

УДК 577.2:631:581.115:542.1

Куц О. О.¹, Чеботар С. В.¹, канд. біол. наук, зам. директора,
Сиволап Ю. М.¹, докт. біол. наук, директор,
Тоцький В. М.², докт. біол. наук, проф., зав. каф.

¹ Южний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,

² Одеський державний університет, кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ *TRITICUM AESTIVUM* L., ВИЗНАЧЕНИЙ ШЛЯХОМ INTER-SSR ПЛР

Проведено молекулярно-генетичний аналіз 27 сортів м'якої пшениці за допомогою inter-SSR ПЛР. Ампліфікація з 9 ISSR-праймерами дозволила визначити 75 фрагментів ДНК, з яких 38 поліморфні. Даних, отриманих за inter-SSR аналізом, достатньо для диференціації досліджуваної групи сортів.

Ключові слова: пшениця, молекулярно-генетичні маркери, inter-SSR ПЛР.

Сучасні технології, що базуються на аналізі поліморфізму ДНК, широко впроваджуються в практику рослинництва для диференціації й ідентифікації сортів практично всіх видів сільськогосподарських рослин. Особливо велику увагу приділяють методам визначення об'єкт-специфічних ділянок ДНК другого покоління: SSRP, AFLP, inter-SSR аналізу.

Техніка inter-SSR полімеразної ланцюгової реакції (або заякореної ПЛР) вперше описана Zeitkiewicz et al. [8]. В якості праймерів вона оперує олігонуклеотидами, комплементарними коротким мікросателітним послідовностям, що мають додатковий нуклеотид на 5' або 3' кінцях, наприклад $(GT)_nT$ чи $(GAA)_nA$ [4].

Такий підхід має хорошу відтворюваність, дозволяє одержувати інформацію за декількома локусами геному одночасно і забезпечує високий рівень дискримінаційної здатності. Успадковування фрагментів ампліфікації, одержуваних в результаті inter-SSR ПЛР, узгоджується із законами Менделя. Амплікони можуть вести себе як домінантні [6] або, рідше, як кодомінантні маркери [7].

На думку Ratnaparkhe et al. [4], inter-SSR ПЛР дозволяє подолати деякі труднощі, що виникають при використанні таких методів, як RAPD та SSRP, а також технічні обмеження, властиві RFLP-аналізу (restriction fragment length polymorphism): дороговизну й складнощі при розробці SSR-маркерів, обмеження в відтворюваності результатів RAPD-методу різними лабораторіями та інше.

Досліджували потенціал inter-SSR ПЛР для розв'язання задач ідентифікації та диференціації сортів м'якої пшениці.

Матеріали і методи

За допомогою дев'яти inter-SSR праймерів досліджувались 27 сортів і ліній м'якої пшениці різного еколого-географічного походження. Дані про сорти і використані праймери представлені в табл. 1 і 2. ДНК виділяли за Сиволапом та ін. [3].

Для ампліфікації застосували прилад "Терцик" (багатоканальний ампліфіка-

тор ДНК MC2). Реакційна суміш для проведення ISSR ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 50 мМ KCl, 20 мМ трис-НСІ-буфера рН8.4 при 25 °С, 2—5 мМ MgCl₂, 0,01% Tween 20, по 0,2 мМ кожного нуклеотиду, 0,2 мкМ праймера, 20 нг ДНК і 1 од. Таг-полімерази. На реакційний розчин нашаровували 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію з ISSR-праймерами провадили у такому режимі: перша денатурація при 93 °С — 1 хв. 30 сек., потім 30 циклів — 55—58 °С — 20 сек., 70 °С — 20 сек., 93 °С — 20 сек., останній цикл — 70 °С протягом 1 хв. 30 сек. Температура відпау для праймерів, що містять у своїй послідовності повтор 2-х нуклеотидів, була 55 °С, а у випадку 3-х нуклеотидів — 58 °С. Електрофорез продуктів ампліфікації ДНК провадили в однократному ТВЕ-буфері (0,045 М трис-борат і 10 мМ ЭДТА, рН 8.0) в 2% агарозному гелі (довжина розгону — 10 см) при 100—120 В протягом 2,5 годин.

Таблиця 1

Сорти й лінії *Triticum aestivum*, що досліджувались

№ п/п, назва сорту	Країна	Родослів
1. Тр 114/65	Англія	CJ 126 33 / Capelle Desprez / Chinese 166 / Capelle Desprez/3/Capelle Desprez
2. Sivka	Югославія	Tr. timopheevi / San Pastore/Безостая I
3. Weihenstephan M1	Німеччина	Koda/Lichtifruh2/Schwarzer persischer (Tr. comactum)
4. Diakovchanka	Югославія	Zg 687/61 x Tr.timopheevi/Abodanca
5. Mv 06-88	Угорщина	YT 13 A305 x Mv 5/Zg 4431
6. Mv 17	Угорщина	Slavia/Mv T. F/ Zg 4431
7. Roazon	Франція	(Ae. ventricosa / Tr. persicum) / Marne / Moisson
8. Fakir	Німеччина	Tr. aestivum x Tr. cartlicum
9. Carsten V	Німеччина	Carsten III / Dickopf / Dickopf / Crieveker 104
10. Salzmunde Bartwezen 14/44	Німеччина	Salzmunder 14 = 44 = wheat / rye hybrid (1B / 1R Subst. line)
11. Mv 03-89	Угорщина	Mv 8 / Winnipeg 236
12. Калоян	Болгарія	Snem / Аврора / Русалка
13. Arthur	США	Stadler / Redcoat
14. Purdue Abe	США	Arthur*413 / Purdue 60228 A-15-9-2/2/Riley* 2/Riley 67
15. Michigan Amber	США	Red May=Flint=sel. Red Lammas or Yellow Lammas
16. Arthur 71	США	Arthur x 5/3/Purdue 6028 A2-15-9-2/2/Riley 67 sibx / Riley67
17. Marquis	Канада	Red Fele / Hard / Red Calcuta
18. Wisconsin 245 (C112633)	США	(CJ 126 33)Illinois/ /Chinese/ 3 Tr. timopheevi
19. Hope	США	Кnapli (Tr.diccocum)/Marquis
20. Одеська напівкарликова	Україна	Краснодарськ. карлик n1 x Од51
21. Обрій	Україна	Ред Ривер 68 x Од 51
22. Одеська червоноколоса 1	Україна	[Од 75 x Purdue 4930 x Чайка] Запоріз. ост.
23. Одеська червоноколоса 2	Україна	[Од 75 x Purdue 4930 x Чайка] Запоріз. ост.

Продовження таблиці 1

№ п/п, назва сорту	Країна	Родослів
24. Альбатрос одеський	Україна	(М 57 – 74 × Маяк) × Промінь
25. Українка одеська	Україна	Ю Альбатрос Од.
26. Безоста 1	Росія	Відб. з Безостої 4 (Лютесценс 17 × Скоро-спілка 2)
27. Миронівська 808	Україна	Відб. з Артемівки *

Примітка: * — при трьохкратному висіванні в пізньосінні строки (1950—1952 рр.) ярової пшениці Артемівка одержані озимі форми. Шляхом багатократного групового відбору морфологічно однорідних рослин і масового відбору на продуктивність та інші цінні в господарському відношенні властивості з зазначених матеріалів після суворої зими 1955—1956 рр. виділена родина, на основі якої створений сорт Миронівська 808 (Цит. за С. В. Рабинович [1]).

Таблиця 2

ISSR-праймери, що використані для виявлення молекулярно-генетичного поліморфізму в сортах м'якої пшениці

№	Нуклеотидна послідовність	Кількість генотипів	Кількість фрагментів ампліфікації	Кількість поліморфних фрагментів	Поліморфізм, %
1.	(TCG) ₆ G	27	3	1	33.3
2.	(CTC) ₆ G	27	11	7	63.6
3.	(AGC) ₆ C	27	5	2	40.0
4.	(GA) ₉ C	27	16	8	50.0
5.	(TG) ₉ C	27	8	4	50.0
6.	(AC) ₉ C	27	8	3	37.5
7.	(CTC) ₆ A	27	9	6	66.7
8.	(AC) ₉ G	27	7	3	42.9
9.	(ACC) ₆ G	27	8	4	50.0
РАЗОМ:			75	38	48.2

Результати електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації в агарозному гелі фарбували бромистим етидієм і фотографували в ультрафіолетовому світлі на плівку Мікрат-300.

Дані inter-SSR аналізу представляли у бінарній системі — присутність/відсутність (1/0) фрагментів ампліфікації — та вносили в матрицю. Для визначення генетичних дистанцій по даних щодо поліморфізму продуктів полімеразної ланцюгової реакції використовували алгоритм Джаккарда [5]. Кластерний аналіз генетичних дистанцій здійснювали незваженим парно-груповим методом з арифметичним усередненням (метод UPGMA). Для проведення зазначених розрахунків і побудови дендрограм використали програму "Trees" [1].

Результати та обговорення результатів

Ампліфікація з ISSR-праймерами дозволяє тестувати мінливість за рядом диспергованих у геномі локусів. В результаті inter-SSR аналізу визначено 75 фраг-

ментів ампліфікації ДНК, з яких 38 поліморфні. У залежності від своєї природи ISSR-праймери дали можливість отримувати на електрофореграмах від 3 до 16 фрагментів ампліфікації ДНК. В середньому один inter-SSR праймер виявляє 8,3 фрагментів ампліфікації ДНК, з яких 4,2 поліморфні. Рівень поліморфізму, що його виявляють за допомогою inter-SSR ПЛП, співставний з таким, що визначається за допомогою RAPD ПЛП. Більш жорсткі умови реакції (збільшення довжини праймера і більш висока температура відпалу порівняно з RAPD ПЛП) сприяють більшій відтворюваності спектрів фрагментів ампліфікації ДНК при ISSR-аналізі. Потенційна інформативність такого ПЛП-аналізу може бути значно більшою внаслідок того, що замість довільної послідовності праймер пізнає дисперговані у геномі послідовності-повтори, яких дуже багато в усіх еукаріотичних геномах.

Оцінку дискримінаційної спроможності (PIC — polymorphism information contents) аналізованих під час inter-SSR ПЛП локусів провадили згідно алгоритму $PIC = 2f(1 - f)$ для бінарних даних, де f — частота фрагмента ампліфікації (тобто алеля), а $(1 - f)$ — частота нуль-алеля. PIC характеризує дискримінаційну силу локуса за кількістю та відносною частотою стрівальності виявлених алелів. Значення PIC для індивідуальних inter-SSR маркерів коливалось від 0,15 до 0,37. Середнє значення PIC для inter-SSR у наших дослідженнях складало 0,27, що порівняно з аналогічними значеннями, розрахованими за даними SSR-аналізу (PIC = 0,59) і RAPD-аналізу (PIC = 0,32), було нижчим.

Дендрограма (рис. 1), побудована на основі ISSR аналізу, свідчить про те, що одержаної інформації достатньо для диференціації досліджуваної групи сортів. Розподіл сортів на дендрограмі добре відповідає існуючим даним. Так, сорти Альбатрос одеський і Українка одеська об'єднані на дендрограмі в один субкластер і мають найменшу генетичну відстань між собою серед досліджуваної групи сортів. Це узгоджується з тим, що сорт Українка одеська створений методом індивідуального добору з сорту Альбатрос одеський. Орієнтиром тут також можуть слугувати дві лінії сорту Одеська червоноколоса, які об'єднані в субкластер з мінімальною генетичною відстанню.

Незважаючи на те, що в селекційних програмах по створенню сортів Sivka (Югославія) і Diakovchanka (Югославія) використовувався геном *Triticum timopheevii*, на нашій дендрограмі ці сорти належать до різних субкластерів, бо генетичні віддалі між ними значні. Подібний розподіл сортів на дендрограмі може свідчити про те, що вид *Triticum timopheevii* дав різний (нерівнозначний) внесок у генотипи сортів Sivka і Diakovchanka.

Нейтральність мінливості спектру ампліконів при використанні ISSR-маркерів і відносно рівномірний розподіл ISSR-локусів по геному сприяють об'єктивній оцінці генетичних взаємовідносин між генотипами.

В результаті проведеної роботи можна констатувати, що inter-SSR — аналіз із використанням дев'яти праймерів виявився достатньо ефективним для повної диференціації 27 сортів і ліній м'якої пшениці, в тому числі генетично близьких форм — 2-х ліній сорту Одеська червоноколоса. При цьому виявляються мультилокусні маркерні спектри ампліконів, які стабільно відтворюються при дослідженнях одних і тих же генотипів.

Використання ISSR-аналізу може бути рекомендоване для диференціації та ідентифікації сортів такої важливої сільськогосподарської культури, як пшениця.

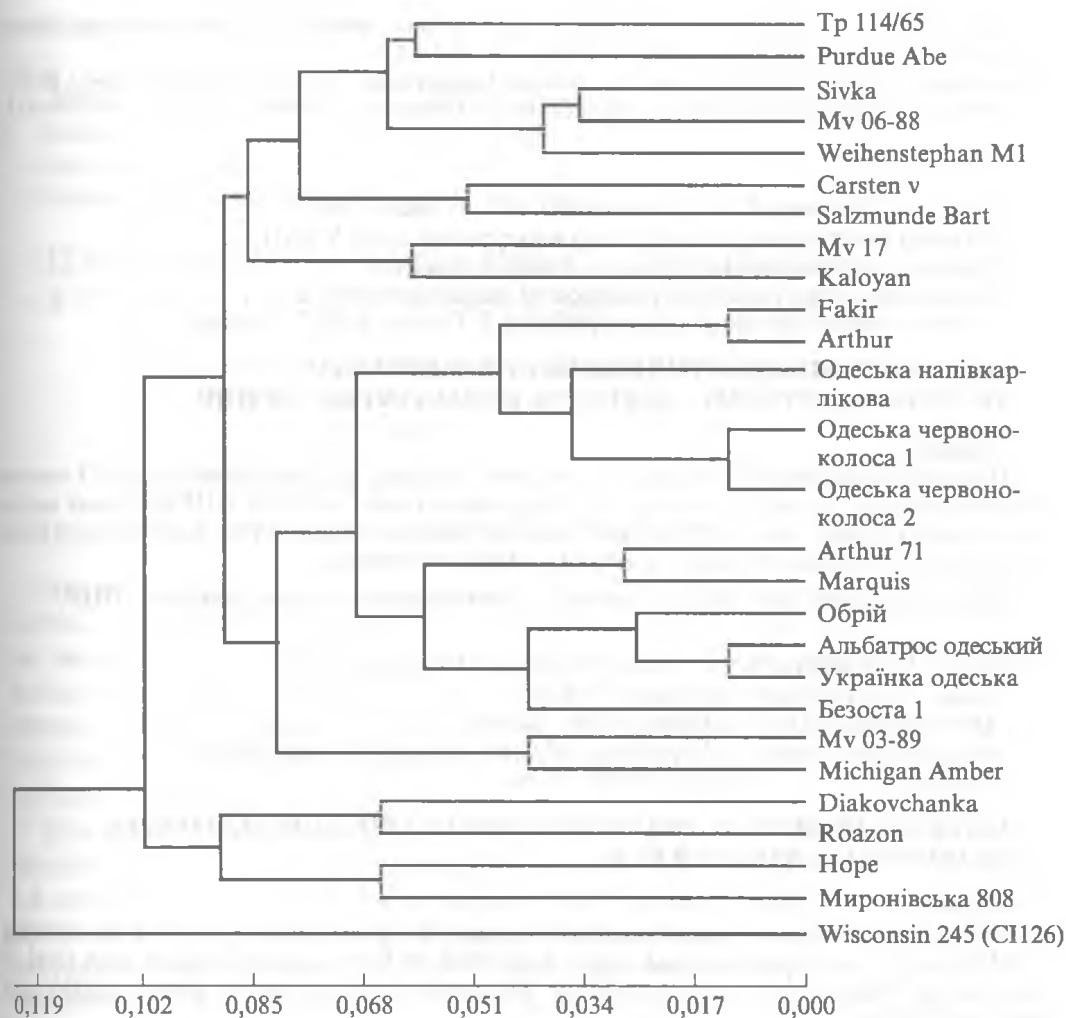


Рис. 1. Дендрограма розподілу сортів *T. aestivum* згідно генетичним дистанціям, розрахованим за даними inter-SSR аналізу з використанням алгоритму Джаккарда [5].

Література

1. Календарь Р. Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофоретических картинок ДНК и белков // Материалы конференции "Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений" (10—13 мая 1994). — К., 1994. — С. 25—26.
2. Рабинович С. В. Современные сорта пшеницы и их родословные. — К.: Урожай, 1972. — 328 с.
3. Сиволап Ю. М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научно-методическое руководство). — К.: Аграрная наука, 1998. — 156 с.
4. Ratnaparkhe M. B., Tekeoglu M., Muehlbauer F. J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters // Theor Appl Genet. — 1998. — V. 97. — P. 515—519.
5. Sneath P. H., Sockal R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. — San Francisco: W. H. Freeman, 1973.
6. Tsumura Y., Ohba K., Strauss S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) // Theor Appl Genet. — 1996. — V. 92. — P. 40—45.

7. Wu K-S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P. A. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — V. 22. — P. 3257—3258.
8. 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.

Куц Е. А.¹, Чеботарь С. В.¹, Сиволап Ю. М.¹, Тоцкий В. Н.²

¹ Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Овидиопольская дорога 3, Одесса, 65036, Украина

² Одесский государственный университет, кафедра генетики
та молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ *TRITICUM AESTIVUM* L., ДЕТЕКТИРУЕМЫЙ INTER-SSR ПЦР

Резюме

Полиморфные inter-SSR маркеры были использованы для дифференциации 27 сортов мягкой пшеницы различных эколого-географических зон. Inter SSR ПЦР обладает высокой дискриминационной способностью и высокой воспроизводимостью. Метод может быть использован для решения задач генетики и селекции пшеницы.

Ключевые слова: пшеница, молекулярно-генетические маркеры, inter SSR ПЦР.

Kuts E. A.¹, Chebotar S. V.¹, Sivolap Yu. M.¹, and Totskiy V. N.²

¹ South Plant Biotechnology Center UAAS,
Ovidiopolskaya Dor. 3, Odessa, 65036 Ukraine

² Odessa State University, Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

MOLECULAR-GENETIC POLYMORPHISM IN *TRITICUM AESTIVUM* L. DETECTED BY INTER SSR PCR

Summary

Polymorphic molecular-genetic markers were used for discrimination of 27 wheat cultivars of different ecological-geographical origin. Inter SSR PCR has proven to have high level of cultivars differentiation and reproducibility. The method can be used in genetic studies and breeding of wheat.

Key words: common wheat, molecular-genetic markers, inter SSR PCR.