

**ТВЕРДОХЛЕБ Е.В., БОГУСЛАВСКИЙ Р.Л., АКИНИНА Г.Е., ПОПОВ В.Н.,  
АНЦИФЕРОВА О.В., ШЕЛЯКИНА Т.А., ИЛЬЧЕНКО Н.К.**

*Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины,  
Украина, 61128, г. Харьков, Московский пр., 142,  
e-mail: etverd@meta.ua, (067) 943-40-42*

## **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТУРНЫХ ДИПЛОИДНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ ПО ISSR-МАРКЕРАМ**

Пшеница однозернянка *Triticum monocossum* L. была одной из первых одомашненных зерновых культур в Плодородном Полумесяце. Самые ранние зерновые остатки однозернянки найдены в населенных пунктах вблизи с. Каракадаг [1]. Затем она распространилась на Ближний Восток, Балканы и Кавказ, в Туркменистан, Центральную и Средиземноморскую Европу, Северную Африку и, наконец, Западную и Северную Европу. Её культивировали в течение нескольких веков, прежде чем она была заменена голозёрными пшеницами [2]. Одомашнивание дикой однозернянки и дальнейшая селекция привели к важным физиологическим и морфологическим изменениям. Человеком были отобраны яровые формы из популяций озимого дикого предка [3]. Отобранные формы приобрели устойчивость к полеганию [4]. Распадающийся при созревании стержень колоса стал менее ломким, что позволяет проводить уборку урожая без потерь, по сравнению с дикорастущими формами, когда собрать урожай возможно лишь на 50–80% [5]. Размер зерен увеличился [2], и они стали немного легче вымолачиваться, что уменьшило усилия, необходимые для обмолота [6]. Отбор велся в период ленточной керамики – возникновения и развития земледелия [7].

На сегодняшний день интерес к однозернянке возобновился благодаря питательным качествам зерна [8–10], её низкой требовательности к условиям выращивания и высокой устойчивости к вредителям и болезням [11], что открывает перспективы её использования для органического земледелия [12]. *T. monocossum* также возможно использовать как источник ценных генов для улучшения современных сортов пшеницы [13–16].

*T. monocossum* не вовлекался в интенсивную селекцию, однако его образцы, собранные исследователями на протяжении последних 100 лет, сохраняются в генбанках. Это позволило в значительной мере сохранить генетическое разнообразие вида. Использование молекулярных маркеров позволяет оценить не только внутривидовое разнообразие генетических ресурсов куль-

турной однозернянки [17], но и сравнить генетическое разнообразие с другими диплоидными видами. В ранних исследованиях [18] было показано, что генетическое разнообразие у диких однозернянок *T. boeoticum* и *T. urartu* было выше, чем у *T. monocossum*.

Улучшение культурной однозернянки в направлении приспособления к современным технологиям основывается на использовании её генетического разнообразия, которое изучено недостаточно. Учитывая это, нашей задачей является оценка генетического разнообразия *T. monocossum* из коллекции Национального центра генетических ресурсов растений Украины.

### **Материалы и методы**

В работе были изучены два культурных вида подрода *Boeoticum* (табл. 1), представленные 14 образцами: 13 – *T. monocossum* и 1 – *T. sinskajae* из коллекции Национального центра генетических ресурсов растений Украины (НЦГРРУ). Голозёрный вид *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. был открыт в 70-е гг. XX в. [19].

ДНК выделяли из смеси муки, которую получали из зёрен 30 колосьев каждого образца, набором реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

DiatomDNAPrep100 (Неоген). Оценку полиморфизма и классификацию форм однозернянки проводили с помощью динуклеотидных праймеров межмикросателлитных участков ДНК ([http://download.bion.com.cn/upload/month\\_0812/20081213\\_3e0a387c764331d\\_0978dRPKoJqSzhDvl.attach.pdf](http://download.bion.com.cn/upload/month_0812/20081213_3e0a387c764331d_0978dRPKoJqSzhDvl.attach.pdf)).

Амплификацию ISSR-локусов проводили по следующей программе: начальная денатурация – 4 мин. при 94 °С, следующие 40 циклов с такими параметрами: денатурация – 30 с при 94 °С, гибридизация праймера – 45 с при 52 °С, элонгация – 45 с при 72 °С, конечная элонгация – 45 с при 72 °С. Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 3 мкл ДНК и 2 мкМ каждого праймера.

## Образцы культурной однозернянки, используемые в изучении

Номер Национального каталога Украины	Происхождение	Разновидность	Морфологические особенности
UA0300222	GEO	<i>monococcum</i>	чешуи шероховатые на ощупь, бугорчатые, матовые, ости и чешуи белые
UA0300254	ARM		
UA0300221	AZE		
UA0300104	BGR	<i>macedonicum</i> Papag.	чешуи гладкие, блестящие, чешуи и ости белые
UA0300113	SYR		
UA0300115	SYR		
UA0300116	SYR		
UA0300439	HUN		
UA0300117	SYR		
UA0300112	SYR		
UA0300223	ALB	<i>vulgare</i> Koern.	чешуи и ости красные
UA0300224	RUS	<i>sinskajae</i> A. Filat. et Kurk.	чешуи гладкие, блестящие, ости и чешуи белые
UA0300430	CZE	<i>sofianum</i> Stransk.	чешуи шероховатые на ощупь, бугорчатые, матовые, красные на чёрном фоне, ости чёрные
UA0300310	GEO	<i>hohensteinii</i> Flaksb.	чешуи опушенные, чешуи и ости белые

Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в боратном буфере с низкой ионной силой; для визуализации ДНК в ультрафиолете использовали бромистый этидий. Электрофорез проводили в горизонтальном приборе Hoefer SuperSub100 [20]. Для определения размеров ПЦР-продуктов использовали маркер длин ДНК 1kb DNA ladder. Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Nikon D50. Для определения количества и размеров продуктов амплификации применяли демоверсию программы TotalLab 120 (<http://www.totallab.com>).

## Результаты и обсуждения

В коллекции НЦГРРУ содержатся образцы культурной однозернянки ярового типа развития. Как сообщалось ранее [21], колоски у растений культурных однозернянок, выращенных в благоприятных условиях, содержат более одной зерновки. Исключение составляет голозёрный вид *T. sinskaiaae*.

Исследованные нами образцы культурной однозернянки относились к шести ботаническим разновидностям. Все они характеризуются остистыми колосьями и красными зерновками, однако имеют свои особенности.

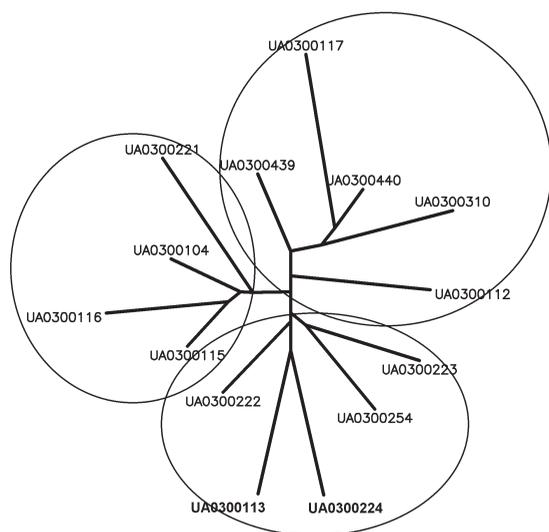
В работе использовали пять межмикросателлитных праймеров (табл. 2). При амплификации идентифицировали различное количество ампликонов: от 13 (UBC 834, UBC 857) до 24 (UBC 842). Всего идентифицировано 82 локуса ДНК. В относительных единицах уровень полимор-

физма варьировал от 69,2% (UBC 834) до 100% (UBC 847). В среднем показатель составил 80%, что является достаточно высоким уровнем. Размер идентифицированных фрагментов изменялся в широком диапазоне. Минимальный размер фрагментов ДНК был 109 п.н., а максимальный – 1582 п.н. при использовании праймеров UBC 846 и UBC 842, соответственно. Нами были выявлены уникальные фрагменты практически у всех изученных образцов (табл. 2). Исключение составили три образца происхождения из Болгарии, Сирии и Чехии. С целью оценки молекулярно-генетического разнообразия однозернянок на основе бинарной матрицы, содержащей данные о наличии/отсутствии фрагментов в ПЦР-спектрах, были рассчитаны генетические расстояния Nei и Li. При сравнении генетических расстояний между изученными образцами наибольшее расстояние – 0,009363 – определено между UA0300117 и UA0300113, наименьшее – 0,002745 – между UA0300104 и UA0300115. Таким образом, при селекционном улучшении культурной однозернянки для расширения генетического разнообразия и получения трансгрессий по ценным признакам считаем целесообразным проводить скрещивания между образцами *T. monococcum* UA0300117 и образцами UA0300113, UA0300221, UA0300222.

По предварительным данным, на основании матрицы генетических расстояний было построено дерево, в котором образцы объединились в три кластера (рис.).

**Характеристика используемых в работе ISSR-праймеров**

Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Количество локусов, шт.		Полиморфизм, %	Размер фрагментов ДНК, п.н.	
		всего	уникальных		max – min	уникальные/номер образца
834	(AGA) <sub>4</sub> GYT	13	4	69,2	1448 – 351	1448 – UA0300222, 701 – UA0300224, 538 – UA0300439 351 – UA0300115
846	(CAC) <sub>4</sub> ART NNN NAT G	15	5	66,7	1317 – 109	1176 – UA0300439 973 – UA0300310 509 – UA0300112 417 – UA0300223 357 – UA0300223
847	(CAC) <sub>4</sub> ARC NAT GTG G	17	0	100	1461 – 220	
857	(ACA) <sub>4</sub> CYG	13	2	84,6	1086 – 115	1086 – UA0300113 1021 – UA0300254
842	(GAG) <sub>4</sub> ACT G	24	5	79,2	1582 – 210	1549 – UA0300221 1400 – UA0300221 1136 – UA0300224 686 – UA0300221 463 – UA0300116



**Рис.** Дендрограмма культурных диплоидных пшениц из коллекции НИЦГРУ на основе ISSR-маркеров

Первый кластер состоит из голозёрного образца *T. sinskajae* UA0300224, образца *T. monosocum* с облегчённым обмолотом UA0300113 (SYR) [21], двух образцов разновидности *var. monosocum* различного географического происхождения: UA0300222 (GEO) и UA0300254 (ARM) и одного образца разновидности *vulgare* – UA0300223 (ALB). По нашим данным, образец UA0300222 выделяется повышенной стекловидностью – 38,5%, а для *T. sinskajae* характерны короткий колос и низкая озёрненность колоса [21].

Во второй кластер вошли два образца из Сирии – UA0300115, UA0300116 и по одному об-

разцу из Болгарии – UA0300104 и Азербайджана – UA0300221.

В третий кластер входят два образца из Сирии – UA0300112, UA0300117 (разновидность *macedonicum*), по одному из Грузии – UA0300310, Чехии – UA0300440 и Венгрии – UA0300439. Образец из Сирии UA0300112 характеризуется коротким колосом и, как следствие, небольшим количеством колосков и зёрен в колосе.

В наших исследованиях кластеризация образцов культурной однозернянки не коррелирует с географическим происхождением. Это означает, что *T. monosocum* получила широкое распространение после одомашнивания, но не претерпела значительных генетических изменений в течение последних 10 000 лет [2].

**Выводы**

С помощью межмикросателлитных праймеров было идентифицировано 82 локуса ДНК. Установлен высокий уровень полиморфизма – в среднем 80%. Практически у всех образцов выявлены уникальные фрагменты. На основании анализа продуктов амплификации с использованием ISSR-маркеров 14 образцов сгруппировались в три кластера. В первый кластер вошли голозёрный образец *T. sinskajae* и образец с облегчённым вымолотом UA0300113, в третий кластер – образцы с наиболее трудным вымолотом зёрен. Не обнаружено связи между кластерами образцов культурной однозернянки с их географическим происхождением. Для расширения генетического разнообразия *T. monosocum* целесообразно проводить скрещивания между образцом UA0300117, с одной стороны, и образцами UA0300113, UA0300221 и UA0300222, с другой стороны.

## ЛИТЕРАТУРА

- De Moulins D. Abu Hureyra 2: plant remains from the Neolithic. In: Moore AMT, Hillman G.C, Legge A.J (eds) Village on the Euphrates: from foraging to farming at Abu Hureyra. – New York: Oxford University Press, 2000. – P. 399–422.
- Zohary D., Hopf M. Domestication of plants in the Old World. – Oxford: Oxford University Press, 2000.
- Golovnina K.A., Kondratenko E.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Molecular characterization of vernalization loci VRN1 in wild and cultivated wheats [Electronic resource] // BMC Plant Biol. – 2010. – 10:168. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/168>.
- Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. 3-е изд., доп. и перераб. – Л.: Колос, 1964. – 752 с.
- Hillman G., Davies S. Measured domestication rates in wild wheats and barley under primitive cultivation, and their archaeological implications // World Prehist. – 1990. – № 4. – P. 157–219.
- Nesbitt M., Hillman G., Penˆa-Chocarro L., Samuel D., Szabo TA. Checklist for recording the cultivation and uses of hulled wheats. In: Padulosi S., Hammer K., Heller J. (eds). Hulled wheats, promoting the conservation and used of underutilized and neglected crops. – Rome: IPGRI, 1996. – P. 234–246.
- Kreuz A., Boenke N. The presence of two-grained einkorn at the time of the Bandkeramik culture // Veg His Archaeobot. – 2002. – № 1. – P. 233–240.
- Hidalgo A., Brandolini A., Gazza L. Influence of steaming treatment on chemical and technological characteristics of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) wholemeal flour // Food Chem. – 2008. – 111. – P. 549–555.
- Hidalgo A., Brandolini A., Ratti S. Influence of genetic and environmental factors on selected nutritional traits of *Triticum monococcum* // Agric Food Chem. – 2009. – 57. – P. 6342–6348.
- Brandolini A., Hidalgo A., Moscaritolo S. Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour // Cereal Sci. – 2008. – 47. – P. 599–609.
- Oliveira H.R., Jones H., Leigh F., Lister D.L., Jones M.K., Penˆa-Chocarro L. Phylogeography of einkorn landraces in the Mediterranean basin and Central Europe: population structure and cultivation history // Archaeol Anthropol Sci. – 2011. – 3. – P. 327–341.
- Konvalina P., Capouchova I., Stehno Z., Moudry J., Moudry J. Jr. Agronomic characteristics of the spring forms of the wheat landraces (einkorn, emmer, spelt, intermediate bread wheat) grown in organic farming // Agrobiol. – 2010. – 27, № 1. – P. 9–17.
- Olson E.L., Brown-Guedira G., Marshall D., Stack E., Bowden R.L., Jin Y., Rouse M., Pumphrey M.O. Development of wheat lines having a small introgressed segment carrying stem rust resistance gene Sr22 // Crop Sci. – 2010. – 50. – P. 1823–1830.
- Kaur S., Chhuneja P., Dhaliwal H.S., Singh K. Transfer of a new leaf rust resistance genes from diploid *T. monococcum* and *T. boeoticum* to *T. aestivum*. In: Appels R., Eastwood R., Lagudah E., Langridge P., Mackay M., McIntyre L., Sharp P. (eds). The 11<sup>th</sup> international wheat genetics symposium proceedings, Sydney University Press. – 2008.
- Kolmer J.A., Anderson J.A., Flor J.M. Chromosome location, linkage with simple sequence repeat markers, and leaf rust resistance conditioned by gene Lr63 in wheat // Crop Sci. – 2010. – 50. – P. 2392–2395.
- Schmolke M., Mohler V., Hartl L., Zeller F.J., Hsam SLK. A new powdery mildew resistance allele at the Pm4 wheat locus transferred from einkorn (*Triticum monococcum*) // Mol Breed. – 2012. – 29. – P. 449–456.
- Jing Hai-Chun, Korniyukhin D., Kanyuka K., Orford S., Zlatska A., Mitrofanova O.P., Koebner R., Hammond-Kosack K. Identification of variation in adaptively important traits and genome-wide analysis of trait–marker associations in *Triticum monococcum* // Journal of Experimental Botany. – 2007. – 58, № 13. – P. 3749–3764. doi: 10.1093/jxb/erm225.
- Castagna R., Maga G., Perenzin M., Heun M., Salamini F. RFLP-based genetic relationships of Einkorn wheats // Theoretical and Applied Genetics. – 1994. – 88. – P. 818–823.
- Филатенко А.А., Куркиев У.К. Пшеница Синской (Новый вид – *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.) // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. – 1975. – 54, вып. 1. – С. 239–241.
- Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E., Creavalle T.D., Kern S.E. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // BioTechniques. – 2004. – 37, № 4. – P. 598–602.
- Твердохлеб Е.В. Изменчивость признаков культурной однозернянки *Triticum monococcum* L. и *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2015. – Вип. 3 (36). – С. 83–90.

**TVERDOKHLEB E.V., BOGUSLAVSKIY R.L., AKININA G.YE., POPOV V.N., ANTSIFEROVA O.V., SHELYAKINA T.A., IL'CHENKO N.K.**

*Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuryev of NAAS,*

*Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovskiyi avenue, 142, e-mail: etverd@meta.ua*

### GENETIC DIVERSITY OF CULTURAL DIPLOID WHEAT SPECIES INFERRED FROM THE VARIATION OF ISSR-MARKERS

**Aim.** The assessment of cultivated einkorn genetic diversity from the collection of the National Centre of Plant Genetic Resources of Ukraine. **Methods.** Analysis of genetic diversity was performed using ISSR markers. **Results.** 82 DNA loci were identified. The high level of polymorphisms is found – in average 80%. Almost all the samples revealed the unique fragments. Based on the ISSR markers, 14 accessions were grouped into three clusters. The first cluster includes naked-grain accession *T. sinskajae* and the sample with easy threshing UA0300113, the third cluster includes the accessions with most difficult grain threshing. To increase the genetic diversity of *T. monococcum*, there is advisable to carry out crossbreeding between the sample UA0300117 on the one hand and the samples UA0300113, UA0300221, UA0300222 on the other hand. **Conclusions.** The investigated set of accessions is rather high polymorphic. Clustering of cultivated einkorn accessions using ISSR markers is not correlated with geographic origin.

**Keywords:** *T. monococcum*, *T. sinskajae*, ISSR markers, genetic diversity, genetic distances.