателітних локусів

Праймери, що використано в дослідженні мітохондріону кукурудзи

Праймер	Послідовність праймерів (3'-5')	Довжина фрагмента ампліфікації, п.н.
cms-S F	caacttattacgagcgctgatgc	799
cms-S R	agttctcccataaccctgac	
cms-C F	atgctaattggtgtccgattcc	398
cms-C R	agcatcatccacattcgctag	
cms-T F	catgaaatgggtgaagtctcttc	440
cms-T R	aagagaaagggagactttgtccc	

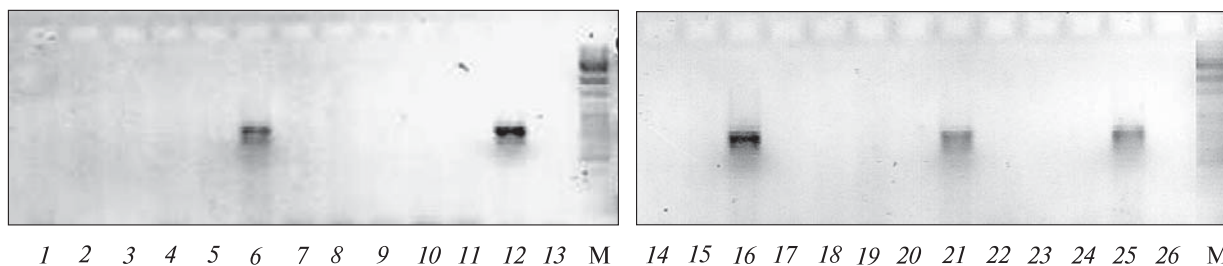


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу sms-S у лінії кукурудзи W8 (1), W8Т (2), W8М (3), W8Б (4), W8С (5), W8МВ (6), W8ТВБ (7), W8БТВ (8), W8БВ (9), P502 (10), P502Т (11), P502М (12), P502С (13), P502ТВ (14), P502МВ (15), P502БВ (16), P502ТВБ (17), P502БТВ (18), СК32 (19), СК32Т (20), СК32М (21), СК32Б (22), СК32С (23), СК32ТВ (24), СК32БВ (25). М – маркер молекулярної маси GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus

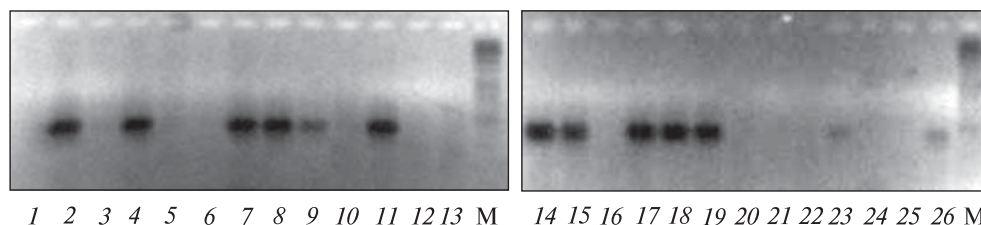


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу sms-T у лінії кукурудзи (нумерація ліній як на рис. 2)

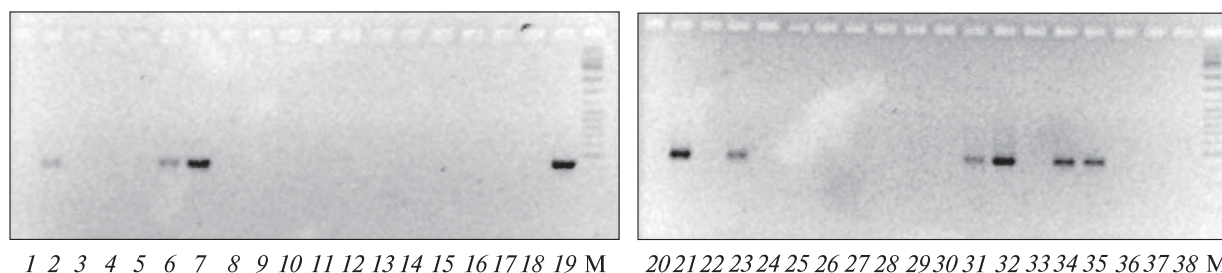


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу sms-T у лінії кукурудзи C736A (1), C736AB (2), C736B (3), C736BA (4), C736C (5), C736CA (6), C736CB (7), C736E (8), C736EA (9), C736F (10), C736FA (11), C736G (12), C736H (13), CX36A (14), CX36B (15), CX36C (16), CX36D (17), CX36E (18), C836A (19), C836B (20), C836C (21), C836D (22), C836E (23), C836F (24), C836H (25), C836G (26), C936D (27), C936DA (28), C936F (29), C936FA (30), C936H (31), C936G (32), C936I (33), C936J (34), C936K (35), C936M (36), C229A (37), C229C (38). М – маркер молекулярної маси GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus

phi065, *umc1172* та *umc1203*, що обрано як найбільш високополіморфні за результатами попередніх досліджень [14]. Для всіх ліній зазначено гомозиготний стан досліджених локусів та ідентичність спектрів ампліфікації, що дозволило перейти до наступного етапу.

ПЛР-аналіз ліній з різними типами ЦЧС. Проведено ПЛР-аналіз ліній з S-, C- і T-типами ЦЧС та ліній з нормальним мітохондріоном дикого типу при використанні пар STS-праймерів: 1) sms-S, що фланкують хімерну відкри-

ту рамку зчитування *Orf355*, яка спостерігається в мітохондріоні ліній кукурудзи лише з S-типом ЦЧС; 2) sms-C, що є специфічними до *atp6/atp9*-регіону мітохондріону ліній кукурудзи з C-типом ЦЧС; 3) sms-T, що фланкують хімерний ген *T-urf*, продукт експресії якого викликає розвиток ЦЧС T-типу. На рис. 1 наведено схему розташування праймерів відносно локусів на мітохондріоні.

ПЛР-аналіз ДНК ліній з ЦЧС молдавського типу. При ПЛР-аналізі ліній кукурудзи за локу-

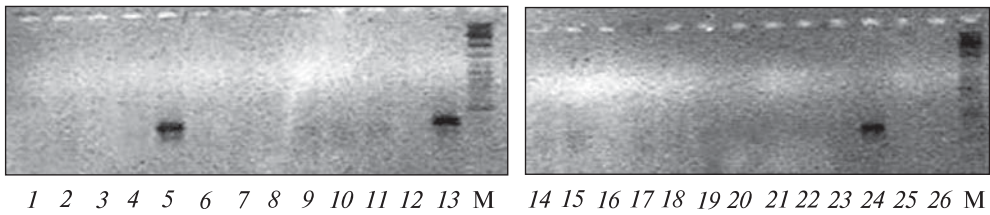


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *cms-C* у ліній кукурудзи (нумерація ліній як на рис. 2)

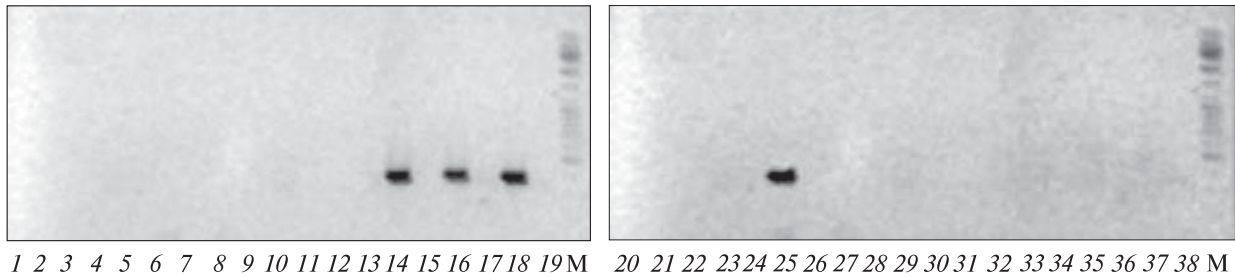


Рис. 6. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *cms-C* у ліній кукурудзи (нумерація ліній як на рис. 4)

сом, що асоційований з ЦЧС молдавського типу, за допомогою пари праймерів *cms-S* детектовано фрагмент ампліфікації довжиною 799 п.н. Даний амплікон характерний лише для ліній кукурудзи з цитоплазмою S-типу (рис. 2 та 3) і не генерувався у реакційних сумішах з використанням тотальної ДНК як ліній з нормальною цитоплазмою, так і ліній кукурудзи з T- та C-типом.

ПЛР-аналіз ДНК ліній з ЦЧС техаського типу. При ПЛР-аналізі ліній з цитоплазмою T-типу з використанням пари праймерів *cms-T* отримано амплікон довжиною 440 п.н. (рис. 3 та 4). При ПЛР-аналізі ДНК ліній з іншими типами цитоплазми даний продукт не ампліфікується.

ПЛР-аналіз ДНК ліній з ЦЧС парагвайського типу. При ПЛР-аналізі ліній кукурудзи за локусом, асоційованим з ЦЧС C-типу, з використанням пари праймерів *cms-C* отримано амплікон довжиною 398 п.н. (рис. 5 та 6). При ПЛР-аналізі ДНК ліній з іншими типами цитоплазми даний продукт не ампліфікується.

ПЛР-аналіз ДНК ліній з нормальною цитоплазмою. При ПЛР-аналізі ДНК ліній з нормальною цитоплазмою жоден з наведених продуктів не ампліфікується (рис. 2 та 6). Дане явище пов'язано з тим, що в мітохондріоні ліній кукурудзи з нормальною цитоплазмою дикого

типу не має послідовностей, специфічних для використаних праймерів.

Таким чином, ПЛР-аналіз з добрими параметрами STS-праймерів дозволив детектувати та ідентифікувати певний тип ЦЧС у ліній кукурудзи, диференціювати лінії кукурудзи з певним типом ЦЧС як від ліній з іншим типом ЦЧС, так і від ліній з нормальною цитоплазмою дикого типу, тобто використані пари STS-праймерів специфічні саме до регіонів мітохондріону, що асоційовані з розвитком ЦЧС певного типу і не продукують неспецифічних фрагментів ампліфікації при проведенні ПЛР з неспецифічною матричною ДНК (тобто ДНК ліній кукурудзи з нормальною цитоплазмою та цитоплазмою, що належить до інших типів ЦЧС).

Дані молекулярні маркери можливо використовувати для тестування ліній кукурудзи з певним типом стерильної цитоплазми та з нормальною цитоплазмою для підвищення ефективності селекційного процесу на ранніх етапах добору вихідного матеріалу.

Висновки. Проведено генотипування ліній кукурудзи, що відрізняються за регіонами мітохондріону, асоційованими з певним типом ЦЧС, та алельним складом генів – відновників фертильності. За даними ПЛР-аналізу мітохондріальних регіонів, пов'язаних з ЦЧС,

амплікони очікуваного розміру зазначено у ліній кукурудзи з певним типом стерильної цитоплазми. При ПЛР-аналізі ліній з нормальним мітохондріоном дикого типу жоден з продуктів не ампліфікується. За допомогою ПЛР-аналізу з використанням трьох пар STS-праймерів, специфічних до певних нуклеотидних послідовностей мітохондріону кукурудзи, досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм ДНК у виборці 86 ліній кукурудзи світової та української селекції з різними типами ЦЧС.

G.I. Slischuk, N.E. Kozhukhova, Yu.M. Sivolap

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS
OF MAIZE MITOCHONDRION REGIONS
ASSOCIATED WITH CMS

Molecular-genetic polymorphism of 86 world and Ukrainian breeding maize lines with S-, C- and T-types of cytoplasmic male sterility (CMS) and with normal wild type mitochondrion has been researched via mitochondrion regions PCR-analysis. Molecular marker system allowed to detect and identify definite type of CMS within maize lines, as well as to differentiate lines with definite CMS type either from lines with another CMS type or from normal wild type cytoplasm lines.

Г.И. Слищук, Н.Э. Кожухова, Ю.М. Сиволап

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
РЕГИОНОВ МИТОХОНДРИОНА,
АССОЦИИРОВАННЫХ
С ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ
СТЕРИЛЬНОСТЬЮ, У КУКУРУЗЫ

Исследован молекулярно-генетический полиморфизм 86 линий кукурузы мировой и украинской селекции с S-, C- и T-типами цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и нормальным митохондрионом дикого типа с помощью ПЦР-анализа регионов митохондриона. Система молекулярных маркеров позволила детектировать и идентифицировать определенный тип ЦМС у линий кукурузы, а также дифференцировать линии с определенным типом ЦМС как от линий с другим типом ЦМС, так и от линий с нормальной цитоплазмой дикого типа.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rhoades M.M. The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays* // J. Genet. — 1933. — 27. — P. 71–93.

2. Peterson P.A., Bianchi A. Maize genetics and breeding in the 20th century. — Singapore : World Sci. Publ., 1999. — P. 133–141.
3. Peterson P.A., Peterson S.R., Marcus M. Rhoades // Theor. and Appl. Genet. — 1973. — 43, № 3/4. — P. 93–96.
4. Huang J., Hu J., Xu X., Li S., Yang D., Ren F., Liu X., Zhu Y. Fine mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice // Bot. Bull. Acad. Sin. — 2003. — 44. — P. 285–289.
5. Lee J., Yoon J.B., Park H.B. Linkage analysis between the partial restoration (pr) and the restorer-of-fertility (Rf) loci in pepper cytoplasmic male sterility // Theor. and Appl. Genet. — 2008. — 117, № 3. — P. 383–389.
6. Chen J., Hu J., Vick B.A., Jan C.C. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers // Theor. and Appl. Genet. — 2006. — 113, № 1. — P. 122–127.
7. Ivanov M.K., Revenko A.S., Dymshits G.M. Cytoplasmic male sterility-associated structural variation of the mitochondrial genome regions containing rps3 and orf215 in sugar beet *Beta vulgaris* L. // Mol. Biol. — 2003. — 4. — P. 345.
8. Feng C.-D., Steward J. Mc.D., Zhang J.-F. STS markers linked to the Rf1 fertility restorer gene in cotton // Theor. and Appl. Genet. — 2005. — 110, № 2. — P. 237–243.
9. Schnable P.S., Wise R.P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration // Trends Plant Sci. — 1998. — 3. — P. 175–180.
10. Allen J.O., Fauron C.M., Minx P., Roark L., Oddiraju S. et al. Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize // Genetics. — 2007. — 177. — P. 1173–1192.
11. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н. Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. — 1995. — 31, № 10. — С. 1358–1364.
12. Liu Z., Peter S.O., Long M., Weingartner U., Stamp P., Kaeser O. A PCR Assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize // Crop Sci. — 2002. — 42. — P. 566–569.
13. Ignatovic-Micic D., Nikolic A., Mladenovic S. Identification of sterile cytoplasm in maize // Genetika. — 2006. — 383, № 3. — P. 227–233.
14. Єфименко В.Г., Кожухова Н.Е., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетична характеристика генотипів кукурудзи за складом мікросателітних локусів // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — 4, № 1. — С. 21–30.

Поступила 16.03.10