

УДК 581.13:577.123.5/8

С.Б. ОРАЗОВА, К.К. БОГУСПАЕВ, Г.Э. СТАНБЕКОВА, А.Ш. ОМАРОВА

ПЦР-АНАЛИЗ САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ С ПРИЗНАКОМ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ

(НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ имени аль-Фараби)

Проведен ПЦР-анализ самоопыленных линий кукурузы с признаком цитоплазматической мужской стерильности с использованием специфических праймеров. Показано наличие достоверных продуктов амплификации у линий С-типа.

Обнаруженное у растений явление цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) оказалось удобным, экономичным инструментом в получении высокопродуктивных устойчивых гибридных семян /1/. Растения с признаками ЦМС, образующие стерильную пыльцу, представляют собой эффективное средство генетической кастрации материнских форм. Кроме того, кукуруза как объект для изучения генетики цитоплазматической мужской стерильности имеет ряд преимуществ перед другими культурами. Раздельнополость, крупные размеры мужских и женских соцветий, высокий коэффициент размножения, большое количество индукторов, обладающих гомозиготностью, и целый ряд других качеств позволили ученым достигнуть значительных успехов в изучении генетики ЦМС именно на этой культуре.

Однако, определение наличия признака ЦМС и его идентификация у полученных линий, было возможно только при анализе пыльцы на завершающей стадии развития растений. Учитывая, что вегетационный период культурных растений занимает, как правило, 2-3 месяца и требует значительных затрат по уходу и выращиванию, то разработка эффективного и быстрого метода обнаружения признака ЦМС в семенах и проростках самоопыленных линий кукурузы, позволит значительно сократить время и средства селекционеров.

За последние годы с помощью методов молекулярной генетики и генетической инженерии у некоторых видов растений в разных типах ЦМС, были выявлены конкретные гены, функционирование которых обуславливает наличие этого признака /2/. У кукурузы известно несколько источ-

ников стерильности, которые различались по происхождению, времени обнаружения и устойчивости наследования /3/. Например, USDA, или S-источник, по своим свойствам идентичен молдавскому типу пыльцевой стерильности и происходит от генетического тестерного рода USDA-1. Техасский источник был выделен из разновидности Желтая ионьская при выведении самоопыленных линий /4/. Он получил широкое применение в селекционной практике всех стран под названием техасского типа стерильности, но подверженность этих линий гельминтозу, ограничивает его использование. В настоящее время для получения гибридов все чаще применяют С (Чартра)- и S-типы стерильности /5,6/.

Поиск молекулярных маркеров признака ЦМС в семенах и проростках культурных злаков, во многих лабораториях мира, и в нашей в том числе, начались много лет назад. Молекулярные маркеры по многим показателям превосходят биохимические и морфологические, а также обладают высокой дискриминационной способностью. ДНК-маркеры имеют ряд преимуществ, позволяющих преодолеть ограничения, свойственные морфологическим и биохимическим показателям: 1) они не зависят от природных условий; 2) возможен анализ растительной ткани на любой стадии развития растения. Техника профилирования ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) относительно проста, не требует больших количеств ДНК и радиоактивной либо другой метки для визуализации полиморфизмов, с ее помощью, возможно, продуцировать неограниченное количество потенциальных маркеров. Благодаря методу ПЦР стало возможным амплифицировать участки гено-

ма, которые соответствуют случайно или предварительно выбранным праймерам – затравочным последовательностям ДНК /7/.

В связи с этим целью настоящих исследований было разработка и применение метода ПЦР-анализа для идентификации местных самоопыленных линий кукурузы с различными типами ЦМС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований служили зерновки 11 самоопыленных линий кукурузы (*Zea mays L.*): с молдавским (М), техасским (Т) и боливийским (С) типами цитоплазматической мужской стерильности и их закрепители. Исходный материал получен отделом кукурузы НИИ земледелия и растениеводства МСХ РК.

В экспериментах по выделению тотального препарата ДНК использован апробированный метод, описанный в работе /8/. Концентрацию ДНК в полученных образцах определяли флюориметрическим методом. ПЦР осуществляли на амплификаторе со следующим температурным режимом - 94°C 2 мин; 94°C 30 с 35 циклов, 65°C 30 с, 72°C 45 с; 72°C 5 мин; 10°C

Реакционная смесь - 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 μM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 50 нг праймеров, 50 нг ДНК, 1 U Таq ДНК-полимеразы.

Продукты амплификации анализировались на 1,4% агарозном геле при 100 В в течение 1 часа, визуализировали окрашиванием бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Три пары праймеров специфичных для Т-, С-, и S-типов ЦМС были подобраны по последовательностям mtДНК, опубликованным GenBank

Специфичность подобранных праймеров и структурные различия между mtДНК стерильных и фертильных линий не допускают образования продукта амплификации на ДНК фертильных линий. В качестве маркера использовалась λ ДНК EcoR Hind III /8/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

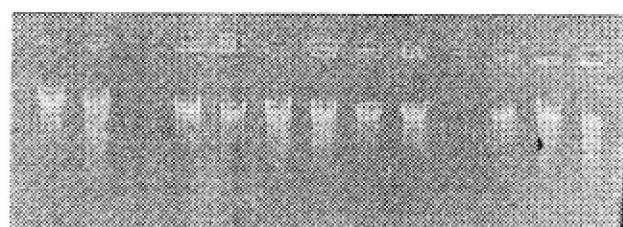
В экспериментах использовали местные самоопыленные линии кукурузы с признаком ЦМС и линии закрепители представленные в табл.1

Препараты тотальной ДНК, выделенных из зерновок кукурузы, проверяли, используя электрофоретический анализ, который показал, что полученные препараты тотальной ДНК из всех использованных линий нативны и не имеют признаков деградации (рис. 1).

В экспериментах для обнаружения признака ЦМС и его идентификации использовали специфические праймеры, которые в мировой практике определены как стандарты для каждого типа

Таблица 1. Исследованные самоопыленные линии кукурузы с признаками ЦМС

№	Линия	Тип цитоплазматической стерильности
1	И-327 Шиндельмайзера МС	молдавский
2	И-327 Шиндельмайзер ЗМ	закрепитель молдавского типа
3	Шиндельмайзер 100 МС	молдавский
4	ВИР1573М	закрепитель молдавского типа
5	ВИР44МС	молдавский
6	ВИР44ЗМ	закрепитель молдавского типа
7	Киз70С	боливийский
8	Киз703С	закрепитель боливийского типа
9	ВИР133С	боливийский
10	1472 КизRF7C	техасский
11	ВИР157TC	техасский тип
12	Казахстанская 58	фертильная линия



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
1 – И-327 Шиндельмайзер ЗМ, 2 – Киз70С, 3 – ВИР133С,
4 – Шиндельмайзер 100 МС, 5 – ВИР1573М,
6 – Киз703С, 7 – Казахстанская 58 (контроль),
8 – 1472 КизRF7С, 9 – ВИР44МС,
10 – ВИР443М, 11 – ВИР157ТС

Рис. 1. Электрофоретическое разделение препаратов тотальной ДНК

ЦМС. Последовательность праймеров, синтез которых был осуществлен фирмой «SIGMA, представлена в табл.2

На рис.2. представлена принципиальная схема и участки рекомбинантной мтДНК, подобранные для создания специфических праймеров Т, С и S типов.

В первой серии опытов ПЦР-анализ проводили со специфическими праймерами для выявления признака техасского типа ЦМС. В случае наличия этого признака у исследованных линий должны быть получены продукты амплификации 440 пн. ПЦР-анализ ДНК исследованных самоопыленных линий кукурузы не выявил про-

Таблица 2. Характеристика использованных праймеров

Праймер	Последовательность	Тип цитоплазматической стерильности
CMSTF5'	CATGAAATGGGTGAAGTCTCTTTC-3'	техасский
CMSTRS'	AAGAGAAAAGGGAGACTTTGGTCCC-3'	
CMSCF5'	ATGCTAATGGTGTCCGATTCC-3'	боливийский
CMSCR5'	AGCATCATCCACATTGCGTAG-3'	
CMSSF5'	CAACTTATTACGAGGCTGATGC-3'	молдавский
CMSSR5'	AGTTCGTCCCATAACCCGTAC-3'	

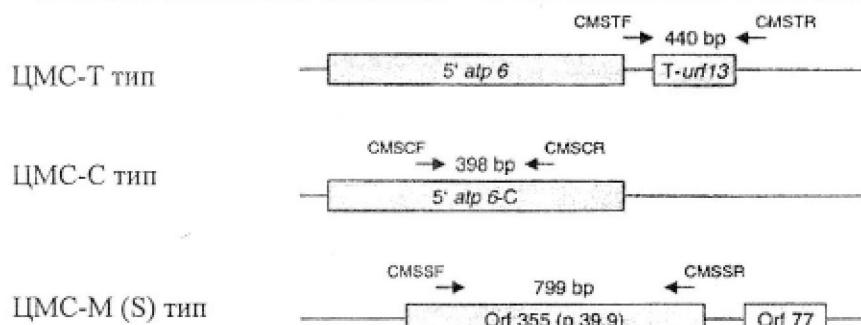
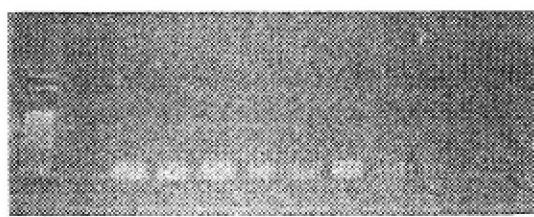


Рис. 2. Участки рекомбинантной мтДНК подобранные для создания специфических праймеров.

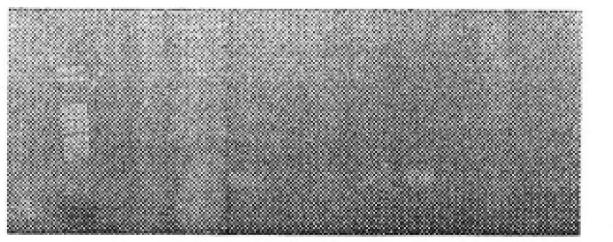


1 – Маркер, 2 - И-327 Шиндельмайзер ЗМ, 3 – Киз70С, 4 – ВИР133С, 5 – Шиндельмайзер 100 МС, 6 – ВИР1573М, 7 – Киз703С, 8 – Казахстанская 58 (контроль), 9 – 1472 КизRF7С, 10 – ВИР44МС, 11 – ВИР443М, 12 – ВИР157ТС

Рис. 3. Продукты амплификации со специфическими праймерами для техасского типа ЦМС не обнаружены.

дуктов амплификации, что свидетельствует об отсутствии техасского типа стерильности у исследованных линий. (рис. 3).

Подобную картину наблюдали и при анализе самоопыленных линий кукурузы с праймерами и для молдавского типа ЦМС, где также не обнаружены продукты амплификации, свидетельствующие о наличии молдавского признака ЦМС.



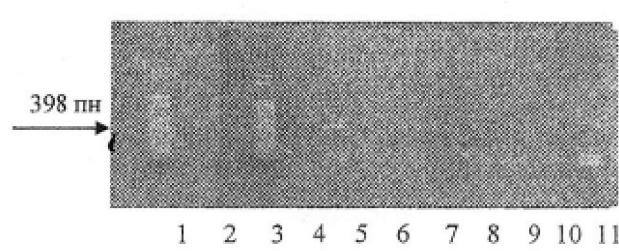
1 – Маркер, 2 - И-327 Шиндельмайзер ЗМ, 3 – Киз70С, 4 – ВИР133С, 5 – Шиндельмайзер 100 МС, 6 – ВИР1573М, 7 – Киз703С, 8 – Казахстанская 58 (контроль), 9 – 1472 КизRF7С, 10 – ВИР44МС, 11 – ВИР44ЗМ, 12 – ВИР157ТС

Рис. 4. Продукты амплификации со специфическими праймерами для признака молдавского типа ЦМС не обнаружены

Достоверные продукты амплификации и соответственно доказательства присутствия признака ЦМС были получены только при анализе самоопыленных линий кукурузы с праймерами для боливийского (С) типа ЦМС, о чем свидетельствует продукт амплификации 398 пн (рис. 4).

Полученные результаты показали, что представленные самоопыленные линии кукурузы с техасским и молдавским типами ЦМС, не отвечают стандартам. Возможно, эти линии имеют свои особенности, которые можно идентифицировать при использовании генетического анализа и цитоэмбриологических исследований стерильной пыльцы. С другой стороны, есть возможность все же подобрать специфические праймеры к полученным самоопыленным линиям кукурузы с признаком ЦМС, обозначенным как техасский и молдавский типы.

Таким образом, следует заключить: 1- проведенные исследования представленных самоопыленных линий кукурузы, с использованием метода ПЦР-анализа со специфическими праймерами показали наличие достоверных продуктов амплификации у линий С-типа; 2- проведенные эксперименты доказывают удобство и про-



1 – Маркер, 2 - И-327 Шиндельмайзер ЗМ, 3 – Киз70С, 4 – ВИР133С, 5 – Шиндельмайзер 100 МС, 6 – ВИР1573М, 7 – Киз703С, 8 – Казахстанская 58 (контроль), 9 – 1472 КизRF7С, 10 – ВИР44МС, 11 – ВИР44ЗМ, 12 – ВИР157ТС

Рис. 5. Продукты амплификации со специфическими праймерами для признака боливийского типа ЦМС

стоту используемого метода для раннего выявления признака ЦМС и подтверждает возможность его использования в гибридной селекции кукурузы.

Представленная работа выполнена в рамках проекта НЦБ РК, № ГР 0106РК00569 (2006-2008 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1 Kaul, M.L.H. Male sterility in higher plants. Springer-Verlag, Berlin. 1988.

2 Dewey, R.E., and K.L. Korth. Molecular aspects of cytoplasmic male sterility in maize. p. 402–416. // Y.P.S. Bajaj. Biotechnology in agriculture and forestry. V. 25. 1994. Maize. Springer-Verlag, Berlin.

3 Beckett, J.B. Classification of male sterile cytoplasms in maize (*Zea mays* L.). // Crop Sci. V.11. 1971. P.724–727.

4 Duvick, D.N. Cytoplasmic pollen sterility in corn // Adv. Genet. V.13. 1965. P.1–56.

5 Ullstrup, A.J. The impact of the Southern corn leaf blight of 1970–1971 // Annu. Rev. Phytopathol. V.10. 1972. P.37–50

6 Beckett, J.B. Classification of male sterile cytoplasms in maize (*Zea mays* L.) // Crop Sci. V.11.1971. P.724–727

7 Wang, G.L., R.A. Wing, and A.H. Paterson PCR amplification from single seeds, facilitating DNA marker-assisted breeding // Nucleic Acids Res. 21. 1993. P.2527.

8 Liu Zh., Peter O. S., Long M., Weingartner U., Stamp P., Kaeser O. A PCR Assay for Rapid Discrimination of Sterile Cytoplasm Types in Maize // Crop Science. V. 42. 2002. P.566-569

Резюме

Озіндік праймерлерді қолданып цитоплазмалық атаптық ұрықсыздық белгісі бар жүгерінің өздігінен тозандатын линияларының ПЦР-талдауы еткізілді. С-турінің линияларында амплификация өнімдері көрсетілген.

Summary

It was carry out PCR-assay of the inbred maize lines with cytoplasmic male sterility. C-type lines have amplification products.