

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-PCR МАРКЕРОВ

Л.Д. ВДОВИЧЕНКО, В.И. ГЛАЗКО

У пяти сортов пшеницы (Флора, Левада, Ятрань 60, Киевская остистая, Мироновская 30) провели сравнительный анализ полиморфизма ISSR-PCR маркеров с использованием в качестве праймеров различных мотивов микросателлитных локусов. Обсуждаются особенности подбора наиболее удобных праймеров для идентификации и генетической паспортизации этих сортов.

Ключевые слова: генетическая паспортизация сортов пшеницы, молекулярно-генетические маркеры, продукты амплификации фрагментов ДНК, полимеразная цепная реакция (PCR), инвертированные повторы микросателлитов, ISSR-PCR маркеры.

Применение молекулярно-генетических маркеров нового поколения, в частности микросателлитных локусов или фланкированных ими фрагментов ДНК, позволяет получать полилокусные высокополиморфные спектры продуктов амплификации. В то же время каждый тип маркеров имеет свои особенности, которые необходимо учитывать при выборе наиболее надежных и простых методов генетической паспортизации сортов разных видов культурных растений.

Обнаружено, например, что у пшеницы микросателлитные локусы существенно отличаются друг от друга по частоте спонтанного мутирования: в среднем по десяти динуклеотидным микросателлитным локусам она достигала значений $2,4 \times 10^{-14}$ мутаций на аллель на одно поколение (1), по 15 три-нуклеотидным микросателлитным локусам у *Cicer arietinum* L. — $3,9 \times 10^{-13}$ (2). Более того, по 27 микросателлитным локусам у группы сортов пшеницы при анализе образцов, собранных повторно через 40-50 лет в тех же четырех географических областях Европы и Азии, оказалось, что за это время $\frac{1}{3}$ аллелей сменилась на новые ($\frac{2}{3}$ аллелей сохранились, общее число аллелей и степень их полиморфизма изменились незначительно) (4). Такой поток генетической изменчивости авторы работы связывают с адаптацией сортов гексаплоидной пшеницы к современным методам ведения сельского хозяйства (4).

Иными словами, поскольку у растений, в частности у пшеницы, наблюдается высокая частота спонтанного мутирования по микросателлитным локусам и возникающие аллели вовлекаются в процессы адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, высокий уровень полиморфизма этих локусов, который считается их преимуществом по сравнению с «классическими» молекулярно-генетическими маркерами, может стать причиной ошибок при оценке сортоспецифичности генотипов или изучении генеалогии сортов. Кроме того, использование оценок полиморфизма микросателлитных локусов позволяет контролировать в одной полимеразной цепной реакции не больше одного-двух локусов и требует использования полиакриламидных секвенирующих гелей для оценки межаллельных различий по двум-трем нуклеотидам.

Преимуществом ISSR-PCR маркеров (Inter Simple Sequence Repeats) — фрагментов ДНК, фланкированных микросателлитными локусами, при описании генофондов сортов разных видов культурных растений является полилокусность, то есть наличие большого количества продуктов амплификации (ампликонов), полученных в полимеразной цепной реакции, и исключение процедуры секвенирования в полиакриламидных гелях. К трудностям при использовании метода и интерпретации результатов следует отнести чувствительность к условиям проведения реакции амплификации, а также доминантный характер присутствия ампликона, что не позволяет различать гетеро- и гомозиготы. Кроме того, имеются данные об эффекте реамплификации — увеличении числа ампликонов (зон) вследствие повторной амплификации (3): изменив из всех условий реакции только температуру отжига, по пяти из 21 микросателлитного локуса получили дополнительные ампликоны. То есть для широкого применения ISSR-PCR маркеров необходимы предварительные исследования особенностей каждой микросателлитной последовательности, используемой в качестве праймера.

Целью нашей работы была оценка эффективности ISSR-PCR маркеров при паспортизации сортов пшеницы, в связи с чем сравнивались спектры продуктов амплификации при использовании фрагментов четырех микросателлитных локусов (с различной нуклеотидной последовательностью у разных сортов пшеницы) в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Методика. Объектами исследования служили сорта пшеницы Левада, Флора, полученные от д.с.-х.н. В.Н. Тищенко (Полтавская государственная аграрная академия, Украина), а также Киевская остистая, Ятрань 60 и Мироновская 30, любезно предоставленные д.б.н. Л.А. Лесневич (Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев).

Проростки получали, выдерживая замоченные на фильтровальной бумаге семена при температуре 25 °С в течение 3-4 сут при постоянном увлажнении. Отделенные проростки растирали индивидуально в стеклянной ступке, полученную массу переносили в эппендорфы, заливали 500 мкл лизирующего буфера (СТАБ) и инкубировали 1 ч при температуре 55-56 °С. К образцу добавляли равный объем (500 мкл) хлороформа с изопентанолом (480 мкл хлороформа и 20 мкл изопентанола, или 24:1), перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 5 мин (9000-10000 об/мин). Водную фазу перено-

сили в пробирки с 500 мкл охлажденного изопропанола (4 °С), перемешивали, центрифугировали, к осадку добавляли 1 мл 70 % этанола. После тщательного перемешивания на вортексе центрифугировали, осадок заливали 500 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,1 М ЭДТА, рН 8,0) и оставляли в термостате на 1 ч при температуре 55 °С, затем на ночь при температуре 37 °С до полного растворения ДНК. Для получения продуктов амплификации использовали ДНК от двух-пяти проростков.

Конечный объем реакционной смеси образца для ПЦР составлял 10 мкл: Н₂О — 3,9; буфер — 2; dNTP — 1; праймер — 0,4; Taq-полимераза — 0,1; ДНК — 2 и MgCl₂ — 0,6 мкл. В качестве праймеров использовали следующие фрагменты микросателлитных локусов: (АС)9Т, (ТG)9А, (АGС)6Т и (ТGС)6А (в скобках приведен коровый мотив микросателлита, цифра — число его повторов, далее указан «якорный» нуклеотид). Исходный раствор праймеров разводили деионизированной Н₂О до 50 мкл. Реакцию проводили на амплификаторе «MasterCycler Gradient» («Eppendorf», Германия) в следующем режиме: начальная денатурация 2 мин при 94 °С; далее 33 цикла: 30 с при 94 °С, 30 с при 55-58 °С (в зависимости от праймера), 2 мин при 72 °С; терминальная элонгация в течение 10 мин. Продукты амплификации (5 мкл реакционной смеси) разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле в однократном ТБЕ-буфере при 10 мА и 30 В в течение 5 ч. Полиморфизм спектров и присутствие отдельных ампликонов оценивали визуально по свечению зон ДНК.

Продукт амплификации рассматривали как маркер соответствующего локуса в геномной ДНК с доминантным типом наследования. Его наличие учитывали как гомо- или гетерозиготу по доминантному аллелю, отсутствие — как гомозиготу по рецессивному.

Результаты. В полученных нами спектрах продукты амплификации разделялись на ампликоны, которые стабильно синтезировались при повторных проведениях ПЦР с одним и тем же образцом выделенной ДНК, и более лабильные. Для того чтобы надежно отнести ампликон к достаточно воспроизводимому, необходимо не менее чем 3-кратное повторение процедуры амплификации ДНК, выделенной из одного и того же источника, поскольку зависимость воспроизводимости амплификации ДНК-фрагмента от условий ПЦР может стать причиной ошибочных заключений о полиморфизме.

При применении в качестве праймеров последовательностей (ТG)9А и (ТGС)6А не удалось получить продукты амплификации. Можно предположить, что в геномах проанализированных сортов микросателлиты с повторами ТG в коровом мотиве относительно редки либо расстояние между инвертированными повторами слишком велико для амплификации в использованном режиме ПЦР (более 2000 п.н.). В целом это согласуется с данными о наименьшем полиморфизме микросателлитов с этим повтором среди 26 микросателлитных локусов у 998 образцов сортов гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* L. (5).

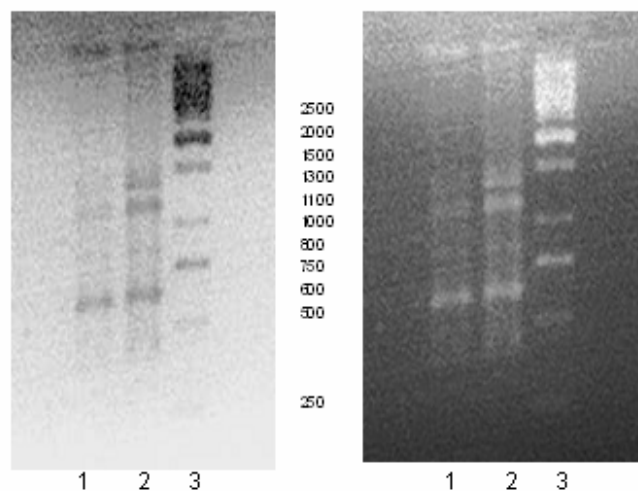


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ISSR-PCR маркеров ДНК пшеницы сортов Флора и Левада (дорожки соответственно 1 и 2), полученных с использованием праймера (АС)9Т. Слева — негатив, справа — позитив; дорожка 3 — маркер молекулярной массы (250-2500 — соответствующие значения молекулярной массы фрагмента, кДа).

В случае последовательности (АС)9Т у сортов Флора и Левада получили десять продуктов амплификации с длиной фрагментов ДНК от 500 п.н. до 2000 п.н., в частности два фрагмента имели размер 1300 и 1100 п.н. (рис. 1).

В спектрах у этих сортов отсутствовали зоны ампликонов с размером 900 и 700 п.н., а также больше 2000 п.н., которые имелись у сортов Киевская остистая, Ятрань 60 и Мироновская 30 (рис. 2). Вероятно, полиморфизм ISSR-PCR маркеров позволяет выявлять фрагменты ДНК, фланкированные сортоспецифичными микросателлитными локусами. Интересно, что микросателлиты с повтором (АG)n у разных сортов пшеницы наиболее полиморфны (5).

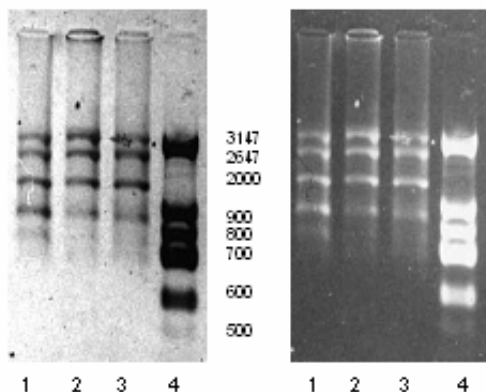


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ISSR-PCR маркеров ДНК пшеницы сортов Киевская остистая, Ятрань 60, Мироновская 30 (дорожки соответственно 1, 2 и 3), полученных с использованием праймера (AC)9T. Слева — негатив, справа — позитив; дорожка 4 — маркер молекулярной массы (500-3147 — соответствующие значения молекулярной массы фрагмента, кДа).

Иными словами, с консервативностью/изменчивостью микросателлитных локусов, имеющих определенную нуклеотидную последовательность, связана эффективность их использования в качестве праймеров при амплификации геномной ДНК. Причины этого совпадения недостаточно ясны, поскольку полиморфизм микросателлитных локусов обусловлен внутрислокусной изменчивостью по числу повторов, а успешность участка такого локуса как праймера при ПЦР-амплификации фланкированной его инвертированным повтором ДНК (ISSR-PCR маркеров) определяется прежде всего числом фланкированных фрагментов с расстоянием между флангами не более 3500 п.н., то есть доступных для амплификации по стандартному для выявления ISSR-PCR маркеров протоколу ПЦР.

Использование в качестве праймера последовательности (AGC)6T позволило выявить у сортов Киевская остистая, Ятрань 60 и Мироновская 30 по десять, а у сортов Флора и Левада — по пять ампликонов (рис. 3).

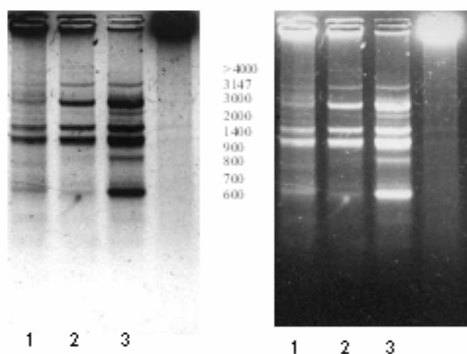


Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ISSR-PCR маркеров ДНК пшеницы сортов Киевская остистая, Ятрань 60 и Мироновская 30 (дорожки соответственно 1, 2 и 3), полученных с использованием праймера (AGC)6T. Слева — негатив, справа — позитив; дорожка 3 — маркер молекулярной массы (500-3147 — соответствующие значения молекулярной массы, кДа).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что использование праймера (AC)9T позволяет получать воспроизводимые результаты у всех изученных сортов. При этом выявляются фрагменты ДНК, фланкированные микросателлитными локусами, продукты амплификации которых обнаруживали у сортов во всех условиях амплификации. Праймер (AGC)6T, как оказалось, больше подходит для сортов Киевская остистая, Ятрань 60 и Мироновская 30 (получено по десять ампликонов для каждого); вследствие выраженной разницы в размере синтезируемых ампликонов при использовании этой последовательности как праймера формируемые спектры удобны для анализа и выявления сортоспецифических особенностей. С праймерами (TG)9A и (TGC)6A получить продукты амплификации не удалось. Применение ISSR-PCR маркеров для молекулярно-генетической паспортизации сортов пшеницы требует предварительного подбора праймеров. Он должен включать анализ возможности получения продуктов амплификации с использованием в качестве праймера фрагмента соответствующего микросателлитного локуса; оценку воспроизводимости спектров ампликонов (присутствие/отсутствие продуктов амплификации); выявление продуктов амплификации, присутствие которых позволяет надежно и воспроизводимо различать сорта в анализируемой группе.

1. Thuillet A.-C., Bru D., David J. e.a. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp. *durum* desf. Mol. Biol. Evol., 2002, 19, 1: 122-125.
2. Udupa S.M., Baum M. High mutation rate and mutational bias at (TAA)_n microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L). Mol. Genet. Genomics, 2001, 265: 1097-1103.
3. Wiesner I., Wiesnerova D. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns. Cell. & mol. biol. letters, 2003, 8: 743-748.
4. Khlestkina E.K., Huang X.Q., Quenum F. J.-B. e.a. Genetic diversity in cultivated plants — loss or stability? Theor. Appl. Genet., 2004, 108: 1466-1472.
5. Huang X.Q., Börner A., Röder M.S. e.a. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet., 2002, 105: 699-707.

Институт агроэкологии и биотехнологии УААН,
252143 г. Киев, ул. Метрологическая, 12,
e-mail: vglazko@yahoo.com

Поступила в редакцию
10 апреля 2006 года

ISSR-PCR MARKERS IN WHEAT VARIETY PASSPORTIZATION

L.D. Vdovichenko, V.I. Glazko

S u m m a r y

The comparative analysis of polymorphism of ISSR-PCR markers with the use as primers the fragments of different microsatellite loci in some wheat varieties was carried out. The particularities of revealing of the most convenient primers for variety identification were discussed.