УДК 575.224.4.633

RAPD-АНАЛИЗ ГЕНОТИПОВ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ГОРЧИЦЫ (BRASSICA JUNCEA L.)[1]

Маркин Н. В.[2], Усатов А. В.[3], Федоренко Г. М.[4]

RAPD-ANALYSIS OF SALT-RESISTING VARIETIES GENOTYPES IN MUSTARD (BRASSICA JUNCEA L.)

Markin N. V., Usatov A. V., Fedorenko G. M.

The genotypes of two salt-resistant SR2 and SR3 varieties in mustard were researched by a method of RAPD analysis. The specific molecular markers and genetic polymorphism of salt-resistant varieties and sort plants are determined. The obtained individual RAPD-spectrums of salt-resisting varieties can be used for the subsequent selection of Brassica juncea mustard.

Засоление пахотных земель является одной из главных экологических проблем сельского хозяйства. Поэтому все более актуальными становятся исследования физиологических, биохимических и молекулярных механизмов устойчивости растений к повышенному содержанию солей в почве, а также создание галорезистентных генотипов сельскохозяйственных культур [1, 2]. В условиях солевого стресса в онтогенезе растительного организма происходит сложный комплекс адаптационных перестроек [3]. Эти изменения направлены на восстановление водного обмена, защиту функций клеточных органелл и поддержание ионного гомеостаза в клетках [4–6]. Широкий диапазон адаптаций у растений к повышенным концентрациям солей в почве от морфологических до биохимических свидетельствует, что солеустойчивость — это комплексный признак, детерминированный как ядерными генами, так и генетическими детерминантами клеточных органелл — пластидами и митохондриями. Однако комплексность и полигенный характер солеустойчивости затрудняют получение и исследование галорезистентных сортов [7].

Ранее было показано, что на генетической основе растений сорта Донская-5, культивируемых в Ростовской области, с помощью нитрозометилмочевины (НММ) получены две солеустойчивые формы горчицы SR_2 и SR_3 [8, 9]. В условиях вегетационного опыта при искусственном хлоридном засолении эти формы, по сравнению с исходными сортовыми растениями, показали высокую продуктивность, при незначительных структурно-функциональных изменениях хлоропластов [9]. Однако в естественных условиях культивирования, растения линий SR_2 и SR_3 морфологически не отличаются от сортовых, что затрудняет их идентификацию. В связи с этим целью данной работы явилось выявление на уровне генома различий между сортом Донская-5 горчицы сарептской Brassica juncea L. и полученными на его генетической основе солеустойчивыми формами SR_2 и SR_3, а также определение специфических молекулярных маркеров и генетического полиморфизма исследуемых линий и сорта, используя метод RAPD-анализа.

1. Материал и методика

Объектом исследования служили растения горчицы сарептской Brassica juncea L. сорта Донская-5, а также солерезистентные формы

[1]Работа выполнена при поддержке РФФИ р_юг (06-04-96754).

[2]Маркин Николай Викторович, канд. биол. наук, ассистент кафедры генетики биолого-почвенного факультета Ростовского государственного университета.

[3]Усатов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики НИИ биологии Ростовского государственного университета.

[4]Федоренко Григорий Мефодьевич, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией ультраструктурного анализа НИИ нейрокибернетики Ростовского государственного университета, ведущий научный сотрудник ЮНЦ РАН.

SR_2 и SR_3, выделенные в M_2 после обработки семян сорта Донская-5 нитрозометилмочевиной (НММ), в концентрации 0,01 %. Отбор солерезистентных растений на провокационном фоне проводился согласно [10] и подробно описан ранее [8, 9].

Выделение ДНК. ДНК выделяли из зеленых листьев растений, используя метод, описанный в работе [11], с модификациями. Высечку листа, полученную при закрытии крышки пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл, интенсивно гомогенизировали с помощью тефлонового пестика в 300 мкл раствора, содержащего 10мМ трис-HCl, pH 8,0; 5,5 М гуанидинатиоционата, 10 мМ ЭДТА, 1 % Тритон X-100. Дополнительно гомогенат инкубировали в течение 45 мин при 65°C, периодически перемешивая на вортексе. Затем пробирки центрифугировали 12 тыс. об/мин в течение 5 мин в настольной центрифуге Hettich Micro 20 (Германия) при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирали в новые пробирки, добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента SiO_2 в 32 % HCl, pH 2,0, перемешивали смесь на вортексе и оставляли в штативе на 3 мин. Эту процедуру повторяли трижды. Затем сорбент осаждали центрифугированием 5 тыс. об/мин в течение 30 с, супернатант удаляли, а сорбент дважды промывали раствором, содержащим 50 % этанол, 50 мМ NaCl. После второй отмывки пробирки центрифугировали 10 тыс. об/мин, 30 с, максимально удаляли жидкость и с открытыми крышками помещали в термостат (65°C, 8–10 мин) для подсушивания сорбента. ДНК элюировали в 85 мкл ТЕ буфера (0,01 мМ трис-HCl pH 8,0; 0,001 мМ ЭДТА) при 65°C в течение 5–8 мин периодически перемешивая на вортексе. Сорбент осаждали центрифугированием 12 тыс. об/мин в течение 3 мин и полученный раствор ДНК использовали в полимеразной цепной реакции.

Амплификация ДНК. Для RAPD-анализа использовали 12 произвольных праймеров синтезированных ЗАО «Синтол» (г. Москва). Описание праймеров приведено в таблице.

Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 67 мМ трис-HCl pH 8,4, 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 мМ $MgSO_4$, 0,1 мМ меркаптоэтанола, 0,25 мМ каждого дНТФ (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ), 15 пмоль праймера, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 30 нг выделенной ДНК. Поверх реакционной смеси наслаивали 20 мкл минерального масла. ПЦР проводили в термоциклере Palm Cycler Corbett Research (Австралия) по следующей программе: 1 цикл — 94°C, 3 мин; 36°C, 30 с; 72°C, 30 с; 42 цикла — 94°C, 18 с; 36°C, 30 с; 72°C, 30 с; 1 цикл — 94°C, 18 с; 36°C, 30 с; 72°C, 10 мин.

Продукты реакции амплификации разделяли электрофоретически в 1,7 % агарозном геле с бромистым этидием (1 мкг/мл), используя трис-боратный буфер. Гели переносили на трансиллюминатор и фотодокументировали с помощью видеосистемы (Биоком, г. Москва). Размер амплифицированных фрагментов определяли путем сравнения их подвижности в геле с подвижностью фрагментов ДНК известного размера. ПЦР проводили не менее двух раз с этапа выделения ДНК для подтверждения воспроизводимости результатов.

Полиморфными считали фрагменты ДНК, встречающиеся не во всех RAPD-спектрах анализируемых линий. Уровень полиморфизма амплифицированных фрагментов генома определяли как отношение количества полиморфных фрагментов к общему количеству полученных фрагментов, выраженное в процентах.

2. Результаты и обсуждение

Для выявления полиморфизма и маркирования солеустойчивых линий горчицы сарептской (Brassica juncea L) SR_2, SR_3 и сорта Донская-5 методом RAPD-анализа использовали 12 произвольных праймеров (таблица). Все праймеры обеспечили синтез фрагментов исследуемых образцов ДНК (рис. 1).

На рис. 1, 2 представлены RAPD-профили горчицы сарептской сорта Донская-5 и солеустойчивых линий SR_2, SR_3. I — XII – праймеры, использованные для RAPD-анализа генотипов горчицы сарептской (таблица); 1 — RAPD-профили сорта Донская-5; 2 — RAPD-профили солеустойчивой линии SR_2; 3 — RAPD-профили солеустойчивой линии SR_3; M — маркер молекулярной массы.

Для линий SR_2, SR_3 и сорта Донская-5 получены индивидуальные RAPD-спектры, содержащие в зависимости от использованного праймера, от 8 до 25 амплифицированных фрагментов ДНК. Размер амплифицированных фрагментов составлял от 200 до 1 200 п.н. (рис. 1, 2).

Из 12 праймеров лишь по пяти праймерам линии SR_2, SR_3 и сорта Донская-5 отличались друг от друга количеством амплифицированных фрагментов и степенью их выраженности. Некоторые фрагменты были уни-

Праймеры, использованные для RAPD-анализа генотипов солеустойчивых линий горчицы SR_2, SR_3 и сорта Донская-5

Номер	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'- 3'
I	P36	CCGAATTCGC
II	P37	CTGACCAGCC
III	P38	GATACGTTGTC
IV	P46	GGTTGGGGAG
V	P53	GTCTAAGTCG
VI	OPT-08	AACGGCGACA
VII	OPW-04	CAGAAGCGGA
VIII	OPW-06	AGGCCCGATG
IX	OPW-09	GTGACCGAGT
X	OPW-10	TCGCATCCCT
XI	OPW-15	ACACCGGAAC
XII	OPX-01	CTGGGCACGA

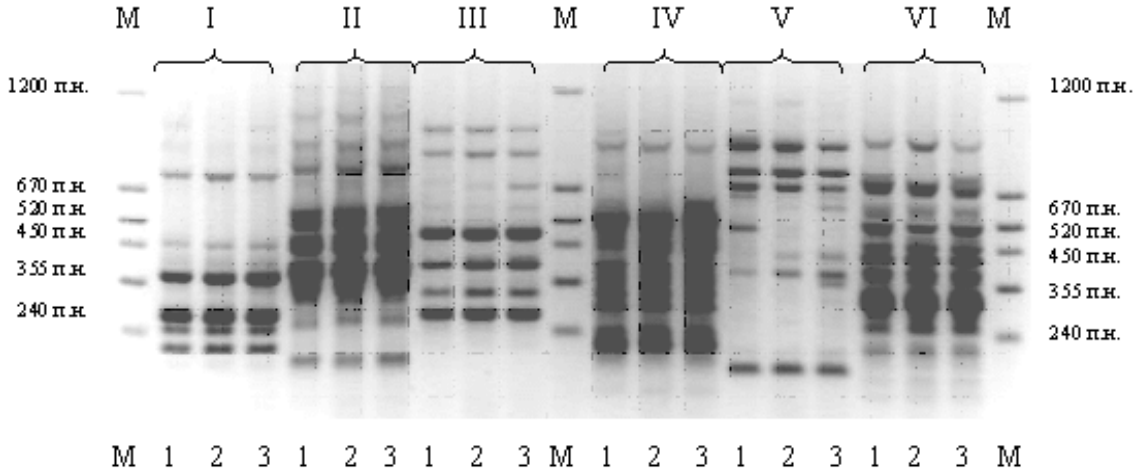

Рис. 1

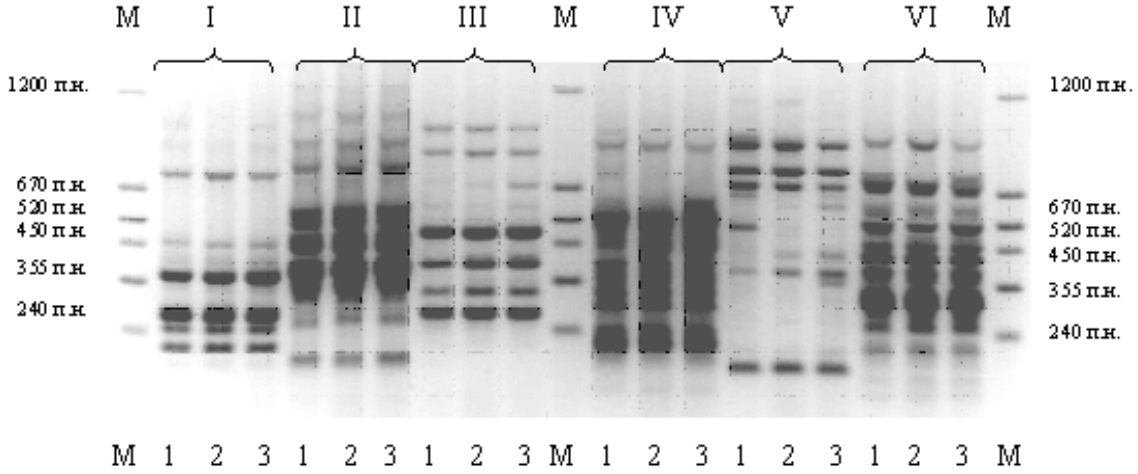

Рис. 2

кальными, т. е. выявлялись только в одном генотипе. Так, у линий SR_2 и SR_3 при амплификации с праймером ORW-04 выявлены фрагменты длиной 360 и 550 п.н., а после амплификации с праймером P53 — фрагменты длиной 450 и 355, 590 п.н., соответственно. RAPD-анализ геномной ДНК сорта Донская-5 с праймером P53 выявил фрагмент размером 520 п.н., не встречающийся у линий SR_2 и SR_3. Эти уникальные фрагменты удобно использовать для идентификации генотипов солеустойчивых линий SR_2, SR_3 и сорта, что может быть полезным для дальнейшей селекции этой культуры.

Выявленные электрофоретические зоны различались не только размером, но и количеством локусов, ограниченных используемым праймером. Этот феномен следует рассматривать в качестве дополнительного маркера исследуемых генотипов.

Всего при молекулярном анализе геномов исследуемых линий горчицы получено 210 RAPD-фрагмента, 11 из которых оказались полиморфными. Уровень полиморфизма между исследуемыми генотипами горчицы оказался незначительным. Это вызвано в первую очередь тем, что НММ в концентрации 0,01 % не индуцирует крупных поломок генетического материала у высших растений [12]. Наибольший уровень полиморфизма 5,3 % выявлен между линией SR_3 и сортом Донская-5. Аналогичный показатель для линии SR_2составил 3,4 %. В свою очередь степень отличия между линиями SR_2 и SR_3 составила 4 %. Это свидетельствует о том, что солеустойчивость у этих форм может определяться различными мутациями, индуцированными в геноме сортовых растений. Локализация и изучение этих мутационных изменений будут представлены в дальнейших исследованиях.

Таким образом, проведенное исследование генотипов солеустойчивых линий горчицы SR_2, SR_3 и сорта Донская-5 с помощью RAPD-анализа позволили установить между ними генетические различия. Полученные индивидуальные RAPD-спектры линий и сорта могут быть использованы для их паспортизации, а также при дальнейшей селекции горчицы.

Литература

1. *Bajaj S., Targolli J., Liu L. F., Ho T. H. D., Wu R.* Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants // Molecular Breeding. 1999. No. 5. P. 493–503.
2. *Wang W., Vinocur B., Altman A.* Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance // Planta. 2003. No. 218(1). P. 1–14.
3. *Parida A. K., Das A. B.* Salt tolerance and salinity effects on plants: a review // Ecotoxicol Environ Saf. 2005. No. 60(3). P. 324–349.
4. *Huo C. M., Zhao B. C., Ge R. C., Shen Y. Z., Huang Z. J.* Proteomic analysis of the salt tolerance mutant of wheat under salt stress // Yi Chuan Xue Bao. 2004. No. 31(12). P. 1408–1414.
5. *Trono D., Flagella Z., Laus M. N., Fonzo N. D. I., Pastore D.* The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings // Plant, Cell and Environment. 2004. No. 27(4). P. 437.
6. *Chen T. H. H., Murata N.* Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes // Current Opinion in Plant Biology. 2002. No. 5. P. 250–257.
7. *Flowers T. J.* Improving crop salt tolerance // J. of Exp. Botany. 2004. No. 55(396). P. 307–319.
8. *Федоренко Г. М., Усатов А. В., Щербакова Л. Б., Машкина Е. В.* Солеустойчивые формы горчицы Brassica junceae, индуцированные нитрозометилмочевиной // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. 2004. № 2. С. 14–21.
9. *Усатов А. В., Федоренко Г. М., Щербакова Л. Б., Машкина Е. В.* Ультраструктура хлоропластов горчицы Brassica junceae как показатель галорезистентности // Цитология. 2004. Т. 46. № 12. С. 1035–1042.
10. *Строганов Б. П.* Физиологические основы солеустойчивости растений при разнокачественном засолении. М., 1962. 366 с.
11. *Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-Van Dillen P. M. E., Van Der Noordaa J.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. 1990. V. 28. No. 3. P. 495–503.
12. *Белецкий Ю. Д.* Искусственные мутации хлоропластов у высших растений. Ростов н/Д: Изд-во РГУ, 1989. 80 с.

Статья поступила 25 ноября 2005 г.
Ростовский государственный университет, г. Ростов-на-Дону
Южный научный центр РАН
© Маркин Н. В., Усатов А. В., Федоренко Г. М., 2006