



ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА НЕКОТОРЫХ СОРТОВ TRITICUM AESTIVUM L. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МАРКЕРОВ

И. В. БОБОШИНА,

аспирант,

С. В. БОРНИКОВА,

доктор биологических наук, профессор,

Пермский государственный национальный исследовательский университет

614990, г. Пермь, ул. Букирева, д. 16, к. 226; тел. 89028011179;
e-mail: coccinela@yandex.ru

Положительная рецензия представлена Л. Г. Переведенцевой, доктором биологических наук, профессором (Пермский государственный педагогический университет).

Ключевые слова: *Triticum aestivum L., ISSR-метод, генетический полиморфизм, генетическое разнообразие.*
Keywords: *Triticum aestivum L., ISSR-method, genetic polymorphism, genetic diversity.*

Цель и методика исследований.

В связи с продовольственной проблемой актуально изучение геномов важнейших сельскохозяйственных культур, к числу которых относится пшеница мягкая (*Triticum aestivum L.*). Более трех четвертей населения использует в пищу продукты переработки ее зерна [1]. Как генетический объект пшеница (род *Triticum*) занимает особое положение среди злаков, что обусловлено ее широкой адаптацией в различных эколого-географических регионах мира [2].

На данный момент установлено, что генетические различия между различными организмами наиболее полно представлены на уровне ДНК. С помощью современных молекулярных методов эти различия можно обнаружить и использовать для идентификации отдельных сортов, линий и форм сельскохозяйственных растений. Методы, основанные на использовании ДНК-маркеров, обладают рядом преимуществ по сравнению с другими методами идентификации. Они позволяют в значительно большей степени выявить объективные различия между исследуемыми образцами и, следовательно, существенно повысить разрешающую силу анализа [3]. В качестве маркеров для оценки изменчивости ДНК растительного материала нами были выбраны широко распространенные в геноме повторяющиеся последовательности, обладающие высокой изменчивостью — микросателлиты. ISSR-метод (Inter-Simple Sequence Repeats) [4], или межмикросателлитный анализ, перспективен для изучения полиморфизма ДНК, этот метод позволил выявить высокий уровень генетического разнообразия у различных сельскохозяйственных культур [5, 6, 7, 8].

Для создания ISSR-маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. ISSR-маркеры являются стабильными и дают четко воспроизводимые результаты [9]. Среди полученных полиморфных фрагментов ДНК можно отыскать сцепленные с хозяйственно ценными признаками и разработать на их основе методы селекции, основанные на применении молекулярных маркеров [10].

Целью нашей работы являлся молекулярно-генетический анализ четырех сортов *T. aestivum* на основании полиморфизма ISSR-маркеров.

Сорта *T. aestivum* для изучения генетического полиморфизма были предоставлены ГНУ Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХ (г. Пермь). Для молекулярно-генетического анализа была выделена ДНК из листьев *T. aestivum* по методике Торрес [11], с незначительными модификациями. Нами

проведен молекулярно-генетический анализ четырех сортов *T. aestivum*: Горноуральская, Иргина, Московская 39 и Штру.

После апробации 20 ISSR-праймеров, синтезированных в ЗАО «Синтол» (г. Москва), были отобраны пять наиболее информативных, в результате ПЦР с которыми амплифицировалось максимальное количество четких фрагментов ДНК. Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 25 мкл содержала: 2 единицы Taq-полимеразы, 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР, 25 пМ праймера, 2,5 мМ Mg²⁺, 0,25 мМ dNTP, 5 мкл геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Москва) по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; t отж., 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при 72°C. Температура отжига в зависимости от праймера варьировала от 55 до 60°C. Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров, опыт повторяли не менее двух раз. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7 %-м агарозном геле в 1x TBE буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ-свете в системе гель-документации Gel Doc XR («Bio-Rad», USA). Определение длин фрагментов ДНК проводили с использованием программы «Quantity One» и маркера молекулярного веса (100 bp + 1.5 + 3 Kb DNA Ladder, «ООО-СибЭнзим-М», Москва).

Результаты исследований.

При амплификации проб ДНК сорта Горноуральская выявлено 48 ISSR-фрагментов (табл. 1). Число ампликонов варьировало от 7 (праймер X10) до 12 (праймер M1). У сорта Иргина выявлено 35 ISSR-фрагментов. Число ампликонов варьировало от 6 (праймеры M27, X10) до 9 (праймер M1). При ISSR-маркировании сорта Московская 39 выявлено 43 фрагмента. Число ампликонов варьировало от 6 (праймер X10) до 11 (праймер M3). У сорта Штру выявлено 38 ISSR-фрагментов. Число ампликонов варьировало от 5 (праймер M3) до 10 (праймер M1). Амплифицированные фрагменты ДНК были отнесены к мономорфным, если частота их встречаемости была > 0,95. Фрагменты с меньшей частотой встречаемости были отнесены к полиморфным.

Длины фрагментов у сорта Горноуральская варьировали от 200 пн (праймер X10) до 1130 пн (праймеры M1, M3, M27), у сорта Иргина — от 130 пн (праймер M1)



Таблица 1
Характеристика ISSR-фрагментов четырех сортов *T. aestivum*

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размеры фрагментов, пн	Число фрагментов ДНК			
			Горноуральская	Иргина	Московская 39	Штру
M1	(AC)8CG	130–1130	12 (0,92)	9 (0,89)	10 (0,80)	10 (0,80)
M3	(AC)8CT	130–1130	9 (0,78)	7 (0,43)	11 (0,91)	5 (0,80)
M27	(ga)8c	200–1130	11 (0,91)	6 (1,00)	9 (0,67)	8 (0,88)
X10	(agc)6c	140–800	7 (1,00)	6 (0,33)	6 (0,67)	6 (0,83)
X11	(AGC)6G	270–1130	9 (1,00)	7 (1,00)	7 (1,00)	9 (0,67)
Всего:			48 (0,92)	35 (0,74)	43 (0,81)	38 (0,79)

Примечание: в скобках указаны доли полиморфных фрагментов ДНК.

до 910 пн (праймер M1), у сорта Московская 39 — от 130 (праймеры M1, M3) до 1130 (праймер X11), а у сорта Штру — от 250 (праймер M3) до 920 (праймер M1).

Процент полиморфизма ДНК *T. aestivum*, выявленный ISSR-методом, у сорта Горноуральская составил 91,7 %, у сорта Московская 39 — 81,4 %, у сорта Штру — 78,9 %, у сорта Иргина — 74,3 %.

Сравнительный анализ полиморфизма спектров продуктов амплификации, полученных с праймерами M1, M3, M27, X10 и X11, позволил обнаружить группы фрагментов ДНК, дифференцирующие сорта. Совокупность данных фрагментов может использоваться как для описания генофонда вида, так и для его внутрисортного разнообразия.

Выводы. Рекомендации.

Молекулярно-генетический анализ 4-х сортов *T. aestivum* с 5 ISSR-праймерами показал, что сорт Горноуральская характеризуется более высоким уровнем генетического полиморфизма, чем сорта Иргина, Московская 39 и Штру. Результаты данной работы подтвердили возможность использования ISSR-метода для оценки генетического разнообразия различных сортов пшеницы мягкой. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что полилокусность ISSR-маркеров удобна и оптимальна для выявления межсортных различий.

Выражаем искреннюю благодарность ГНУ Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХ за предоставление сортов пшеницы мягкой, районированных в Пермском крае.

Работа выполнена при частичном финансировании АБЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (номер государственной регистрации темы 01201054037) и проекта Национального исследовательского университета.

Литература

1. Мельникова Н. В. Мировое разнообразие твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) по аллелям глиадинкодирующих локусов : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 24 с.
2. Салина Е. А. Структура и эволюция геномов полиплоидных пшениц и их дикорастущих сородичей: исследование с использованием макро- и микросателлитов : дис. ... докт. биол. наук. Новосибирск, 2006. 331 с.
3. Малышев С. В. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров : метод. реком. Минск, 2006. 27 с.
4. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. 1994. V. 20. P. 176–183.
5. Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers // *Theor Appl Genet*. 1997. № 94. P. 597–602.
6. Liu L. W., Zhao L. P., Gong Y. Q., Wang M. X., Chen L. M., Yang J. L., Wang Y., Yu F. M., Wang L. Z. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers // *Sci. Hortic*. 2008. № 116. P. 240–247.
7. Chen Y. Y., Zhou R. C., Lin X. D., Wu K. Q., Qian X., Huang S. Z. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars // *Aquat. Bot*. 2008. № 89. P. 311–316.
8. Behera T. K., Singh A. K., Staub J. E. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter melon (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies // *Sci. Hortic*. 2008. № 115. P. 209–217.
9. Zhu Y., Hu J., Han R., Wang Y., Zhu S. Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers // *Australian journal of crop science*. 2011. AJCS 5 (7). P. 846–850.
10. Артюхова А. В., Гришин С. Ю., Князькина М. С., Лукашевич М. И., Заякин В. В., Нам И. Я. Разработка метода паспортизации сортов люпина // *Вестник Брянского государственного университета*. 2010. 4. С. 81–84.
11. Torres A. M., Weeden N. F., Martin A. Linkage among sozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // *Theor Appl Genet*. 1993. V. 5. P. 937–945.