

## ТЕСТИРОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА В СОРТАХ И ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЯХ МНОГОЛЕТНЕЙ ЛЮЦЕРНЫ

С.Э. Смоленская, Э.В. Квасова, О.Е. Редина

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: oredina@bionet.nsc.ru

Проводили сравнительный анализ геномов люцерны сортов Омская 192 и Марусинская 425 (*Medicago varia* Mart.), а также двух высокоинбредных линий из поколений I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub>, полученных из сорта Омская 192. В исходных сортовых популяциях люцерны Омская 192 и Марусинская 425 обнаружен молекулярный полиморфизм. Анализ инбредных линий № 140 (I<sub>40</sub>) и № 106 (I<sub>55</sub>) показал, что у маркеров D12Rat4 и D8Rat81 наблюдается высокое единообразие рисунка амплифицированных фрагментов, однако рисунки изученных поколений не идентичны. Для маркеров D11Rat87 и D6Rat107 наблюдается единообразие рисунка фрагментов в линии № 140 (I<sub>40</sub>) и полиморфизм в линии № 106 (I<sub>55</sub>). Обратная картина была получена при использовании маркера DXRat67. Показано, что линия № 140 (I<sub>40</sub>) характеризуется более высокой жизнеспособностью, чем линия № 106 (I<sub>55</sub>), при этом в I<sub>55</sub> поколении уровень негативной изменчивости был более высоким. Поскольку оба поколения, I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub>, представлены высокоинбредными линиями, различающимися, однако, по уровню жизнеспособности, то характер рисунка амплифицированных фрагментов, наблюдаемый в этих поколениях, может быть связан с признаками глубины инбредной депрессии.

**Ключевые слова:** многолетняя люцерна, ДНК-полиморфизм, инбредные линии.

### Введение

Инбредные линии являются уникальным инструментом для изучения генетической основы сходства и различий морфологических, физиологических и биохимических признаков, характеризующих исходную сортовую популяцию. Длительный отбор по адаптивно важным признакам, сопровождающийся тесным инбридингом, приводит к глубоким преобразованиям генотипических и фенотипических особенностей линий (Иовлева, Мыльников, 2007). Одним из адаптивно важных признаков в селекции люцерны является признак самофертильности. Данный признак может изменяться под влиянием условий внешней среды. В сортовых популяциях многолетней люцерны наблюдается значительная изменчивость по данному признаку. Вместе с тем некоторые клоны ведут себя весьма стабильно (Квасова, Шумный, 1986). В популяции люцерны Омская 192 в течение многих лет проводился отбор на самофертильность, в результате которого были получены инбредные линии. Уровень самофертильности

в линиях разных поколений сильно варьировал (Квасова, Шумный, 1983). Для исследования генетического разнообразия инбредного материала успешно используются молекулярные маркеры (Matveeva *et al.*, 2002; Попов и др., 2002). Целью настоящей работы являлось изучение морфологической изменчивости, а также внутрелинейного и межлинейного полиморфизма в разных поколениях инбредных линий люцерны (*M. varia* Mart.), полученных из сорта Омская 192, а также в сортовых популяциях люцерны Омская 192 и Марусинская 425.

### Материал и методы

**Характеристика растительного материала.** Сорта: Омская 192, люцерна синегибридная, и Марусинская 425, люцерна желтогибридная (желтая дикорастущая пойменная × синяя) относятся к виду *Medicago varia* Mart. (Гончаров, Лубенец, 1985). Инбредные линии (табл. 1) получены на основе сорта Омская 192 в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Отбор материала для выращивания каждого

Таблица 1

Характеристики инбредных линий многолетней люцерны Омская 192

Поколение инбридинга	№ линии	Всхожесть, %	Число растений, <i>n</i>	Число цветков в кисти	Самофертильность в линии, % бобов с семенами
I <sub>0</sub>	–	22,0	–	10–23	–
I <sub>17</sub>	282	82,0	98	4–12	75,0
I <sub>40</sub>	140	84,0	216	9–13	33,0
I <sub>55</sub>	106	84,6	39	10–14	14,3

последующего поколения проводили по признаку самофертильности, который определяли по числу завязавшихся бобов с семенами от искусственного самоопыления.

**Выделение ДНК.** ДНК выделяли из ткани 4-дневных проростков люцерны с использованием протеиназы К и фенольной экстракции по стандартной методике (Sambrook *et al.*, 1989). Далее ДНК переосаждали и растворяли в деионизированной воде. Всего проанализировано проростков: сорт Омская 192 – 4 шт., сорт Марусинская 425 – 4 шт., линия 282 (I<sub>17</sub>) – 2 шт., линия 140 (I<sub>40</sub>) – 7 шт. и линия 106 (I<sub>55</sub>) – 6 шт.

**Молекулярные маркеры и полимеразная цепная реакция на геномной ДНК люцерны.** Для исследования полиморфизма инбредных растений люцерны были протестированы ДНК-маркеры: D3Rat65, D3Rat109, D4Rat76, D5Rat85, D6Rat80, D6Rat107, D8Rat81, D9Rat79, D10Rat67, D10Rat160, D11Rat87, D12Rat4, DXRat90, DXRat67 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Из 14 маркеров были отобраны 5 (табл. 2) со стабильным спектром амплификатов, хорошо воспроизводимым в повторных экспериментах. Спектры амплифицированных фрагментов представлены на рис. 1. Отсутствие фрагментов в дорожках с негативным контролем под-

тверждает специфичность работы праймеров на геномной ДНК.

ПЦР проводили в 1х буфере (67 мМ трис-НСI (рН 8,9); 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Tween 20; 10 мМ бета-меркаптоэтанол), 200 мкМ каждого из четырех dNTP, 3 мкМ каждого праймера с добавлением 50–100 нг ДНК и 1 ед. активности фермента Taq 1 ДНК-полимеразы (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск). Реакцию амплификации проводили по следующей схеме: начальная денатурация 94 °С – 4 мин; 39 циклов амплификации: денатурация при 94 °С – 20 с, отжиг праймеров при 46 °С – 15 с, элонгация при 72 °С – 50 с. Заключительную элонгацию проводили в течение 5 мин при 72 °С.

**Анализ ПЦР-фрагментов.** ПЦР-фрагменты анализировали электрофорезом в 8 %-м полиакриламидном геле. Электрофорез проводили в трис-боратном буфере (1×ТВЕ) при напряженности 10В/см. Для визуализации разделенных ПЦР-фрагментов гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали с помощью гелимиджера Biometra (Germany).

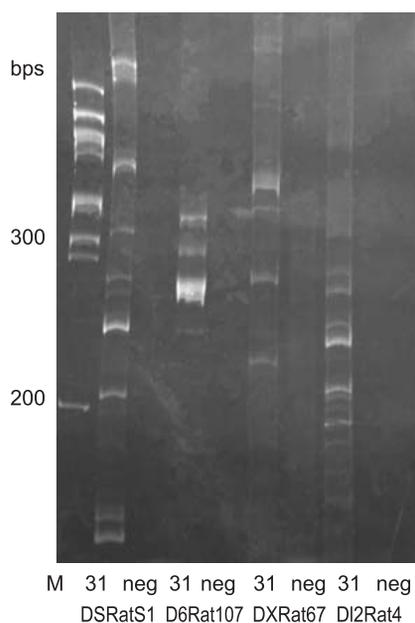
### Результаты и обсуждение

Многолетняя люцерна – автотетраплоид. Ее сложная генетическая природа затрудняет

Таблица 2

Праймеры, использованные в работе

№	Маркер	Праймеры, 5'→ 3'
1	D6Rat107	CGAAATGATCCCCAATTCAG CCTATTGCA TGCTTTCTCCA
2	D8Rat81	AAAGGTGGTAGGGCAGGATC TGTCCTCGTCTGTCAAATGG
3	D11Rat87	GTCA TACTCACTCCATCC TCAACTAACACCTTCTTCTAC
4	D12Rat4	ACATATGTGTGGGTGCATGG TGCATGAGGGACTGAGTCTG
5	DXRat67	CCTGCCTGGAATGACTCTG STATGATTTGTGGGATGGCC



**Рис. 1.** Спектры амплифицированных фрагментов для маркеров D8Rat81, D6Rat107, DXRat67 и D12Rat4 и специфичность их работы на геномной ДНК люцерны *Medicago varia* Mart. Омская 192 (I<sub>40</sub>, линия № 31).

исследование полиморфизма методами классического генетического анализа. С введением молекулярных маркеров в практику биологических исследований появились новые возможности изучения генетического разнообразия и определения родства на внутри- и межвидовом уровне (Diwan *et al.*, 2000; Bardakci, 2001).

При анализе 4 генотипов сорта Марусинская 425 и 4 генотипов Омская 192 были получены как различные, так и сходные амплифицированные фрагменты (рис. 2, а–д), что предполагает частичное сходство геномов данных сортов по ряду признаков. Такая же картина частичного сходства, наблюдаемая при сравнении исходных сортов, была получена и в проанализированных инбредных линиях № 140 (I<sub>40</sub>) и № 106 (I<sub>55</sub>).

Исследование генома инбредных линий Омская 192 с помощью молекулярных маркеров показало, что при отборе на самофертильность абсолютная гомозиготность не достигается и часть популяции остается гетерогенной. В инбредных поколениях люцерны «закрепились» определенные рисунки амплификатов для отдельных маркеров, что вероятно, связано с

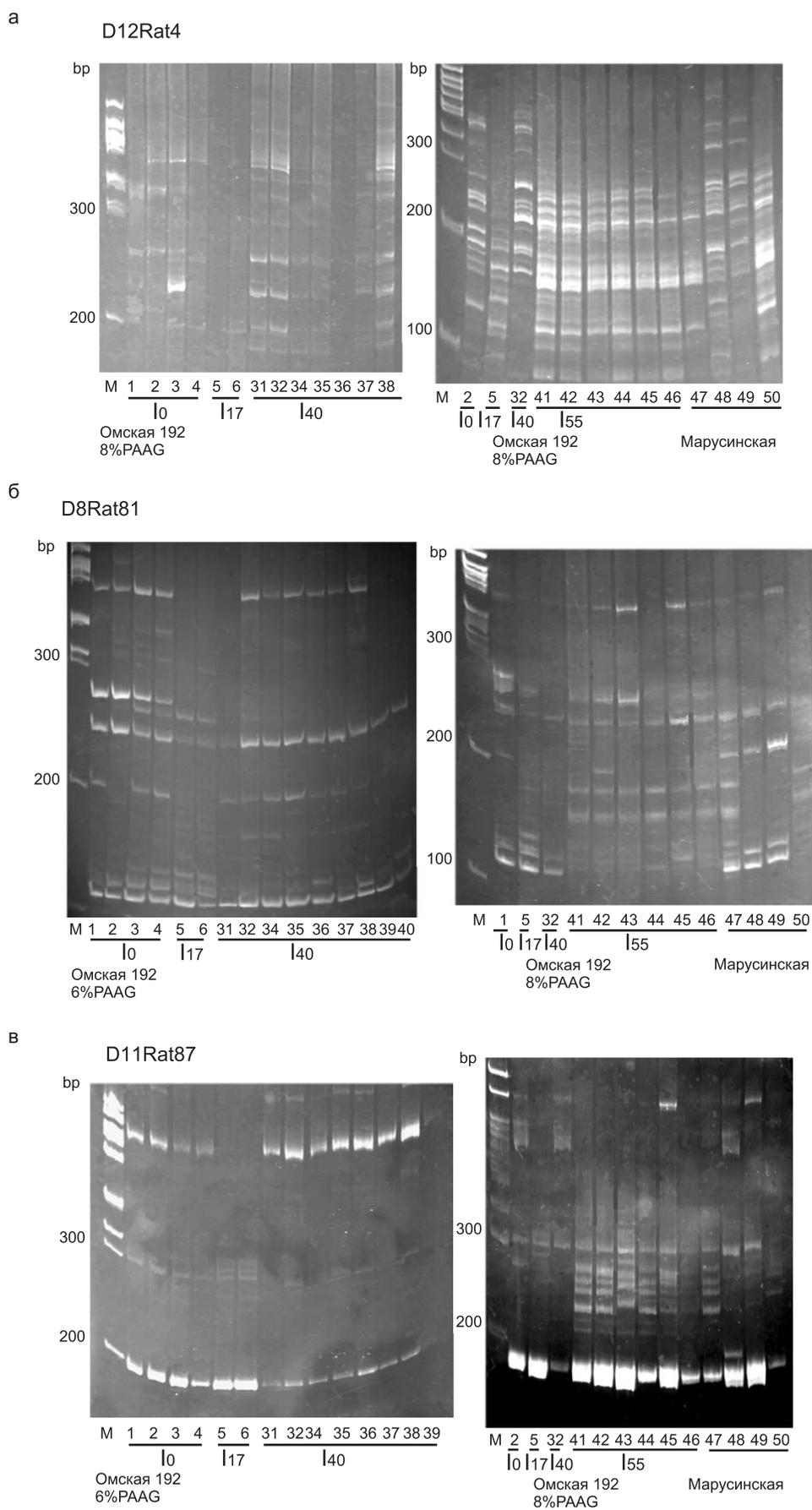
многолетним отбором по признакам, характеризующим жизнеспособность.

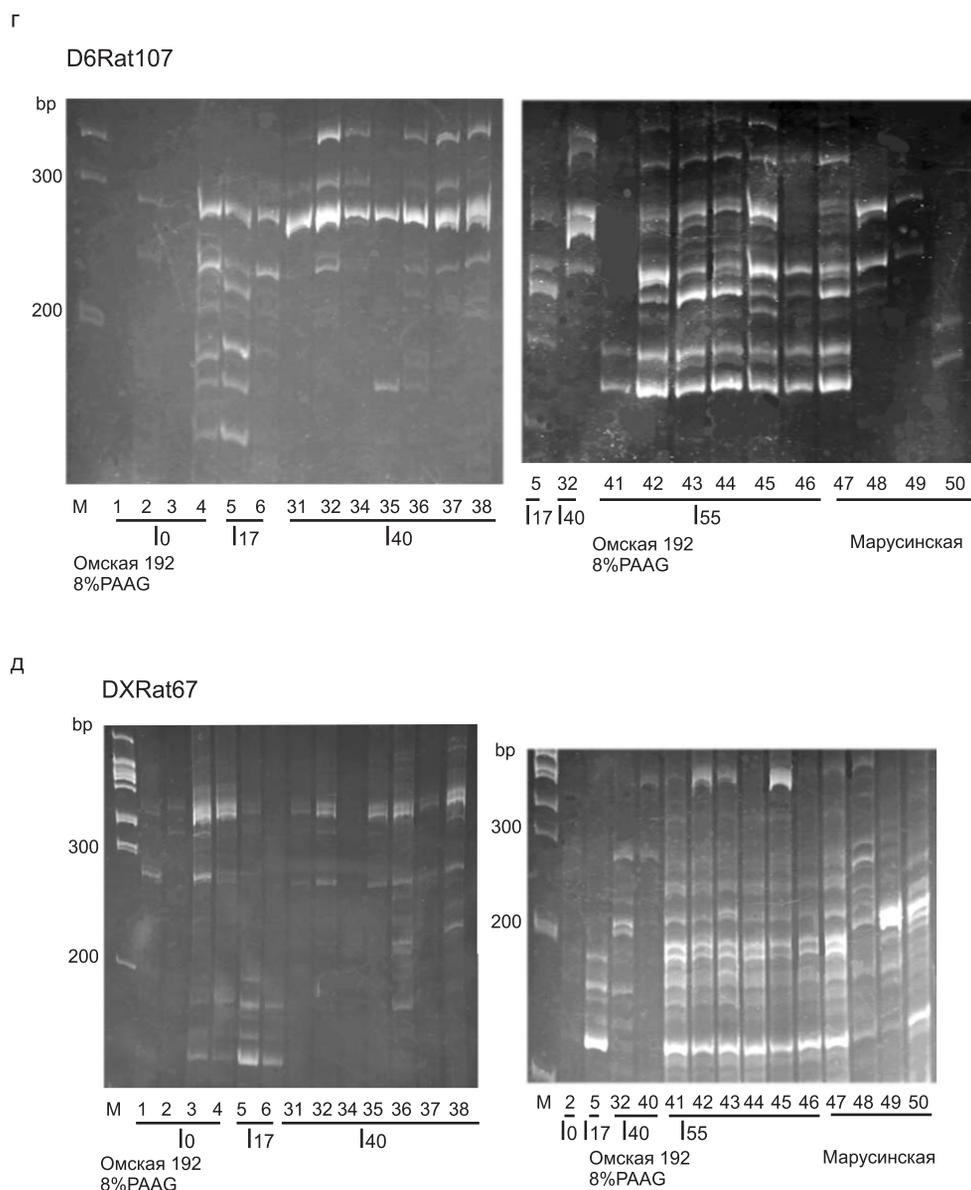
При анализе инбредных линий Омская 192 для маркеров D12Rat4 и D8Rat81 наблюдается высокое единообразие рисунка амплифицированных фрагментов в линиях поколений I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub>, однако рисунки в этих поколениях не идентичны (рис. 2, а, б). Для маркеров D11Rat87 и D6Rat107 наблюдается единообразие рисунка фрагментов в линии № 140 (I<sub>40</sub>) и полиморфизм в линии № 106 (I<sub>55</sub>) (рис. 2, в, г). Обратная картина была получена при анализе маркера DXRat67 (рис. 2, д).

Инбридинг служит одним из эффективных способов изучения механизмов, направленных на поддержание сбалансированности генетических систем. В соответствии с теорией в инбредных линиях должно происходить систематическое уменьшение гетерозиготности и возрастание гомозиготности. Однако в литературе приводится немало данных, свидетельствующих о повышении фенотипической изменчивости инбредных линий по сравнению с аутбредными (Нарбут, 1966; Лутова и др., 1994).

При проведении инбридинга в популяции Омская 192 в ряду поколений наблюдали значительную изменчивость по морфологическим признакам и характеристикам размножения (табл. 3). Накопление морфологической изменчивости в инбредных линиях при отборе на самофертильность привело к увеличению процента самостерильных растений и, следовательно, оказало влияние на жизнеспособность линий. Линии I<sub>40</sub> характеризуются более высокой жизнеспособностью, чем линии I<sub>55</sub>. В линиях поколения I<sub>55</sub> наблюдается более высокий уровень негативной изменчивости. Изменение способности к перекрестному опылению под действием инбридинга и выделение самофертильных форм у многолетней люцерны привело к снижению жизнеспособности инбредных растений. Вероятно, генетическая природа различий между линиями сорта Омская 192 при длительном отборе по репродуктивным признакам в значительной мере сводится к разному соотношению в них признаков, влияющих на жизнеспособность.

Ранее было показано, что разнонаправленный отбор по репродуктивной функции в популяциях дрозофилы привел к получению инбредных ли-





**Рис. 2.** Полиморфизм в геномной ДНК сортов люцерны *Medicago varia* Mart. Омская 192 и инбредных линий сорта Омская 192 (I<sub>17</sub>, I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub>), найденный при использовании маркеров: а – D12Rat4; б – D8Rat81; в – D11Rat87; г – D6Rat107; д – DXRat67.

ний, различающихся по целому комплексу адаптивно важных свойств, в том числе фертильности и продолжительности жизни (Кайданов и др., 1994, 1997; Потапенко и др., 2000). Генетическая природа различий между полученными линиями дрозифилы в значительной мере сводилась к разному соотношению в них мутаций, влияющих на жизнеспособность. Поскольку линии прошли одинаково длительный путь инбридинга, был сделан вывод о том, что инбредная депрессия определяется не столько инбридингом, сколько

характером и направлением отбора (Иовлева, Мыльников, 2007).

В нашем эксперименте наблюдаются сходные результаты. Отбор по способу размножения привел к снижению жизнеспособности полученных линий. В исследованных линиях № 140 и № 106 поколений I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub> соответственно наблюдается значительный уровень полиморфизма. Поскольку оба поколения (I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub>) представлены высокоинбредными линиями, различающимися, однако, по уровню жизнеспособности, то разли-

Таблица 3

Изучение морфологической изменчивости в инбредных линиях при отборе на самофертильность

Поколение инбридинга	Число линий, <i>n</i>	Средняя самофертильность, % бобов с семенами	% самостерильных растений	% хлорофилльных мутантов	% морфологически измененных растений	Тип изменчивости
I <sub>0</sub>	–	18,5	14,5	–	–	–
I <sub>17</sub>	10	17,1	14,1	11,2	13,3	Форма и размер листьев, структура стебля
I <sub>40</sub>	32	28,2	9,9	3,2	50,6	Размер цветка
I <sub>55</sub>	7	8,4	35,9	1,4	69,4	Аномальное развитие частей растения

чия в характере рисунка амплифицированных фрагментов, наблюдаемые в этих поколениях, могут быть связаны с признаками глубины инбредной депрессии. Дальнейший анализ инбредных линий I<sub>40</sub> и I<sub>55</sub> позволит выявить конкретные гены, контролирующие самофертильность люцерны и характеризующие различную жизнеспособность.

### Литература

- Гончаров П.Л., Лубенец П.А. Биологические аспекты возделывания люцерны. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1985. 255 с.
- Иовлева О.В., Мыльников С.В. Последствия отбора в высокоинбредных линиях дрозофилы // Генетика. 2007. Т. 43. № 10. С. 1328–1340.
- Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Иовлева О.В., Галкин А.П. Направленный характер генетических изменений при длительном отборе линий *Drosophila melanogaster* по адаптивно важным признакам // Генетика. 1994. Т. 30. № 8. С. 1085–1096.
- Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Галкин А.П. и др. Генетические эффекты дестабилизирующего отбора при селекции по адаптивно важным признакам в линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1102–1109.
- Квасова Э.В., Шумный В.К. Полиморфизм популяции люцерны по признакам системы размножения // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1983. № 15. Вып. 3. С. 94–99.
- Квасова Э.В., Шумный В.К. Изменчивость люцерны при глубоком инбридинге // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1986. №18. Вып. 3. С. 14–18.
- Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С. и др. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы // Генетика. 1994. Т. 30. № 8. С. 1065–1074.
- Нарбут С.И. Генетическая коллекция инбредных линий редиса // Генетика. 1966. № 5. С. 89–100.
- Попов В.Н., Урбанович О.Ю., Кириченко В.В. Исследование генетического разнообразия инбредных линий подсолнечника методами RAPD и изоферментного анализа // Генетика. 2002. Т. 38. № 7. С. 937–943.
- Потапенко А.И., Рудаковская Е.Г., Кайданов Л.З., Акифьев А.П. Сравнительный анализ продолжительности жизни линий HA и BA *Drosophila melanogaster* // Изв. РАН. Сер. биол. 2000. № 3. С. 373–376.
- Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers // Turk. J. Biol. 2001. V. 25. P. 185–196.
- Diwan N., Bouton J.H., Kochert G., Cregan P.B. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 165–172.
- Matveeva T.V., Simonova A.V., Lutova L.A. Molecular markers of inbred radish (*Raphanus sativus* var. *Radicola* pers.) // Lines Cellular and Mol. Biol. Letters. 2002. V. 7. P. 845–848.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL Press: Cold Spring Harbor, 1989. 1659 p.

## THE USE OF MOLECULAR MARKERS FOR POLYMORPHISM STUDY IN PERENNIAL ALFALFA POPULATIONS

S.E. Smolenskaya, E.V. Kvasova, O.E. Redina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: oredina@bionet.nsc.ru

### Summary

Molecular markers were used for comparative analysis of alfalfa *Medicago varia* Mart. genomes: Omskaya 192 and Marusinskaya 425 cultivars and two inbred lines N 140 (I<sub>40</sub>) and N 106 (I<sub>55</sub>) produced from Omskaya 192. Significant polymorphism of the amplified fragments has been demonstrated between Omskaya 192 and Marusinskaya 425 cultivars. The analysis of the inbred lines from I<sub>40</sub> and I<sub>55</sub> with the markers D12Rat4 and D8Rat81 revealed the high similarity of the amplified fragments in every line but the patterns differed between the lines. The similarity of the amplified fragments in I<sub>40</sub> and polymorphic pattern of bands in I<sub>55</sub> were observed while using the markers D11Rat87 and D6Rat107. The opposite effect was found in the two lines with the marker DXRat67. Both lines studied are highly inbred but they are known as the lines with different viability. The viability of I<sub>40</sub> lines was higher than that in I<sub>55</sub>, but significantly higher level of the negative variability was observed in I<sub>55</sub> lines. The differences in the patterns of the amplified fragments are probably concerned with the inbreeding depression.