

В. И. Г Л А З К О, А. В. Д У Б И Н, Р. Н. К А Л Е Н Д А Р Ь, Г. В. Г Л А З К О,
В. И. Ш Е Р Е П И Т К О, А. А. С О З И Н О В

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СОРТАМИ СОИ, ОЦЕНЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR МАРКЕРОВ

*Генетические взаимоотношения между сортами domesticiрованной (*G. max*) и дикой сои (*G. soja*) оценены с использованием в качестве одного праймера трех ди- и двух тринуклеотидных микросателлитных повторов (ISSR — Inter-Simple Sequence Repeat). Спектр ампликонов наиболее полно выявляется у дикого вида, каждый сорт представлен сорт-специфической частью спектра дикой сои. Информативность (полиморфизм спектра ампликонов) варьировала между ди- и тринуклеотидными праймерами. Обсуждается возможная зависимость полиморфизма ISSR маркеров от локализации сайтов гомологии к микросателлитным локусам в транскрируемых/нетранскрируемых последовательностях нуклеотидов.*

Введение. Идентификация и контроль генетической изменчивости являются обязательными условиями успешного сохранения и использования различных сортов сельскохозяйственных видов растений. В этих целях используются различные методы, в частности, полиморфизм структурных генов по изменчивости электрического заряда их продуктов — белков, а также по сайтам рестрикции фрагментов ДНК (RFLP - restriction fragment length polymorphism). Однако белковый полиморфизм, как правило, ограничен, а рестриктный анализ трудоемок, нуждается в использовании радиоизотопов и у отдельных видов растений характеризуется низким уровнем полиморфизма. Так, исследования RFLP у domesticiрованной (*G. max*) и дикой (*G. soja*) сои показали, что оба этих вида характеризуются низким уровнем изменчивости ДНК [1]. Следует отметить, что в связи с очевидными взаимоотношениями по типу предок-потомок две эти группы растений некоторые исследователи относят к одному виду [2]. Высокий уровень полиморфизма у сои удалось выявить только по микросателлитным локусам [3]. В последние несколько лет широко используется новое поколение маркеров полиморфизма ДНК — RAPD-PCR [4, 5, 6]. Это принципиально новый класс генетических маркеров (RAPD, *Random Amplified Polymorphism DNA markers*). Метод основан на использовании в качестве пары праймеров для полимеразной цепной реакции (PCR) одной и той же последовательности в 10 нуклеотидов, т. е. амплифицируются последовательности, заключенные между инвертированными повторами этого декануклеотида. Оказалось, что некоторые декануклеотиды позволяют получать высокополиморфные спектры ампликонов [4]. К недостаткам метода относятся доминантные/рецессивные взаимоотношения между аллельными вариантами ампликона (присутствие ампликона определенной длины может представлять и гомо-, и гетерозиготное состояние локуса), «анонимность» амплифицируемых последовательностей в отношении их локализации и функции, сложности воспроизводства спектра ампликонов в связи с большим количеством ошибок отжига из-за его относительно низкой температуры.

Одной из попыток увеличения точности отжига и воспроизводства высокополиморфных спектров ампликонов является использование в качестве пары праймеров последовательностей микросателлитных локусов. Такой подход увеличивает точность отжига, воспроизводимость амплифицированных фрагментов и уменьшает «анонимность» амплифицируемых участков, поскольку о них, по крайней мере, известно, что это относительно короткие фрагменты ДНК, заключенные между инверти-

© В. И. Г Л А З К О, А. В. Д У Б И Н, Р. Н. К А Л Е Н Д А Р Ь, Г. В. Г Л А З К О, В. И. Ш Е Р Е П И Т К О,
А. А. С О З И Н О В, 1999

рованным повтором микросателлитного локуса. Получаемый спектр ампликонов имеет определенные ограничения, связанные с условиями амплификации, так, в частности, недоступными для анализа являются фрагменты слишком большой длины (больше 2,5-3 т.п.о.). Суть метода заключается в использовании микросателлитных локусов как участков отжига праймеров и амплификации участков, находящихся между их инвертированным повтором. Праймеры состоят из повторяющейся последовательности, например, (CA)_n и «якорного» участка на 5' или 3' конце (CA)₉G или (CA)₈C, который определяет место отжига праймера [7].

В задачи настоящей работы входил сравнительный анализ спектра ампликонов (генетического полиморфизма) при использовании праймеров к различным ди- и тринуклеотидным микросателлитным повторам у ряда культурных сортов сои (*G. max*) и представителей дикого вида (*G. soja*), а также оценка генетических взаимоотношений между ними, основанная на полиморфизме получаемых спектров ампликонов.

Материалы и методы. Исследовали сорта домашней сои (*G. max*) различных стран и три популяции дикой сои (*G. soja*). Популяции дикого вида обозначены как ДУ 9, ДУ 5 и ДУ БАР; Добруджанка 18, Негруца - наиболее древние сорта среди исследованных. Сорта Амурская 41, Памир - дальневосточного региона; Ватра, Подольская 416, Подольянка, Киевская 451, Нива, Искра, Зарница, Черновицкая 8, Юг 30, Витязь 50 - внесены в Реестр сортов Украины; Кишиневская 16 - молдавский сорт, Грибская 30 - российский сорт; ISZ 7, Д.Чех - венгерский и чехословацкий сорта.

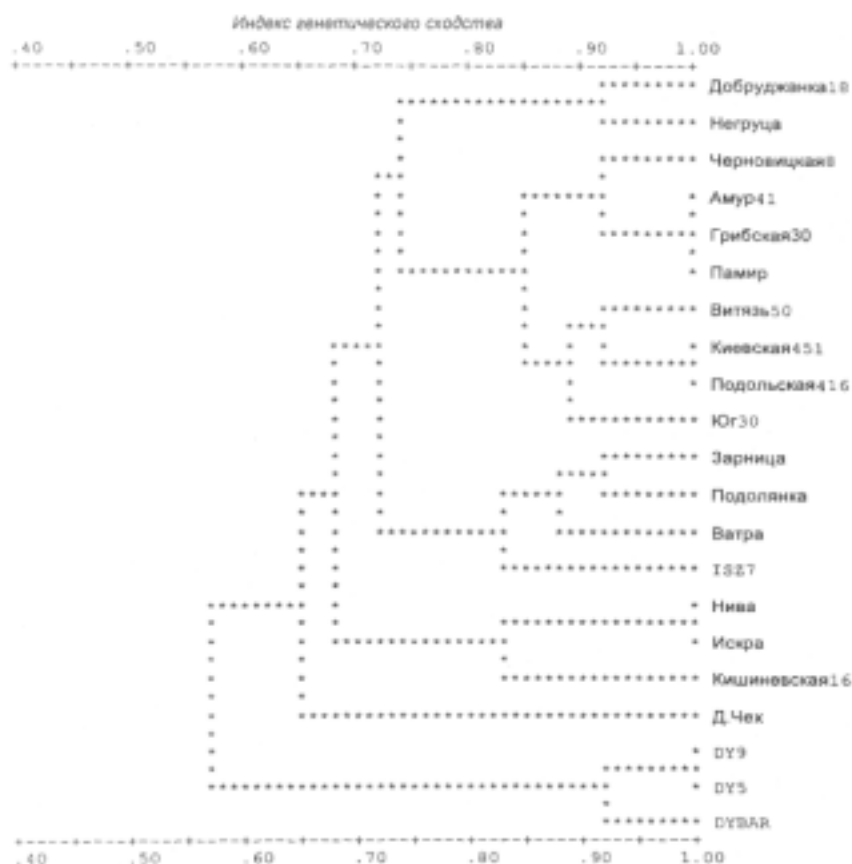
ДНК выделяли из этиолированных проростков в возрасте 3-4 дней СТАВ методом [8]. Концентрацию ДНК определяли электрофорезом в агарозном геле относительно контроля после окрашивания бромистым этидием. В работе использовали следующие праймеры: P1 (CT)₉G, P2 (CA)₁₀G, P3 (GA)₉C, P4 (CAC)₇T, P5 GT(CAC)₇.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 50 mM KCl, 10 mM трис-HCl (pH 9,0), 0,01 % Triton X100, 0,3 mM каждого dNTP, 2 mM MgCl₂ («Promega»), 0,4 мкм праймера, 1 ед. Taq-полимеразы, 20-50 нг ДНК.

Амплификацию проводили на амплификаторе "MasterCycler Gradient" (Eppendorf) в следующем температурном режиме: начальная денатурация 2 мин при 94 °C; 30 циклов: 30 с при 94 °C, 30 с при 53-57 °C (в зависимости от праймера), 2 мин при 72 °C; 10 мин терминальная элонгация. Продукты амплификации (7 мкл реакционной смеси) разделяли в 2 % агарозном геле в 1хTBE буфере при 70 В в течение 5 ч.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате выполненных работ были получены следующие данные. Электрофореграммы продуктов амплификации (ампликонов) позволяли идентифицировать от 5-16 полос использованного праймера. Учитывали зоны, воспроизводящиеся при разных условиях амплификации у одного и того же образца при повторном анализе (не менее чем в 3-4 повторностях). В общем, размер ампликонов, вошедших в анализ, варьировал в пределах 2 т.п.н. — 500 н. Каждый продукт амплификации рассматривали как отдельный локус, суммарно при использовании всех пяти праймеров идентифицировано 62 локуса, из них 20 оказались полиморфными (по их присутствию-отсутствию на фореграммах).

Спектры ампликонов существенно отличались друг от друга в связи с исследуемыми образцами и используемыми праймерами. Так, при использовании праймеров (CT)₉G, (CA)₁₀G, (GA)₉C в общем были получены 4, 14 и 12 полос на электрофореграммах соответственно с долей полиморфных локусов 0,75; 0,86 и 0,16. Спектры амплификации праймеров к тринуклеотидным микросателлитным локусам (CAC)₇T и



Дендрограмма генетических взаимоотношений между сортами доместицированной сои и популяциями дикой сои, построенная на основании индексов генетического сходства (M. Nei, 1972), рассчитанных по распределению генотипов по ISSR (праймер — (CA)₁₀G).

GT(CAC)₇ имели на электрофореграммах суммарно по 16 полос (для каждого праймера) с долей полиморфных локусов 0,1 и 0,07 соответственно. Спектр ампликонов трех популяций дикого вида отличался максимальным количеством зон суммарно по всем использованным праймерам. Сочетания ампликонов культурных и полукультурных сортов сои представляли определенную, сорт-специфичную часть спектра дикого вида. В исследованных сортах не выявлено ампликонов, отсутствующих у дикого вида. Продукты амплификации, полученные при использовании праймера (CA)₁₀G, оказались наиболее полиморфными среди исследованных вариантов спектров амплификации. На их основе выполнена оценка генетических взаимоотношений между изученными группами растений и построена соответствующая дендрограмма (рисунок). Дендрограмма, построенная на основе сопоставления полиморфизма продуктов амплификации популяций дикого вида и сортов сои, в определенной степени согласуется с известными данными о генеалогических связях между исследуемыми группами. Популяции дикого вида образуют отдельный от всех остальных сортов кластер (кластер диких популяций: ДУ-9, ДУ-5, ДУ-БАК). Культурные и полукультурные сорта формируют три основных кластера. Обращает на себя внимание то, что некоторые сорта формируют общие субкластеры, так, в частности, Добруджанка 18, Негруца — самые древние сорта, Амурская 41 и Памир — дальневосточные сорта; Юг 30, Подольская 416, Киевская 451, Витязь 50 — сорта Украины. Не наблюдается связи такой кластеризации с отличиями сортов по срокам созревания. Так, например, сорта Юг 30 и Ки-

евская 451 — скороспелые, а Подольская 416 и Витязь — средне-позднеспелые.

По литературным данным известно, что имеются определенные предпочтения «мотивов» динуклеотидных микросателлитных локусов у разных таксонов. Так, в частности, для млекопитающих наиболее типичен мотив (CA)_n, а для растений — (AT)_n [9]. К настоящему времени в качестве модельных объектов предковых геномов различных видов растений принято рассматривать такие растения, как рис и *Arabidopsis thaliana* [10]. Наиболее полно секвенирован геном *Arabidopsis thaliana* [10].

В целях сравнения полиморфизма потенциальных спектров ампликонов, которые возможно получить у растений с использованием вышеописанных праймеров, были рассмотрены частоты встречаемости сайтов гомологии к ним в нуклеотидных последовательностях вида *Arabidopsis thaliana*. Был проведен поиск районов, гомологичных нуклеотидным последовательностям праймеров в прямой и обратной, комплементарной ориентации по базе данных нуклеотидных последовательностей - - пг (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB, non-redundant) и базе данных транскрибируемых последовательностей dbEST программой BLASTn 2.0.7 [11]. Получены следующие данные. Для микросателлитного мотива P1_{nr}=(CT)₉G выявлено 4650 сайтов гомологии; для его инвертного повтора - P1_{nr}=C(AG)₉ - 4654. Частота встречаемости сайтов гомологии к этому праймеру в dbEST этого вида существенно меньше: P1_{est}=(CT)₉G - 1715, P1_{est}=C(AC)₉ - 1716 сайтов. Для праймера P2=(CA)₁₀O обнаруживаются 1282 сайта гомологии, для P2'=C(TC)₁₀ — также 1282. В dbEST обнаружено сайтов гомологии к (CA)₁₀G - 141 позиция, к C(TG)₁₀ — также 141 сайт, т. е. эти два динуклеотидных мотива в базе данных пг для *Arabidopsis thaliana* отличались тем, что первый встречался с существенно большей частотой, чем второй, при этом 38 % от общего числа сайтов гомологии локализованы в транскрибируемых последовательностях dbEST, т.е. лидерных последовательностях и экзонах. В этом отношении иное распределение обнаруживается по сайтам гомологии к микросателлиту (CA)₁₀G - их частота встречаемости почти в четыре раза ниже в геноме данного вида, чем первого динуклеотида, и только 10 % от общего числа сайтов локализованы в транскрибируемых районах.

Также были рассмотрены сайты гомологии для праймеров P3, P4, P5. Наименьшее число гомологичных сайтов в dbEST (10%) содержал экспериментально наиболее полиморфный праймер P2 (таблица). В целом можно констатировать, что рассмотренные в работе динуклеотидные микросателлитные повторы встречаются в геномной ДНК с относительно большей частотой по сравнению с тринуклеотидными. По-видимому, степень полиморфизма при сравнении различных сортов определяется

Распределение потенциальных сайтов связывания для микросателлитных праймеров в базах данных пг и dbEST

Праймер	Количество сайтов в пг	Количество сайтов в dbEST	Процент сайтов в транскрибируемых районах
P1 (CT) ₉ G	4650	1715	38
P1' C(AC) ₉	4654	1716	38
P2 (CA) ₁₀ G	1282	141	10
P2' C(TG) ₁₀	1282	141	10
P3 (CA) ₉ C	4629	1658	36
P3' C(TC) ₉	4629	1658	36
P4 (CAC) ₇ T	878	401	45
P4' A(GTG) ₇	878	401	45
P5 GT(CAC) ₇	573	413	72
P5' (GTG) ₇ AC	573	413	72

долей потенциальных сайтов посадки праймеров, приходящихся на транслируемые районы. Это согласуется с общепринятой точкой зрения на эволюцию транслируемых и нетранслируемых районов. Чем больше доля потенциальных праймеров локализована в нетранслируемых районах, тем больше вероятность возникновения мутационных событий, дифференцирующих близкие виды, поскольку известно, что уровень мутационных событий в нетранслируемой области выше по сравнению с транслируемой.

Таким образом, использование одного ди- и тринуклеотидного праймера позволяет получать мультилокусные маркерные спектры ампликонов, стабильно воспроизводящиеся при исследовании одних и тех же геномов, успешно дифференцирующие генофонды близкородственных форм растений, однако их информативность (полиморфность), по-видимому, зависит от присутствия сайтов гомологии к ним в транслируемых/нетранслируемых районах.

SUMMARY. Genetically interrelations between varieties of domestic (*G. max*) and wild (*G. soja*) soybeans were estimated using three- di- and two three-nucleotide microsatellite repeats (ISSR — Inter-Simple Sequence Repeat) as one primer. Wild soybean showed the widest amplicone spectrum, amplicone spectrum of a soybean variety was presented by variety-specific part of wild soybean spectrum. Informativity (the complexity of the amplicone spectra) was different in cases of di- or three-nucleotide repeat primers used. Possible dependence of ISSR markers polymorphism on microsatellite loci localizations in translated/untranslated sequences is discussed.

РЕЗЮМЕ. Генетичні взаємовідносини між сортами культурної (*G. max*) і дикої сої (*G. soja*) оцінені з використанням як одного праймера трьох ди- і двох тринуклеотидних мікросателітних повторів (ISSR — Inter-Simple Sequence Repeat). Найбільш повний спектр ампліконів у дикого виду, кожний сорт представлений сорт-специфічною частиною спектра дикої сої. Інформативність (поліморфізм спектра ампліконів) варіювала між ди- і тринуклеотидними праймерами. Обговорюється можлива залежність поліморфізму ISSR маркерів від локалізації сайтів гомології до мікросателітних локусів в послідовностях нуклеотидів, які транлюються і не транлюються.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keim P., Shoemaker R. C., Palmer R. G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean // Theor. Appl. Genet. - 1989. - 77. - P. 786-792.
2. Hymonti T. On the domestication of the soybean // Econ. Bot. - 1970. - 24. - P. 408-421.
3. Powell W., Morgante M., Doyle J. J. et al. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *Soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites // Genetics. - 1996. - 144. - P. 793-803.
4. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. // Nucl. Acids Res. - 1990. - 18. - P. 7213-7218.
5. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. L., Rafalscki J. A., Tingly S. K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. // Nucl. Acids Res. - 1990. - 18.-P. 6513-6535.
6. Caetano-Anolles G., Gresshoff M. DNA amplification fingerprinting using arbitrary mini-hairpin oligonucleotide primers // Biotechnology. - 1994. - 12. - P. 619-623.
7. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. - 1994. - 20. - P. 176-183.
8. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G. et al. Current protocols in molecular biology. — New York : John Wiley & Sons, Inc. - 630 p.
9. Primmer C. R., Raudsepp T., Chowdhary B. P. et al. Low frequency of microsatellites in the avian genome // Genome Res. - 1997. - 7- P. 471-482.
10. Miller R. Linkage mapping of plant and animal genomes // Genome Mapping. A practical approach / Ed. P. H. Dear. - IRL Press, 1997. - P. 27-47.
11. Altschul S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs // Nucl. Acids Res. - 1997. - 25. - P. 3389-3402.

Ин-т агроэкологии и биотехнологии УААН,
Киев

Поступила 23.03.99