

ГАДЖИЕВ Э.С., АКПАРОВ З.И., АЛИЕВ Р.Т., БАБАЕВА С.М., ИЗЗАТУЛЛАЕВА В.И., АББАСОВ М.А., МАМЕДОВА А.Д.✉

Институт генетических ресурсов НАН Азербайджана,

Азербайджан, AZ 1106, г. Баку, пр. Азадлыг, 155, e-mail: elcin_haciyev_1985@mail.ru

✉ afet.m@mail.ru, +994125629805

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОТИПОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* DESF.) АЗЕРБАЙДЖАНА

Цель. Работа посвящена молекулярно-генетической оценке генотипов 110 образцов мягкой пшеницы из различных регионов Азербайджана. **Методы.** Молекулярно-генетический. **Результаты.** С применением 8 ISSR маркеров уровень генетического полиморфизма у изученных генотипов составил 72%. **Выводы.** Праймеры UBC 112, UBC 841, UBC 857 и UBC 873 были определены как наиболее эффективные для идентификации образцов мягкой пшеницы. Был вычислен индекс генетического разнообразия для изученной коллекции, который был равен 0,91. Среди образцов богатое генетическое разнообразие было установлено для разновидности var.*erythrospermum* (ИГР=0,90). В результате анализа GGE-биоплот была создана признаковая коллекция путем отбора 20 образцов мягкой пшеницы с широкой генетической вариацией. Генетически различные генотипы с положительными хозяйственно-ценными признаками, включенные в созданную признаковую коллекцию, могут быть использованы для создания исходного селекционного материала с новыми трансгрессивными свойствами. **Ключевые слова:** *Triticum aestivum* Desf., генетический полиморфизм, ISSR маркеры.

Азербайджан представляет собой большое разнообразие в отношении рельефа, почв и климата. Здесь встречаются все переходы – от холодного климата высокогорных снеговых вершин Большого и Малого Кавказа и умеренно-холодных предгорных до сухого, умеренно-теплого, континентального и субтропического климата. Так же разнообразны почвы Азербайджана. Здесь имеются горно-луговые, лесные, тугайские почвы; черноземы сменяются каштановыми, сероземными и желтоземными почвами; между ними – значительные пространства солончаков, солонцов и мест с обнаженными

выходами горных пород.

Такое разнообразие почвенно-климатических условий способствовало исключительному богатству и своеобразию растительного мира как в дикорастущей, так и в культурной флоре [1]. Агрэкосистемы, имеющие более разнообразный сортовой состав, полнее используют ресурсы среды и характеризуются более высоким и широким адаптивным потенциалом. Поэтому и неудивительно, что здесь встречаются самые различные виды и типы растительности.

Разнообразие и богатство природных условий Азербайджана обусловили усиленное прохождение формообразовательного процесса у растений. Основные зоны Азербайджана отличаются многокультурным и многоотраслевым характером ведения сельского хозяйства [2]. Проблема сбора, сохранения, изучения и рационального использования генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей является государственной, стратегически важной, непосредственно связанной с обеспечением как национальной, так и глобальной продовольственной, биоресурсной и экологической безопасности [3].

Пшеница, являющаяся одной из ведущей культур в Азербайджане, возделывается ниже уровня моря и поднимается до высоты в 2000 м. Она выращивается в низменных, равнинных, предгорных, горных и высокогорных зонах, которые делятся на специфические районы и микрорайоны, различающиеся почвенными и климатическими условиями.

Мягкая пшеница широко распространена в республике и выделяется исключительным полиморфизмом. Она доминирует в посевах равнинных, предгорных и горных районов от субтропических зон с влажным, теплым климатом до сухих и жарких континентальных на-

© ГАДЖИЕВ Э.С., АКПАРОВ З.И., АЛИЕВ Р.Т., БАБАЕВА С.М., ИЗЗАТУЛЛАЕВА В.И., АББАСОВ М.А., МАМЕДОВА А.Д.

горных степей. В долинах и предгорьях преобладают озимые формы, в горных и высокогорных районах – сорта с полуозимым и яровым образом жизни. По числу разновидностей мягкой пшеницы Азербайджан занимает одно из первых мест в Закавказье.

Одной из основных задач фундаментальных исследований и селекции является анализ биологического разнообразия, выявление взаимоотношений как между различными видами, так и между отдельными генотипами, а также создание систем для планомерного использования генофонда. Расширение методов решения этих задач с помощью маркирования генофонда посредством ПЦР амплификации ДНК с произвольными [4], а впоследствии и со специфичными праймерами дало ряд возможностей для изучения геномов [5]. В настоящее время молекулярные ДНК-маркеры прочно укрепили свою позицию в современной науке – генетике, филогенетике, селекции и в других областях биологии. Появляется и успешно внедряется все большее количество молекулярных маркеров, основанных на полиморфизме ДНК.

Известно, что ISSR-метод используется для выявления генетического разнообразия растительного материала, для идентификации генетического полиморфизма видов растений с различными целями. Метод ISSR основан на использовании в качестве праймеров коротких (8 повторов – 16 п. н.) синтетических микросателлитных последовательностей и, следовательно, позволяет изучить организацию в геноме более коротких микросателлитов. ISSR-метод используется для выявления генетического разнообразия растительного материала, для идентификации генетического полиморфизма видов растений [6]. Он был успешно использован для оценки степени генетического разнообразия, идентификации и паспортизации на меж- и внутривидовом уровне в широком диапазоне видов сельскохозяйственных культур. Использование маркеров [7, 8], несомненно, является весьма перспективным для научной практики [9].

Целью данной исследовательской работы явилось изучение генетического разнообразия генотипов мягкой пшеницы, произрастающих в различных почвенно-климатических условиях, с использованием методов молекулярно-генетического анализа.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были взяты 110 коллекционных образцов мягкой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) из различных зон Азербайджана, включающие разновидности *var.albidum*, *var.barbarossa*, *var.erythroleucon*, *var.erythrosperrum*, *var.ferrugineum*, *var.graecum*, *var.lutescens*, *var. Meridionale*, *var.milturum*, *var.outessa*, *var.velutinum*, и сорта Рузи 84, Мирбашир 128, Екинчи 84, Гобустан, Шеки1, Гырмызы бугда, Гюнешли, Шафар, Егана, Азери, Аземетли 95, Перзиван 2.

Изучение генетического разнообразия генотипов мягкой пшеницы оценивалось с помощью ISSR маркеров. Экстракция ядерной ДНК была проведена согласно СТАВ протоколу (Rocers, 1985). Концентрацию и степень чистоты молекулы ДНК определяли с помощью нанометра (Thermo, NANO DROP, 2000). Амплификацию ДНК проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 2 мкл 10×ПЦР-буфера, 2 мкл смеси dNTP (5 мМ), 1,5 мкл MgCl₂ (50 мМ), 2 мкл каждого праймера (15 пмоль/мкл), 0,1 мкл фермента *Taq*-полимеразы (1 У/мкл) и 2 мкл выделенной ДНК (50 нг/мкл). В результате проведенной оптимизации были выбраны следующие условия амплификации: предварительная денатурация при температуре 94°C в течение 5 мин, последующие 35 циклов – денатурация 94°C (1 мин), температура отжига в зависимости от использованного праймера (45 с), синтез – 5 мин при 72°C, финальный цикл элонгации при температуре 72°C в течение 10 мин. Амплификацию проводили в программируемом термоциклере T100 (Applied Biosystems, USA) мультилокусного межмикросателлитного анализа, были апробированы 8 полиморфных ISSR праймеров длиной 15–18 нуклеотидов. Электрофорез ПЦР продуктов проводили в 2%-ном агарозном геле с добавлением этидиум бромид и визуализировали под ультрафиолетовым светом с использованием гельдокументирующей системы BioRad. Анализ амплифицированных фрагментов был проведен с помощью компьютерной программы PAST [10]. Для выявления уровня полиморфизма маркеров между изученными генотипами данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых «наличие» или «отсутствие» ПЦР фрагментов одинаковых по размеру ампликонов соответствовало значениям 1 и 0.

В качестве показателей генетического

разнообразия определялись число и доля полиморфных локусов и индекс генетического разнообразия. Коэффициент генетического разнообразия вычислялся согласно формуле Вейра [11]:

$$H = 1 - \sum p_i^2,$$

где H – индекс генетического разнообразия, p_i – частота встречаемости аллелей.

Результаты и обсуждение

В результате анализа 8 случайных праймера длиной 18 нуклеотидов при амплификации с геномной ДНК мягкой пшеницы было выявлено 178 ПЦР-фрагментов (табл. 1). На основании анализа экспериментальных данных, полученных при использовании праймеров UBC112, UBC841, UBC857, UBC873, установлено наибольшее количество амплифицированных фрагментов ДНК. Основная зона распределения фрагментов располагалась в диапазоне 500–3000 п. н.

Так, например, с помощью праймера UBC 112 было синтезировано 8 фрагментов длиной 250–2200 п. н. Наличие первого фрагмента это-

го праймера отмечено у четырех, десятого фрагмента – у 58 исследованных генотипов пшеницы. Третий фрагмент был синтезирован у 12 образцов, из которых 5 являлись генотипами var. *Lutescens*; 13-ый фрагмент отмечен у трех генотипов, из которых 2 также относятся к var. *lutescens*. У генотипов var. *erythroleucon* (6274) и var. *meridionale* (6276), собранных на территории Апшерона, длина синтезированного фрагмента равнялась 280 п. н. (рис. 1).

Длина 20 фрагментов, синтезированных праймером UBC 841, находилась в пределах 150–1100 п. н. Синтезированные им фрагменты по-разному распределились у исследованных генотипов: наиболее часто встречается 18-ый фрагмент, в наименьшем количестве – 3-ий (рис. 2).

С помощью праймера UBC 857 было синтезировано 19 фрагментов длиной 100–2200 п. н., при этом только у генотипа var. *erythrospermum* (6290), произрастающего на Апшероне, была отмечена длина фрагмента, равная 2200 п. н. (рис. 3).

Таблица 1. ISSR-праймеры и их статистические параметры

Праймеры	Последовательность (5'-3')	Количество фрагментов	Полиморфные фрагменты	Процент полиморфности	Rp	PIС	EMR	MI	MRp	Индекс генетического разнообразия
UBC112	(GA) ₄ (CA) ₄	13	10	77	6,88	0,31	7,69	2,4	0,52	0,92
UBC808	(AG) ₈ C	18	13	72	5,80	0,32	9,39	3,0	0,32	0,94
UBC811	(GA) ₈ C	19	10	53	2,78	0,20	5,26	1,1	0,14	0,69
UBC827	(AC) ₇ C	15	15	100	5,79	0,36	15,0	5,4	0,38	0,83
UBC841	G(ACA) ₄ (GC) ₃ C	20	13	65	6,02	0,29	8,45	2,5	0,30	0,96
UBC857	(AC) ₈ TT	19	14	74	5,87	0,29	10,32	3,0	0,30	0,98
UBC864	TAG(GT) ₆ G AA	22	13	59	6,79	0,25	7,68	1,9	0,30	0,98
UBC873	(GA) ₄ (CA) ₄	10	9	90	4,10	0,41	8,10	3,3	0,41	0,96
Тотал		136	97	-						-
Средний показатель		17	17	74	5,37	0,30	9,22	2,9	0,33	0,91

Примечания: Rp – показатель разрешающей способности; EMR – эффективное мультиплексное отношение; MI – маркерный индекс, MRp – средний показатель разрешающей способности.

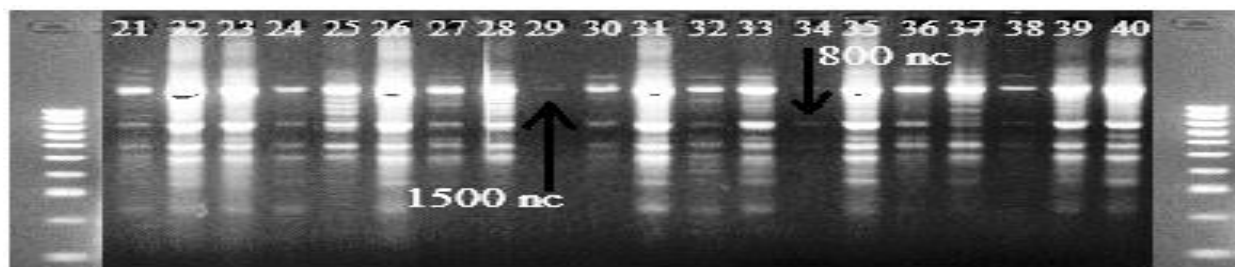


Рис. 1. ПЦР-профили генотипов пшеницы с применением праймера UBC112. Стрелка указывает на наличие специфического фрагмента.

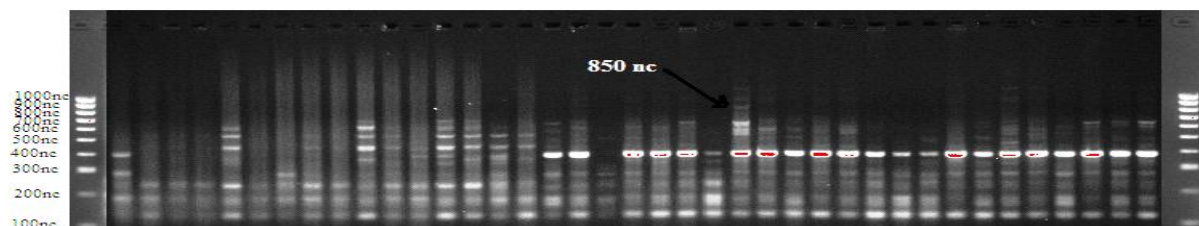


Рис. 2. Фрагменты ДНК, амплифицированные праймером UBC 841.

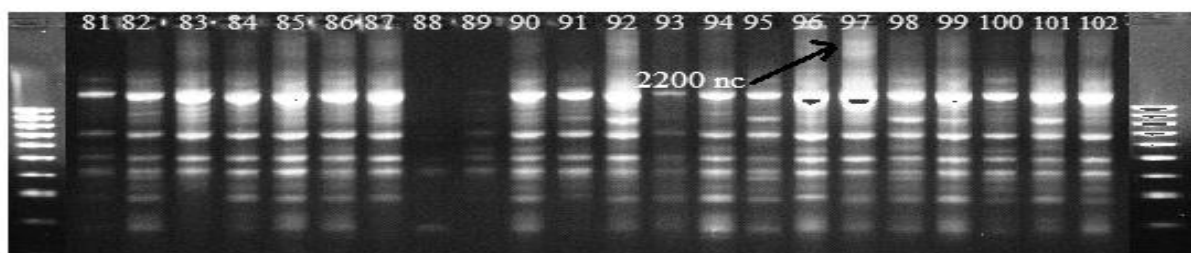


Рис. 3. ПЦР-профили генотипов пшеницы с применением праймера UBC 857.

У 12-го исследованных генотипов отмечается наличие третьего фрагмента, у 4 образцов var. *erythrospertum*. – 12-го фрагмента, у 95 образцов – синтез 15-го фрагмента. Два генотипа var. *lutescens* (7050 и 6280), собранные на территории Гобустана и Апшерона, характеризовались синтезом одного фрагмента, длина которого составила соответственно 15000 и 800 п. н.

Частота распределения фрагментов у исследованных 110 образцов мягкой пшеницы колебалась в пределах 0,01–0,87. Средний показатель частоты встречаемости фрагментов составил 0,27. Частота встречаемости 29 фрагментов отмечена ниже 0,1, и только 2 фрагмента у более чем 90 образцов характеризовались частотой встречаемости 0,87.

Из 136 фрагментов 6 фрагмента, частота встречаемости которых была ниже 1%, включены в группу редких; 61 фрагмент, частота встречаемости которого колебалась в пределах 1–20%, отнесен к общим; 68 фрагментов с час-

тотой встречаемости более 20%, отнесены к часто повторяющимся (табл. 2). Часто повторяющиеся и общие фрагменты в основном выявлены во всех локусах. Величина вариации первой группы колебалась в пределах 2–13, второй – 1–14. Лишь у 6 локусов отмечено наличие 6 редких фрагментов.

Выводы

Таким образом, с применением 8 ISSR маркеров уровень генетического полиморфизма мягкой пшеницы составил 72%. Праймеры UBC112, UBC841, UBC857 и UBC873 определены как наиболее эффективные для идентификации образцов разновидности мягкой пшеницы. Индекс генетического разнообразия коллекции вида *T. aestivum* равен 0,91. Среди исследованных образцов пшеницы богатое генетическое разнообразие было установлено для разновидности var. *erythrospertum* (ИГР=0,90).

Таблица 2. Аллельный состав локусов 8 ISSR маркеров 110 генотипов мягкой пшеницы

Праймер	Уникальные аллели; ≤ 1 %	Общие аллели; 1–20 %	Часто повторяющиеся аллели; > 20 %
UBC112	-	9	4
UBC808	-	10	9
UBC811	1	14	2
UBC827	-	5	11
UBC841	1	10	9
UBC857	1	5	13
UBC864	3	8	11
UBC873	-	1	9
Вариабельность	1-3	1-14	2-13
Среднее число	1,5	7,75	8,5
Всего	6	62	68

В результате анализа GGE-биопилот была создана признаковая коллекция из 20 образцов, характеризующихся широкой генетической вариацией. Кроме того, была создана коллекция, объединяющая в себе самые отдаленные генотипы и отражающая генетическое разнообразие всех изученных образцов. Генети-

чески различные генотипы с положительными хозяйственно-ценными признаками могут быть использованы в селекционной практике.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант № EIF-2012-2(6)-39/03/3).

Литература

1. Алиев Д.А., Акперов З.И. Генетические ресурсы растений Азербайджана. *Вестн. НАНА*. 2002. № 1–6. С. 57–68.
2. Алиев Р.Т., Акперов З.И., Мамедов А. Генетические ресурсы растений Азербайджана. Биоразнообразие. Баку: Наука, 2008. 232 с.
3. Дзюбенко Н.И. Вавиловская стратегия пополнения, сохранения и рационального использования генетических ресурсов культурных растений и их диких сородичей. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. Санкт-Петербург, 2012. Т. 169. С. 4–40.
4. Cekic C., Battey N.H., Wilkinson M.J. The potencial of ISSR-PCR primer-pair combination for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103. P. 540–564.
5. Чесноков Ю.В. Молекулярные маркеры и управление генетическими ресурсами растений. Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб: ВИР, 2005. С. 240–250.
6. Lanying Z. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2008. Vol. 3, No. 4. P. 626–631.
7. Meyer W. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31. P. 2274–2280.
8. Wu K.S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P.A. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22, No. 15. P. 3257–3258.
9. Zhang X.Y., Li C.W., Wang L.F., Wang H.M., You G.X., Dong Y.S. An estimation of minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theor. Appl. Genet.* 2002. Vol. 106. P. 112–117.
10. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001. Vol. 4. P. 1–9.
11. Weir B.S. Genetic Data Analysis Methods for Discrete Genetic Data. Sunderland, MA, USA: Sinauer Assoc. Inc., 1990.

References

1. Aliev D.A., Akperov Z.I. Geneticheskie resursy rasteniy Azerbaydzhana. *Vestn. NANA*. 2002. № 1–6. S. 57–68.
2. Aliev R.T., Akperov Z.I., Mamedov A. Geneticheskie resursy rasteniy Azerbaydzhana. Bioraznoobrazie. Baku: Nauka, 2008. 232 s.
3. Dzyubenko N.I. Vavilovskaya strategiya popolneniya, sohraneniya i ratsionalnogo ispolzovaniya geneticheskikh resursov kulturnykh rasteniy i ih dikih sorodichey. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i seleksii*. Sankt-Pererburg. 2012. T. 169. S. 4–40.
4. Cekic C., Battey N.H., Wilkinson M.J. The potencial of ISSR-PCR primer-pair combination for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103. P. 540–564.

5. Chesnokov Yu.V. Molekulyarnyie markeryi I upravlenie geneticheskimi resursami rasteniy. Identifitsirovannyiy genofond rasteniy I selektsiya. SPb: VIR, 2005. S. 240–250.
6. Lanying Z. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2008. Vol. 3, No. 4. P. 626–631.
7. Meyer W. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31. P. 2274–2280.
8. Wu K.S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P.A. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research.* 1994. Vol. 22, No. 15. P. 3257–3258.
9. Zhang X.Y., Li C.W., Wang L.F., Wang H.M., You G.X., Dong Y.S. An estimation of minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theor. Appl. Genet.* 2002. Vol. 106. P. 112–117.
10. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Pa-laentologia Electronica.* 2001. Vol. 4. P. 1–9.
11. Weir B.S. Genetic Data Analysis Methods for Discrete Genetic Data. Sunderland, MA, USA: Sinauer Assoc. Inc., 1990.

HAJIYEV E.S., AKPAROV Z.I., ALIYEV R.T., BABAYEVA S.M., IZZATULLAYEVA V.I., ABBASOV M.A., MAMMADOVA A.D.

*Genetic Resources Institute of Azerbaijan National Academy of Sciences,
Azerbaijan, 1106, Baku, Azadlig Ave., 155, e-mail: elcin_haciyev_1985@mail.ru*

USE OF DNA MARKERS FOR STUDYING THE GENETIC POLYMORPHISM OF THE BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* DESF.) GENOTYPES OF AZERBAIJAN

Aim. The study was devoted to molecular-genetic evaluation of 110 bread wheat genotypes collected from different regions of Azerbaijan. **Methods.** Molecular-genetic. **Results.** The mean polymorphism level for the studied genotypes of bread wheat, using 8 ISSR markers, was 72 %. An index of genetic diversity calculated for the studied collection of *T. aestivum* specie was equal to 0.91. Among the bread wheat accessions, the highest genetic diversity was established for botanical variety var. *erythrospermum* (GDI=0.90). **Conclusions.** Primers UBC 112, UBC 841, UBC 857 and UBC 873 were identified to be more effective in identification of bread wheat accessions. As a result of the GGE biplot analysis, a trait collection was created by selecting 20 bread wheat samples with broad genetic variation. A core collection of bread wheat was created, which covers the most distant genotypes and represents the genetic diversity of all 110 accessions studied.

Keywords: *Triticum aestivum* Desf., genetic polymorphism, ISSR markers.

ГАДЖІЄВ Е.С., АКПАРОВ З.І., АЛІЄВ Р.Т., БАБАЄВА С.М., ІЗЗАТУЛЛАЄВА В.І., АББАСОВ М.А., МАМЕДОВА А.Д.

*Інститут генетичних ресурсів НАН Азербайджану,
Азербайджан, АЗ 1106, м. Баку, пр. Азадліг, 155, e-mail: elcin_haciyev_1985@mail.ru*

ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНОТИПІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* DESF.) АЗЕРБАЙДЖАНУ

Мета. Робота присвячена молекулярно-генетичній оцінці генотипів 110 зразків м'якої пшениці з різних регіонів Азербайджану. **Методи.** Молекулярно-генетичний. **Результати.** Із застосуванням 8 ISSR маркерів рівень генетичного поліморфізму у вивчених генотипів становив 72 %. **Висновки.** Праймери UBC 112, UBC 841, UBC 857 і UBC 873 були визначені як найбільш ефективні для ідентифікації зразків м'якої пшениці. Був обчислений індекс генетичної різноманітності для вивченої колекції, який дорівнював 0,91. Серед зразків багату генетичну різноманітність було встановлено для різновиду var. *erythrospermum* (ІГР = 0,90). У результаті аналізу GGE – біплот була створена признакова колекція шляхом відбору 20 зразків м'якої пшениці з широкою генетичною варіацією. Генетично різні генотипи з позитивними господарсько-цінними ознаками, включені в створену признакову ко-колекцію, можуть бути використані для створення вихідного селекційного матеріалу з новими трансгресивними властивостями.

Ключові слова: *Triticum aestivum* Desf., генетичний поліморфізм, ISSR маркери.