

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ГИНОГЕНЕЗА У ЛИНИЙ  
КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Долгополова Романа Витальевича

Научные руководители:

докт. биол. наук

профессор, докт. биол. наук



М.И. Чумаков



С.А. Коннова

30.06.2023

Научный консультант:

канд. биол. наук

Зав. кафедрой:

профессор, докт. биол. наук



Е.М. Моисеева

30.06.2023



С.А. Коннова

30.06.2023

Саратов 2023

**Введение.** Злаки — в силу своего экономического и агрономического значения — занимают важнейшее место в мире среди выращиваемых человеком растений по данным ФАО 2021 года. Злаковые культуры являются источником продовольствия, а продукты питания, произведённые на их основе, основным источником энергии для населения мира.

По данным ФАО 2021 года, кукуруза занимает 2 место среди производимой в мире пищевой продукции. Лидером выступают США, производя около 380 миллионов тонн кукурузы, следом за которыми идёт Китай с 270 миллионами тонн кукурузы.

В Российской Федерации в 2021 году было произведено 15,2 миллиона тонн кукурузы. Она занимает 7 строчку в списке произведённой пищевой продукции, уступая (в порядке убывания массы) пшенице, сахарной свекле, молоку, картофелю, ячменю и семенам подсолнуха. С 2001 года наблюдается тенденция к увеличению уборочной площади и к росту производства кукурузы в РФ.

Из экономической значимости кукурузы в целом и продовольственной — в частности (а также из желания увеличить экономические или другие показатели или достичь, например, целей в области устойчивого развития), следует, что проведение селекционных исследований и работ по выведению сортов кукурузы с заданными свойствами оправдано и востребовано.

В этой связи актуальным для селекционной работы представляется использование линий кукурузы, вызывающих гаплоидию (линии-гаплоиндукторы). Производные от гаплоидов — гомозиготные инбредные линии кукурузы — являются «желательным итогом селекционных программ». Способы и технологии быстрого получения гаплоидов, а также сопряженные цитогенетические процессы, вовлечённые молекулярные механизмы и структуры требуют изучения. Отдельный интерес представляет разработка молекулярных маркеров, в частности на основе SNP (маркеры однонуклеотидного полиморфизма), для быстрого определения потенциала полученных в селекционной работе линий-гаплоиндукторов.

Цель работы настоящей работы состоит в выявлении полиморфизма генов гиногинеза *DMP7*, *CENH3* у линий ЗМС-8, ЗМСП кукурузы саратовской селекции.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Провести попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов *DMP7*, *CENH3* у линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП относительно линии В73 (референсная): ЗМС-8 & В73, ЗМСП & В73.
2. Провести множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов *DMP7*, *CENH3* у линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП относительно линии В73 (референсная): ЗМС-8 & ЗМСП & В73.
3. Найти и отметить замены, инсерции и делеции.
4. Определить полиморфизм генов *DMP7*, *CENH3*.
5. Провести филогенетический анализ генов: *DMP7* линий (В73, ЗМС-8, ЗМСП, САУ-5), *CENH3* линий (В73, ЗМС-8, ЗМСП), *PLA1* линий (В73, ЗМС-8, ЗМСП), *GCS* линий (В73, ЗМСП, ГПЛ-1, КМ) и *CHR106* линий (В73, КМ-А, АТ-3, АТ-4).

Материалом исследования выступили ранее секвенированные нуклеотидные последовательности гена *DMP7* линий (ЗМС-8, ЗМСП, САУ-5), гена *CENH3* линий (ЗМС-8, ЗМСП), гена *PLA1* линий (ЗМС-8, ЗМСП), гена *GCS* линий (ЗМСП, ГПЛ-1, КМ) и гена *CHR106* линий (КМ-А, АТ-3, АТ-4). Нуклеотидные последовательности были предоставлены сотрудниками лаборатории биоинженерии ИБФРМ РАН.

РНК выделяли из завязей и пыльцы кукурузы с использованием реагента «extractRNA» (Евроген, Россия), ДНК выделяли из листьев 14-ти дневных проростков с использованием набора для выделения ДНК «ДНК-экстран» (Синтол, Россия). Участки генов амплифицировали, как описано в работах ранее.

Нуклеотидные последовательности (обратная транскрипция по мРНК) генов *DMP7*, *CENH3*, *PLA1*, *GCS* и *CHR106* референсной линии кукурузы В73 взяты из базы данных NCBI (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Номера

нуклеотидных последовательностей в генбанке: *DMP7* – NM\_001151404.2, *CENH3* – XR\_002748548.2, *PLA1* – XM\_008658300.3, *GCS* – NM\_001320812.1, *CHR106* – NM\_001148367.1.

Для выявления полиморфизма генов гиногенеза у кукурузы проводили попарное и множественное выравнивание, используя программу BLASTN. Филогенетический анализ проводили, используя программу MEGA11 (множественное выравнивание, оценка эволюционных расстояний, построение филогенетических деревьев с применением UPGMA-алгоритма).

**Основное содержание работы.** Попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *DMP7* линий В73 и ЗМС-8 позволило обнаружить и

Попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *DMP7* линий В73 и ЗМСП позволило обнаружить и отметить 5 ОНЗ, а также одну делецию, состоящую из 3-х «выпавших» нуклеотидов.

Попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *CENH3* линий В73 и ЗМС-8 позволило отметить отсутствие ОНЗ и делеций.

Попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *CENH3* линий В73 и ЗМСП позволило обнаружить и отметить 2 ОНЗ.

Из множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *DMP7* линий В73, ЗМСП и ЗМС-8, представленного на рисунке 5, следует, что (несмотря на близкородственность) лишь часть ОНЗ (3) является общей для линий ЗМСП и ЗМС-8, при этом 3-х нуклеотидная делеция отсутствует у линии ЗМС-8.

Из множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *CENH3* линий В73, ЗМС-8 и ЗМСП, представленного на рисунке 5, следует, что линии ЗМС-8 и ЗМСП не имеют общих ОНЗ или делеций.

На основании полученных результатов были составлены таблицы 1 и 2. В таблицах представлены однонуклеотидные замены, инсерции и делеции, выявленные у нуклеотидных последовательностей генов *DMP7* и *CENH3* линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП (относительно соответствующих последовательностей линии В73).

Таблица 1 — Замены, инсерции и делеции гена *DMP7*

Линия (отн. В73)	ОНЗ	Инсерции	Делеции
ЗМС-8	6	0	0
ЗМСП	5	0	1 (из 3-х нуклеотидов)

Таблица 2 — Замены, инсерции и делеции гена *CENH3*

Линия (отн. В73)	ОНЗ	Инсерции	Делеции
ЗМС-8	0	0	0
ЗМСП	2	0	0

*Полиморфизм генов гиногенеза кукурузы у линий саратовской селекции*

При рассмотрении двух или более нуклеотидных последовательностей количество и качество обнаруженных замен, инсерций и делеций могут предоставить основания для предварительных выводов о полиморфизме гена или генов.

У секвенированной нуклеотидной последовательности гена *DMP7* линий ЗМС-8, ЗМСП было выявлено 5-6 ОНЗ и до одной делеции (в зависимости от линии), что может говорить о высокой степени полиморфизма гена *DMP7* среди данных линий кукурузы.

Придерживаясь логики рассуждения выше, мы можем сделать вывод о низкой степени полиморфизма гена *CENH3* среди линий кукурузы ЗМС-8 и ЗМСП.

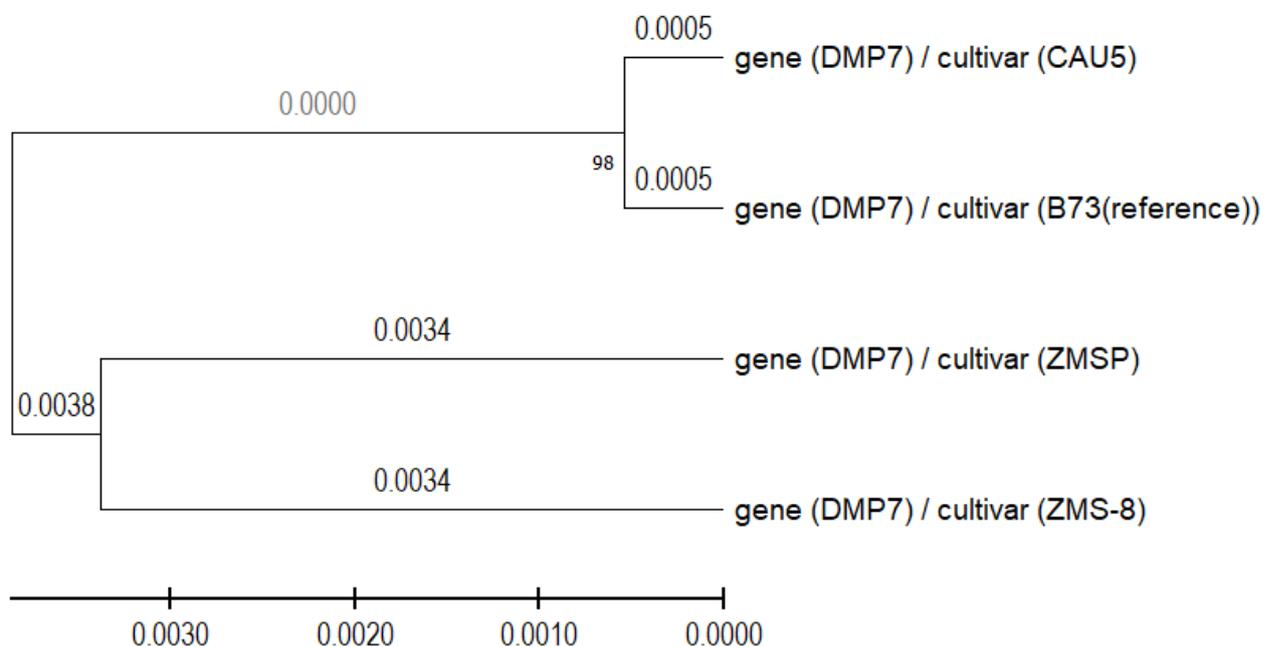
Касаясь вопроса генотипирования линий и гибридов кукурузы, информацию о наличии ОНЗ и/или инсерций-делеций у последовательностей генов *DMP7* и *CENH3* можно использовать, например, при разработке праймеров.

Филогенетический анализ генов *DMP7*, *CENH3*, *PLA1*, *GCS* и *CHR106* проведённый в *MEGA11*.

Приведенные на рисунках 1-5 филогенетические деревья (филлограммы) представляют из себя первичную попытку отобразить эволюционные отношения между линиями с помощью дистанционного метода реконструкции филогении (UPGMA).

Длина ветвей (значение указано над ветвями) и эволюционные расстояния между последовательностями, использованные для построения филогенетического дерева, выражены в одних и тех же единицах; значение бутстрепа указано в целых числах, в процентах.

Реконструированная по нуклеотидным последовательностям гена *DMP7* топология филогенетического дерева (дерево изображено на рисунке 1) не корректно отражает эволюционные отношения между линиями кукурузы ЗМС-8, ЗМСП, В73 и САУ5.

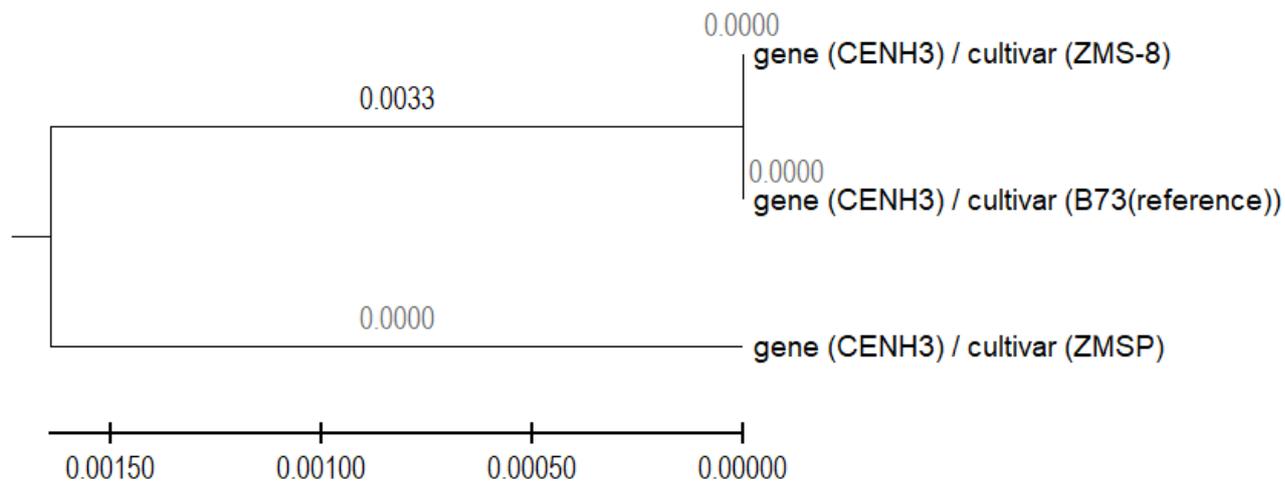


Листья дерева обозначают нуклеотидные последовательности гена *DMP7* линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП, В73 и САУ5

Рисунок 1 — Филогенетическое дерево (филлограмма) гена *DMP7*, построенное в *MEGA11*

Реконструированная по нуклеотидным последовательностям гена *CENH3* топология филогенетического дерева (дерево изображено на рисунке 2) не

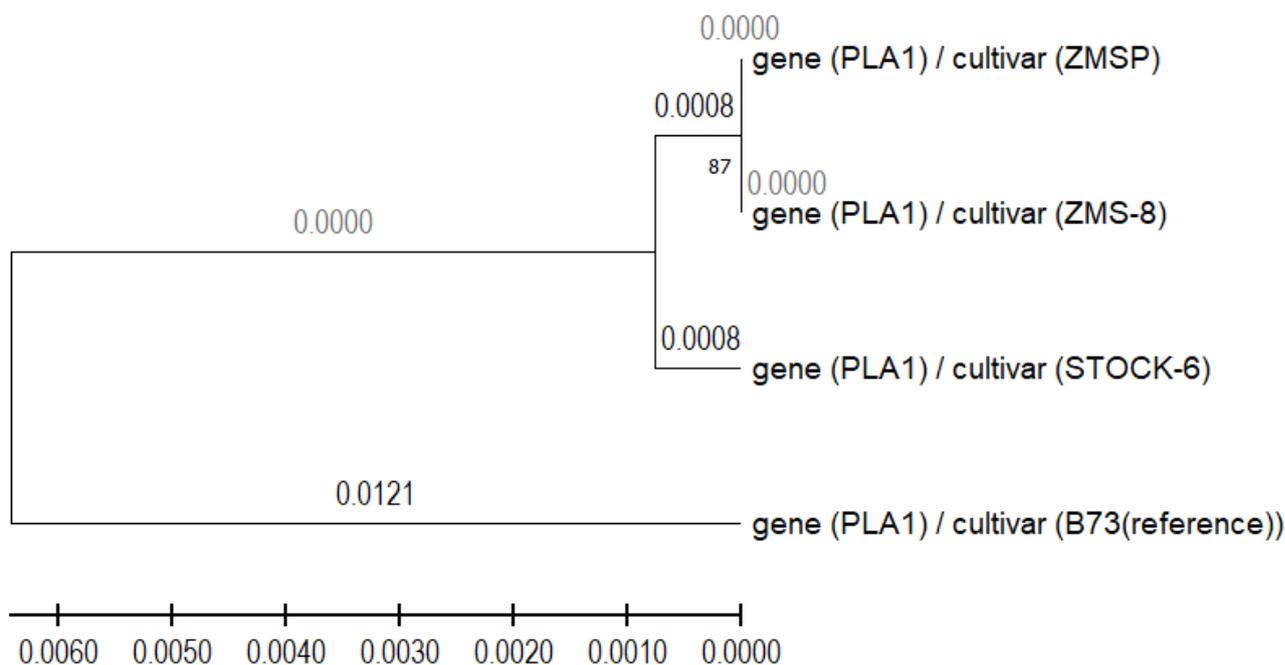
корректно отражает эволюционные отношения между линиями кукурузы ЗМС-8, ЗМСП и В73.



Листья дерева обозначают нуклеотидные последовательности гена *CENH3* линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП и В73

Рисунок 2 — Филогенетическое дерево (филлограмма) гена *CENH3*, построенное в MEGA11

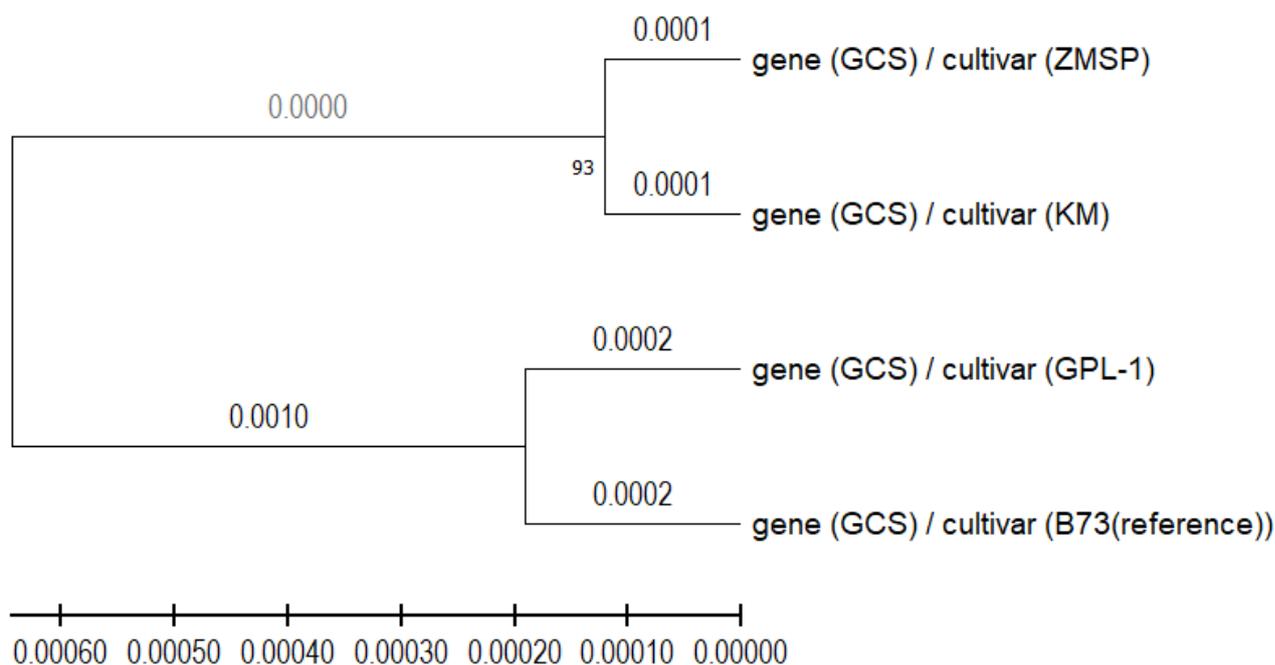
Реконструированная по нуклеотидным последовательностям гена *PLA1* топология филогенетического дерева (дерево изображено на рисунке 3) корректно отражает эволюционные отношения между линиями кукурузы В73, Stock-6, ЗМС-8 и ЗМСП.



Листья дерева обозначают нуклеотидные последовательности гена *PLA1* линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП, Stock-6 и В73

Рисунок 3 — Филогенетическое дерево (филлограмма) гена *PLA1*, построенное в MEGA11

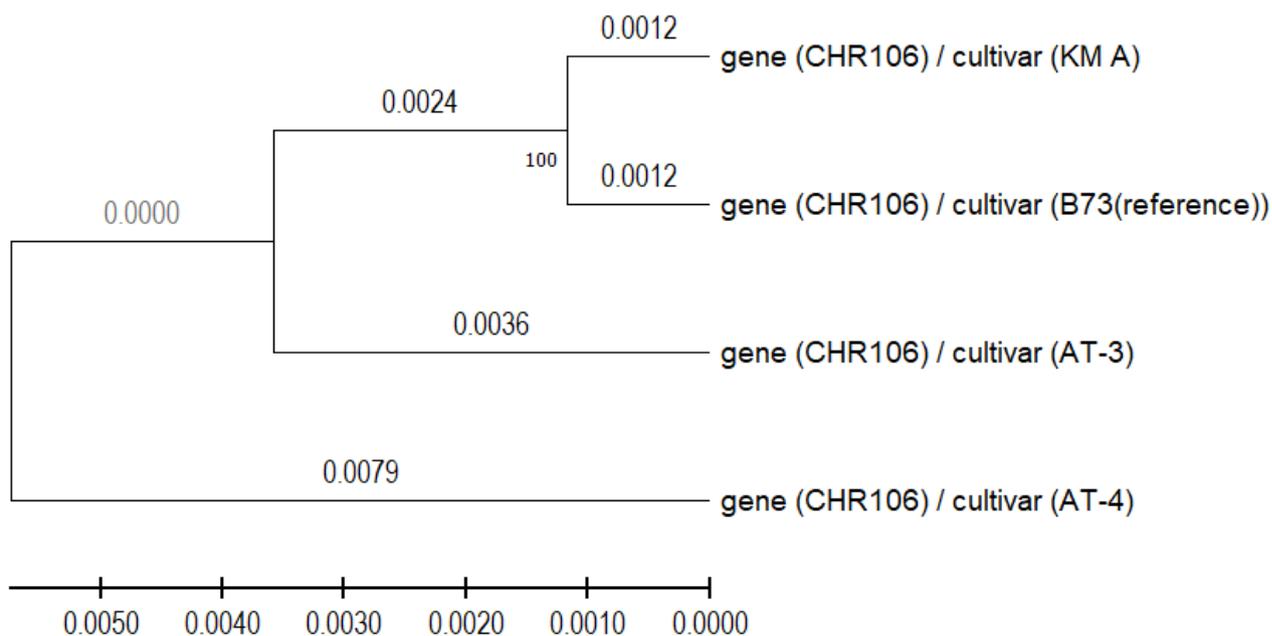
Реконструированная по нуклеотидным последовательностям гена *GCS* топология филогенетического дерева (дерево изображено на рисунке 4) не корректно отражает эволюционные отношения между линиями кукурузы ЗМСП, КМ, ГПЛ-1 и В73.



Листья дерева обозначают нуклеотидные последовательности гена *GCS* линий кукурузы ЗМСП, КМ, GPL-1 и В73

Рисунок 10 — Филогенетическое дерево (филлограмма) гена *GCS*, построенное в MEGA11

Реконструированная по нуклеотидным последовательностям гена *CHR106* топология филогенетического дерева (дерево изображено на рисунке 5) не корректно отражает эволюционные отношения между линиями кукурузы КМ-А, АТ-3, АТ-4 и В73.



Листья дерева обозначают нуклеотидные последовательности гена CHR106 линий кукурузы KM-A, AT-3, AT-4 и B73

Рисунок 5 — Филогенетическое дерево (филлограмма) гена *CHR106*, построенное в MEGA11

Только у одного филогенетического дерева (из 5 построенных) топология верно отражает характер эволюционных отношений между линиями кукурузы.

Важно отметить, что эволюционные отношения, выраженные филогенетическими деревьями на рисунках 1-5, являются результатом предварительного филогенетического анализа и требуют дальнейшего уточнения и проверки с использованием других алгоритмов и методов.

Нехватка данных также оказывает влияние на качество топологии построенных филогенетических деревьев.

**Заключение.** В ходе работы были проведены попарные и множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *DMP7* и *CENH3* линий кукурузы саратовской селекции ЗМС-8, ЗМСП относительно линии B73. Был оценён полиморфизм последовательностей на основании найденных и отмеченных однонуклеотидных замен и делеций. Также был проведён предварительный филогенетический анализ генов *DMP7*, *CENH3*, *PLA1*, *GCS* и *CHR106* различных линий, исходя из данных которого выведены возможные эволюционные отношения между линиями.

Дальнейшие исследования потребуют вовлечения бóльших объёмов данных секвенированных последовательностей.

Результаты, полученные в ходе исследования, могут найти применение при разработке ДНК–маркеров, при выведении линий кукурузы и их систематизации.

