

УДК 575.113:582.769:577.2:577.21

ОБЪЕДИНЕНИЕ В ОДНОМ ГЕНОТИПЕ ЛОКУСОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВОЛОКНА, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «ПИРАМИДИРОВАНИЯ ГЕНОВ»

А.А. Туланов, М.М. Дарманов, А.Х. Макамов, О.С. Тураев, В.С. Камбурова, И.Ю. Абдурахмонов

Центр геномики и биоинформатики АН РУз, Ташкент, Узбекистан

В современной селекции при создании новых сельскохозяйственных культур активно применяют новые методы и технологии, связанные с достижениями генетики и биотехнологии. Одним из таких методов является «пирамидирование генов», позволяющее собирать в один генотип несколько хозяйственно-ценных признаков, ассоциация которых с определенными ДНК-маркерами уже известна. В настоящее время данная технология считается основной приемлемой стратегией при создании новых сортов сельскохозяйственных культур [3; 4].

Использование метода пирамидирования генов / локусов для создания сортов хлопчатника, эффективно сочетающих в себе гены / локусы нескольких признаков качества волокна, например, микронейр, прочность, длина и элонгация, позволяет существенно повысить производительность хлопководства с точки зрения текстильной индустрии. Известно, что чем тоньше, прочнее и длиннее волокно хлопчатника, тем оно ценнее и предпочтительнее для текстильной промышленности, так как из него будут сотканы ткани лучшего качества.

С учетом сказанного, целью нашего исследования было создание с помощью технологии пирамидирования генов новых линий хлопчатника, в которых ДНК-локусы, ответственные за различные показатели качества волокна (длина, прочность и элонгация) объединены в одном генотипе, что позволит получить сорта, улучшенные одновременно по нескольким признакам качества волокна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для скрещивания в качестве доноров были выбраны две разновидности *Gossypium hirsutum*: первый донор – линия L-141, которая имеет в геноме маркерный локус, отвечающий за длину и прочность волокна, и второй – Saenr Pena 85, с идентифицированным QTL-локусом, определяющим элонгацию волокна. В качестве генотипа-реципиента был выбран коммерческий сорт Андижан-35.

На первом этапе исследований были получены простые гибриды в двух комбинациях скрещивания: (Андижан-35×L-141) и (Андижан-35×Saenr Pena 85). На следующем этапе эти простые гибриды были скрещены друг с другом для получения первого поколения сложного гибрида [(Андижан-35×L-141)×(Андижан-35×Saenr Pena 85)]. И, наконец, с целью закрепления остальных признаков сорта Андижан-35 и элиминации ненужных признаков доноров, кроме качества волокна, было проведено беккросс скрещивание полученных сложных гибридов (F₁) с растением – реципиентом Андижан-35. Таким образом, были получены генотипы BC₄ F₂.

До проведения последующих скрещиваний гибриды первого беккросс (BC₁) поколения были проанализированы на предмет приобретения целевого признака с помощью ПЦР-анализа, используя ДНК маркер BNL1604, ассоциированный с длиной и прочностью волокна, и ДНК-маркер BNL3650, ассоциированный с элонгацией волокна [1; 2]. Положительные гибриды, несущие интересующие нас аллели, оставляли для следующих серий скрещивания.

ДНК-маркеры. До проведения последующих скрещиваний гибриды первого беккросс (BC₁) поколения были анализированы на предмет приобретения целевого признака через ПЦР-анализ их ДНК с помощью маркера BNL1604, ассоциированного с длиной и прочностью волокна, и ДНК-маркера BNL3650, ассоциированного с элонгацией волокна [1,2].

Положительные гибриды, несущие интересующие нас аллели, оставляли для следующих серий скрещивания.

Выделение геномной ДНК. Для выделения ДНК с каждого растения собирали по 2–3 свежих листа, замораживали их в жидком азоте и хранили при -80 °С до выделения геномной ДНК. Выделение геномной ДНК проводили СТАВ-методом с незначительными модификациями [5].

ПЦР и генотипирование. Для генотипирования использовали панель микросателлитных маркеров, созданных в рамках ранее проведенных исследований, чья ассоциация с определенными признаками качества волокна была установлена [1, 2]. Микросателлитное генотипирование было проведено в соответствии с методом Reddy *et al.*, 2001 [6].

Анализ качественных показателей волокна. Оценка качества волокна материалов исследования проводилась на оборудовании HVI (High Volume Instrumentation) в центре сертификации качества волокна “СИФАТ”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам молекулярно-генетического анализа каждого растения BC₄ F₂-поколения нами были идентифицированы генотипы, гомозиготные по двум маркерным локусам (BNL1604 и BNL3545) с характерным для донорных линий (L-141 и Saenr Pena85) спектром распределения аллелей. Эти генотипы были отобраны для последующих исследований технологических показателей качества волокна и для оценки влияния интрогрессированных QTL-аллелей на эти показатели.

В результате проведенных скрещиваний и индивидуального отбора были выбраны 245 гибридов BC₄ F₂, генотипирование которых показало ожидаемое распределение аллелей, т. е. маркеров в потомстве BC₄ F₂. Так, из 245 гибридов 126 растений были гетерозиготны по маркеру BNL1604 (прочность волокна), у 57 генотипов паттерн ПЦР-продуктов был похож на генотип реципиента, у остальных 62 гибридов – на генотип донора. По второму маркеру BNL3545 (элонгация волокна) распределение генотипов было следующее: 114 гибрида были гетерозиготами, 68 растений имели аллели, свойственные реципиентному генотипу и 63 – донорному.

Таким образом, анализ частоты выявления маркеров показал, что в поколении BC₄ F₂ расщепление генотипов по обоим исследуемым маркерам происходило в соотношении 1:2:1.

Полученные результаты показали, что растения BC₄ F₂ поколения, гомозиготные по обоим QTL локусам, имеют длину волокна (Len), равную 1,18 дюймам, прочность (STR) – 35,2 гс/текс и элонгацию (Elg) – 10,8 %. У реципиента-Андижан-35 эти показатели значительно ниже: длина волокна – 1,13 дюйма, прочность – 32,5 гс/текс, элонгация -9,0 %. У одного из доноров, т. е. L-141 длина и прочность волокна составляют 1,24 дюйма и 40,1 гс/текс, соответственно, а второй донор – Saenr Pena 85 имеет более высокий показатель элонгации волокна, равный 9,7 %.

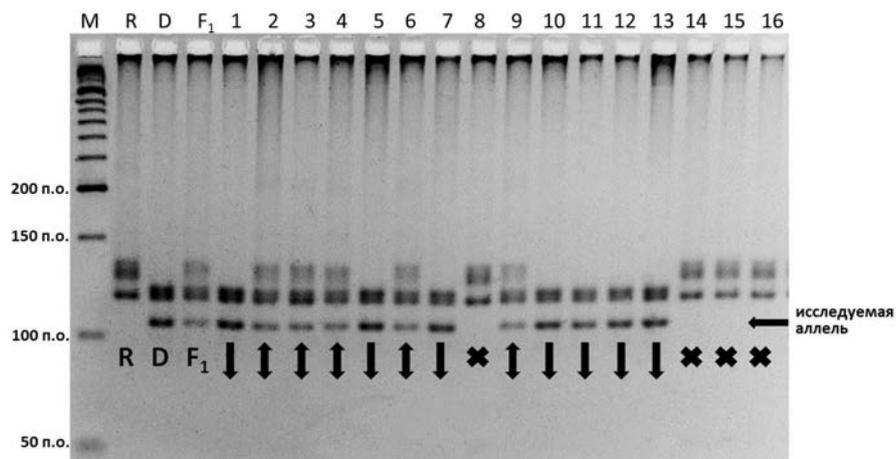


Рисунок 1. Результаты амплификации ДНК беккросс гибридов инд. отбора F₂ BC₄, с использованием ДНК-маркера BNL1604: М – маркер молекулярной массы ДНК, R – родитель реципиент, D – родитель донор, F₁ – гибрид первого поколения, 1–16 генотипы от индивидуального отбора F₂ BC₄, ↓ - для размножения семян, ⇕ – для дальнейшего самоопыления и скрининга, ✖ – удаляемые генотипы.

Таким образом, качество волокна у полученных гибридных растений существенно выше по сравнению с исходным материалом – реципиентом Андижан-35: длина волокна увеличилась на 5.3 %, прочность – на 7.7 %, показатель элонгации – на 20 %. При сопоставлении с сортом Наманган-77, также заметны преимущества наших гибридов по сравнению со стандартом: длина волокна больше на 5,1 %, прочность – на 8.3 %, значение элонгации – на 4,3 % выше, чем у контрольного сорта Наманган-77.

Таким образом, мобилизация новых QTL-регионов из донорных линий в геном реципиента (Андижан-35) при «пирамидировании генов» значительно улучшила параметры длины, прочности и элонгации волокна полученных гибридов BC₄ F₂, не затрагивая и не изменяя при этом другие параметры качества волокна. Более того, результаты статистического анализа подтверждают наличие достоверной ассоциации ДНК-маркеров BNL1604 и BNL3545 с тестируемыми признаками волокна.

ЛИТЕРАТУРА

Abdurakhmonov I.Y., Saha S., Jenkins J.N., Buriev Z.T., Shermatov S.E., Scheffler B.E., Pepper A.E., Yu J.Z., Kohel R.J., Abdugarimov A. Linkage disequilibrium based association mapping of fiber quality traits in *G. hirsutum* L. variety germplasm // *Genetica*. – Berlin, – 2009.

Abdurakhmonov, I.Y., R.J. Kohel, J.Z. Yu, A.E. Pepper, A.A. Abdullaev, F.N. Kushanov, I.B. Salakhutdinov, Z.T. Buriev, S. Saha, B.E. Scheffler, J.N. Jenkins, and A. Abdugarimov. 2008. Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. *Genomics* 98: 478–487.

Guo Wang-Zhen, Zhang Tian-Zhen, ZhuXie-Fei, Pan Jia-Ju (2005): Modified Backcross Pyramiding Breeding with Molecular Marker-Assisted Selection and Its Application in Cotton. – *ActaAgronomicaSinica*. Vol.31, No.8, pp. 963–970.

Abdurakhmonov I.Y., Z.T. Buriev, Sh. E. Shermatov, F.N. Kushanov, A. Makamov, U. Shopulatov, O. Turaev, T. Norov, Ch. Akhmedov, M. Mirzaakhmedov, A. Abdugarimov. Utilization of natural diversity in upland cotton (*G.hirsutum*) germplasm collection for pyramiding genes via marker-assisted selection program // 5th meeting of Asian Cotton Research and Development Network: Proceedings. – Lahore, Pakistan, 2011.

Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**, 122–127.

Reddy O.U.K., Pepper A.E., Abdurakhmonov I.Y., Saha S., Jenkins J.N., Brooks T.D., Bolek Y. and El-Zik K.M. The identification of dinucleotide and trinucleotide microsatellite repeat loci from cotton *G.hirsutum* L, *J. Cotton Sci. (Memphis)*, 2001. – No 5. – pp. 103–113.