

УДК 633.1:575.2

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ($\times$ *TRITICOSECALE* WITTMACK) ПОСРЕДСТВОМ RAPD- И ISSR-МАРКЕРОВ

© 2012 г. О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева

Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by

Поступила в редакцию 9 февраля 2012 г. Принята к публикации 20 февраля 2012 г.

Проведено изучение молекулярно-генетической гетерогенности 20 образцов яровой тритикале. Используемые ISSR- и RAPD-маркеры выявили высокий уровень полиморфизма (в среднем 80,2 и 89,9 % соответственно), что дало возможность сгруппировать изученные образцы тритикале по степени генетического родства и подобрать генетически дивергентные родительские пары для скрещиваний с целью получения гибридов с эффектом гетерозиса.

Ключевые слова: тритикале, RAPD- и ISSR-анализ, гетерозис.

Введение

Тритикале является самой молодой зерновой культурой и первым злаком, синтезированным человеком. Сочетая свойства пшеницы и ржи, данная культура может давать высокие урожаи в районах с неблагоприятными почвенно-климатическими условиями (засушливые районы, суровые условия в зимний период, неплодородные почвы), а по устойчивости к болезням тритикале не уступает ржи. В последние годы значительно возрос интерес к яровой тритикале. По уровню устойчивости к болезням, урожайности, кормовым качествам зерна и зеленой массе она составляет достойную конкуренцию другим яровым зерновым культурам. По урожайности зерна яровая тритикале значительно превышает пшеницу и овес и находится на уровне ячменя. Современные сорта существенно отличаются от своих предшественников, так как являются относительно низкорослыми, устойчивыми к полеганию, более скороспелыми. Следует отметить, что по уровню содержания белка в зерне (13–15 %) яровая тритикале достоверно превышает озимую. Отдельные сортообразцы характеризуются содержанием белка более 16 % при достаточно высоком уровне продуктив-

ности. Кроме того, яровая тритикале в 1,5 раза превосходит ячмень по содержанию белка и в 1,6 раза озимую рожь по содержанию важнейшей незаменимой аминокислоты метионина.

Одним из направлений в селекции тритикале в последнее время является использование явления гетерозиса для создания высокопродуктивных гибридов с высокими кормовыми достоинствами зерна (Oettler *et al.*, 2005; Tams *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2010). Известно, что для получения гетерозисных гибридов предпочтительнее скрещивания между генетически отдаленными формами, чем между близкородственными формами. Для оценки генетического разнообразия селекционного материала широко используются такие молекулярно-генетические методы анализа, как RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats). Есть сведения о применении SSR- и AFLP-маркеров для исследования генетической дивергенции озимых тритикале (Goral *et al.*, 2005; Kuleung *et al.*, 2006), а также данные об использовании ДНК-маркеров для предсказания гетерозиса у гибридов кукурузы, пшеницы и других культур (Bernardo, 1994;

Diers *et al.*, 1996; Fabrizio *et al.*, 1998). Проводятся исследования по установлению связи между степенью генетического сходства родительских компонентов и специфической комбинационной способностью (Tams *et al.*, 2006). Таким образом, использование молекулярно-генетических методов помогает разрабатывать новые подходы идентификации ценного исходного материала для селекции на гетерозис, которые обеспечат сокращение затрат на создание новых конкурентоспособных гибридов.

Целью данного исследования является оценка степени генетической дивергенции образцов ярового тритикале посредством методов молекулярного маркирования для отбора исходного материала при селекции на гетерозис.

Материалы и методы

В исследование включены 3 белорусских сорта тритикале: Узор, Лотос и Ульяна; 3 сорта польской селекции: Матейко, Ванад и Дублет; 6 линий яровой тритикале из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино): МАН-17568, Вого-47, Г-64, Г-80, Г-114, Г-225; 8 форм тритикале с различными системами генов яровизации,

отобранных из F₈, синтезированных нами ранее первичных тритикале. Пшенично-ржаные амфигаплоиды получены на основе почти изогенных по локусам *Vrn1–Vrn3* линий мягкой пшеницы, созданных на генофонах сортов Triple Dirk и Мироновской 808. В качестве опылителя использовали диплоидную озимую рожь Восход и яровую аллоплазматическую рожь (Генетические основы ..., 2010).

Выделение растительной ДНК проводили из зеленых листьев с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» (Fermentas).

Для ISSR-анализа использовали 7 праймеров, 5 из которых содержали динуклеотидный повтор (ISSR24, ISSR4, ISSR11, ISSR10, ISSR9), 2 – тринуклеотидный (ISSR2, ISSR17) (табл. 1). RAPD-анализ проводили с использованием 5 10-нуклеотидных праймеров, синтезированных по аналогам фирмы «Operon Technologies», USA: OPC-01, OPC-05, OPC-11, OPD-07, OPD-15 (табл. 1). Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 15 мкл содержала: 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 6/8 (RAPD/ISSR) пМ праймера, 0,11 ед. Taq-полимеразы в 1× буфере и 15/20 (ISSR/RAPD) нг ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе Bio-Rad в следующих условиях: 94 °С 3 мин; 40/44 (ISSR/RAPD) циклов –

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных для изучения ДНК-полиморфизма образцов яровой тритикале

Праймер	Последовательность нуклеотидов, 5'-3'	Число ампликонов		Уровень полиморфизма, %
		всего	полиморфных	
ISSR-праймеры				
ISSR2	(CAG) ₅	24	23	95,8
ISSR4	(AC) ₈ AG	10	9	90,0
ISSR9	(GA) ₈ A	9	4	44,4
ISSR10	(AG) ₈ T	10	4	40,0
ISSR11	(AG) ₈ C	7	5	71,4
ISSR17	(AGC) ₆ G	10	8	80,0
ISSR24	(AC) ₈ TC	16	16	100
RAPD-праймеры				
OPC-01	TTCGAGCCAG	9	7	77,8
OPC-05	GATGACCGCC	18	18	100
OPC-11	AAAGCTGCGG	18	16	88,9
OPD-07	TTGGCACGGG	14	13	92,9
OPD-15	CATCCGTGCT	10	8	80,0

94 °C 1 мин; 36 °/51,5–55,5 °C (RAPD/ISSR) 1 мин; 72 °C 2 мин; 72 °C 2/7 (RAPD/ISSR) мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5/1,8 %-м (RAPD/ISSR) агарозном геле с добавлением бромистого этидия и фотографировали в системе GelDoc (Bio-Rad). Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно маркера МЗ (100 bp DNA Ladder).

Для оценки уровня полиморфизма маркеров и определения уровня дивергенции между изученными генотипами полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одинаковой длины рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. Для построения дендрограммы применяли метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы TREECON (version 1.3b) (Van De Peer, De Wachter, 1994). Генетические дистанции между образцами тритикале рассчитывали по Нею (Nei, Li, 1979).

Результаты и обсуждение

ISSR-маркеры с успехом использовались для оценки полиморфизма у таких культур, как кукуруза (Kantety *et al.*, 1995), пшеница (Nagaoka, Ogihara, 1997), ячмень (Fernandez *et al.*, 2002). В настоящей работе ISSR-анализ проводили с использованием праймеров, для которых, согласно литературным данным, показана высокая информативность при анализе геномов злаков (Sozen, 2010).

Все ISSR-праймеры дали воспроизводимый результат со всеми изученными образцами яровой тритикале. В целом учитывалось 86 амплифицированных фрагментов, 69 из которых были полиморфными (табл. 1).

Основная зона распределения фрагментов располагалась в диапазоне 300–1500 п.н., при этом большая часть полиморфных фракций (52,2 %) находилась в области 500–1000 п.н. Каждый из образцов имел свой определенный спектр амплифицируемых фрагментов, отличающийся от таковых у других образцов количеством, размером и степенью выраженности. Число локусов, полученных при амплификации ДНК исследованных образцов с каждым из

праймеров, варьировало от 7 до 24. Среднее их число на праймер составило 12,3. Максимальное количество полиморфных фрагментов (24) получено в результате амплификации с праймером ISSR2 (рис. 1, а), минимальное (7) – с ISSR11. Установлено широкое варьирование количества полиморфных ISSR-локусов у изученных форм тритикале в зависимости от праймера: от 40 до 100 %. В среднем уровень полиморфизма, выявленный ISSR-анализом, составил 80,2 %. Наибольшая частота встречаемости полиморфных локусов отмечена при использовании ISSR24 (рис. 1, б).

Следует отметить, что в группе праймеров с динуклеотидным повтором наибольшую информативность проявили праймеры с повтором (AC)₈ - ISSR4 и ISSR24 (табл. 1). Праймеры ISSR10 и ISSR11, имеющие в своем составе повтор (AG)₈ демонстрировали различный уровень полиморфизма (40,0 и 71,4 % соответственно). Один из праймеров, ISSR9, содержал повтор (GA)₈, и выявил 44,4 % полиморфных

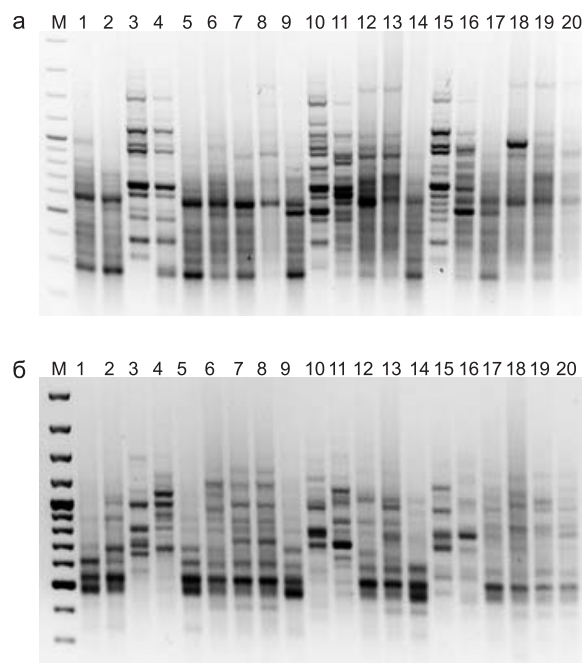


Рис. 1. Электрофоретические спектры ISSR фрагментов 20 образцов яровой тритикале: праймер ISSR2 (а), праймер ISSR24 (б).

М – маркер молекулярного веса, 1 – Узор, 2 – Матейко, 3 – Ульяна, 4 – Лотос, 5 – Ванад, 6 – Дублет, 7–12 – линии из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино), 13–20 – линии, созданные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск).

фрагмента у изученных образцов яровой тритикале. Согласно литературным данным (Sofalian *et al.*, 2008), праймеры с динуклеотидным повтором (GA)_n, как правило, показывают наиболее низкий уровень полиморфизма, что согласуется с данными, которые получены нами.

ДНК 20 образцов яровой тритикале проанализированы также с использованием RAPD-праймеров (табл. 1). RAPD-анализ широко используется для изучения генетического полиморфизма растений (Welsh, McClelland, 1990; Salem *et al.*, 2007). В данном исследовании RAPD-анализ проводили с высокополиморфными праймерами, отобранными на основании литературных данных (Nimbal *et al.*, 2009). С помощью 5 RAPD-праймеров выявлены 69 амплифицированных фрагментов, из которых 62 (89,9 %) были полиморфными. Полученные RAPD-спектры состояли из 9–18 ампликонов длиной 200–2000 п.н. В среднем у образцов яровых тритикале один праймер инициировал синтез 13 фрагментов ДНК. Наибольшее число полиморфных ПЦР-локусов получено при амплификации с праймером OPC-05 (рис. 2). Следует отметить, что данный праймер обнаружил 100 %-й полиморфизм между проанализированными образцами тритикале. Частота встречаемости полиморфных фрагментов для изученного материала была достаточно высокой и варьировала от 77,8 до 100 %, в зависимости от праймера и в среднем составила 89,9 %.

Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании данных ISSR- и RAPD-праймеров оказался достаточно информативным методом, который позволил различить образцы яровых тритикале. На основе полученных результатов была построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала (рис. 3).

Все проанализированные генотипы четко разделились на два кластера, содержащих 15 и 5 образцов соответственно. Первый кластер в свою очередь состоит из двух подкластеров, больший из которых включает две группы образцов. В одну группу вошли сорта польской селекционно-семеноводческой фирмы «Danko Hodowla Roslin Sp. z o.o.» (Ванад, Дублет и Матейко) наряду с линиями из Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию: МАН-17568, Vogo-47, Г-114. Данные линии

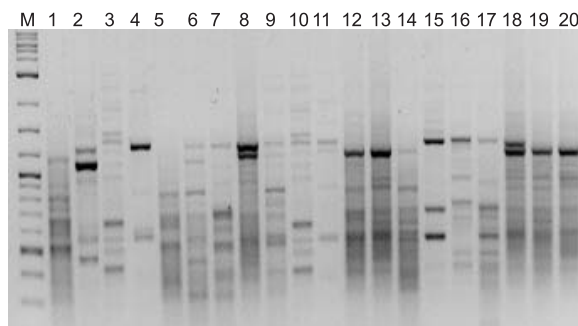


Рис. 2. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 20 образцов яровой тритикале (праймер OPC-05).

М – маркер молекулярного веса, 1 – Узор, 2 – Матейко, 3 – Ульяна, 4 – Лотос, 5 – Ванад, 6 – Дублет, 7–12 – линии из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино), 13–20 – линии, созданные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск).

были созданы на основе сорта тритикале польской селекции Вого, что объясняет объединение их в одну группу с польскими сортами. Вторую группу сформировали образцы тритикале, полученные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в результате гибридизации изогенных по локусам *Vrn1–Vrn3* линий и сортов мягкой пшеницы с диплоидной озимой рожью Восход и яровой аллоплазматической рожью. Сорт тритикале Узор, созданный в Научно-практическом центре НАН Беларуси по земледелию, формирует отдельную ветвь в данном подкластере, что может указывать на его обособленность от других образцов. Во втором подкластере группируются только два образца, синтезированные на основе линий пшеницы Мироновская 808-13, TD D и аллоржи.

Второй небольшой кластер объединил в себе материал только белорусской селекции, в котором сорт Лотос группировался с линией Г-80, а сорт тритикале Ульяна – с линией Г-225, что говорит об их генетическом сходстве. Линия TD B × Восход, созданная в Институте генетики и цитологии, входила в один подкластер с сортом Ульяна и линией Г-225.

Необходимо отметить, что наименьшие значения генетических дистанций выявлены между линиями тритикале, созданными на основе изогенных по генам *Vrn1–Vrn3* линий мягкой пшеницы и яровой аллоплазматической ржи. Так, между образцами TD B × аллорожь и

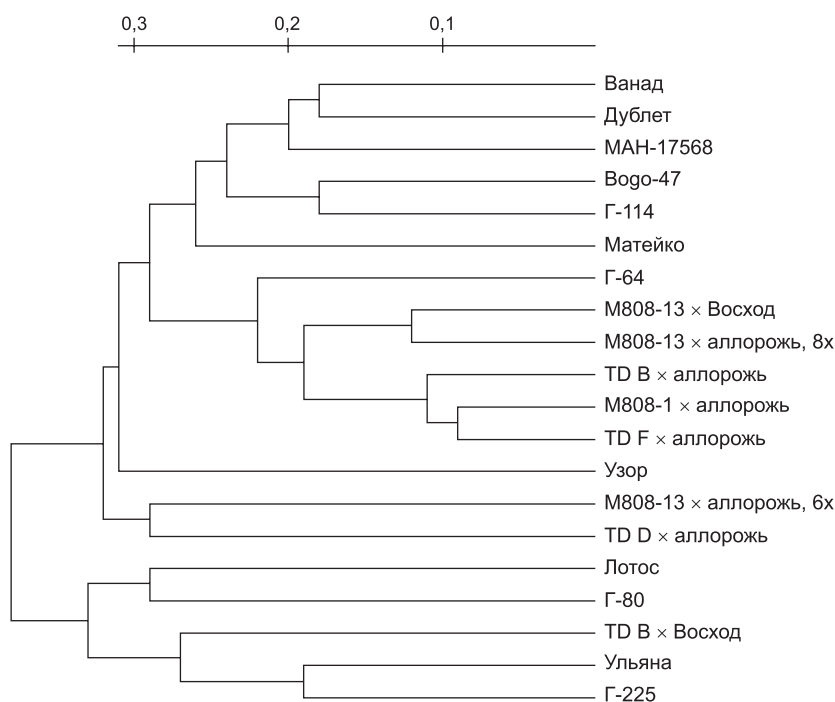


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства образцов яровой тритикале, построенная на основе результатов ISSR- и RAPD-анализов.

TD F × аллорожь генетическая дистанция составила 5,69, между TD F × аллорожь и Мироновская 808-1 × аллорожь – 6,98, между TD В × аллорожь и Мироновская 808-1 × аллорожь – 7,81. Большим генетическим сходством обладали также сорта польской селекции Ванад и Дублет (10,26). По данным ISSR- и RAPD-анализа, существенные различия обнаружены между линиями тритикале, созданными в Институте генетики и цитологии, и сортами яровой тритикале как белорусской, так и польской селекции. Самые большие генетические расстояния отмечены между линией TD В × Восход и сортами Ванад, Узор, Матейко и Дублет (42,28–47,17). С целью получения гетерозисных гибридов для скрещивания отобраны наши линии Мироновская 808-13 × Восход, М808-1 × аллорожь, TD D × аллорожь, TD F × аллорожь, TD В × Восход и сорта Ванад, Дублет, Матейко и Узор.

Заключение

Использованные для изучения молекулярно-генетической гетерогенности 20 образцов яровой тритикале ISSR- и RAPD-праймеры выявили высокий уровень полиморфизма

(в среднем 80,2 и 89,9 % соответственно), что позволило сгруппировать образцы ярового тритикале по степени генетического родства и подобрать генетически удаленные родительские пары для скрещиваний с целью получения гибридов с эффектом гетерозиса.

Литература

- Генетические основы селекции растений: В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений / Ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. Минск: Беларус. навука, 2010. 579 с.
- Bernardo R. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids // Crop Sci. 1994. V. 34. No 1. P. 20–25.
- Diers B.W., Mcvetty P.B.E., Osborn T.C. Relationship between heterosis and genetic distance based on RFLP markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.) // Crop Sci. 1996. V. 36. No 1. P. 79–83.
- Fabrizius M.A., Busch R.H., Khan K., Huckle L. Genetic diversity and heterosis of spring wheat crosses // Crop Sci. 1998. V. 38. No 4. P. 1108–1112.
- Fernandez M.E., Figueiras A.M., Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 845–851.
- Fischer S., Maurer H.P., Würschum T. *et al.* Development of heterotic groups in Triticale // Crop Sci. 2010. V. 50. No 2. P. 584–590.

- Goral H., Tyrka M., Spiss L. Assessing genetic variation to predict the breeding value of winter triticale cultivars and lines // J. Appl. Genet. 2005. V. 46. P. 125–131.
- Kantety R.V., Zeng X.P., Bennetzen J.L., Zehr B.E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification // Mol. Breeding. 1995. V. 1. P. 365–373.
- Kuleung C., Baenziger P.S., Kachman S.D., Dweikat I. Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers // Crop Sci. 2006. V. 46. P. 1692–1700.
- Nagaoka T., Ogiwara 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. V. 94. P. 597–602.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. No 10. P. 5269–5273.
- Nimbal S., Behl R.K., Chhabra A.K. RAPD analysis for genetic polymorphism in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes varying for grain protein content // The South Pacific J. Nat. Sci. 2009. V. 27. P. 49–56.
- Oettler G., Tams S.H., Utz H.F. *et al.* Prospects for hybrid breeding in winter triticale: Heterosis and combining ability for agronomic traits in European elite germplasm // Crop Sci. 2005. V. 45. No 4. P. 1476–1482.
- Salem H.H., Ali B.A., Huang T.-H. *et al.* Use of random amplified polymorphic DNA analysis for economically important food crops // J. Integr. Plant Biol. 2007. V. 49. No 12. P. 1670–1680.
- Sofalian O., Chaparzadeh N., Javanmard A., Hejazi M.S. Study the genetic diversity of wheat landraces from northwest of Iran based on ISSR molecular markers // Int. J. Agric. Biol. 2008. V. 10. No 3. P. 466–468.
- Sozen E. Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among winter triticale (*× Triticosecale* Wittmack) cultivars // Pak. J. Bot. 2010. V. 42. No 4. P. 2755–2763.
- Tams S.H., Melchinger A.E., Bauer E. Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data // Plant Breed. 2005. V. 124. No 3. P. 154–160.
- Tams S.H., Bauer E., Oettler G. *et al.* Prospects for hybrid breeding in winter triticale: II. Relationship between parental genetic distance and specific combining ability // Plant Breed. 2006. V. 125. No 5. P. 331–336.
- Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 7213–7218.
- Van De Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.

EVALUATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF SPRING TRITICALE ACCESSIONS (*× TRITICOSECALE* WITTMACK) BASED ON RAPD AND ISSR MARKERS

О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева

Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by

Summary

Molecular heterogeneity was studied in 20 spring triticale accessions by using ISSR and RAPD markers. The study revealed a high level of polymorphism (80,2 % and 89,9 %, respectively, on the average), which allowed the studied triticale accessions to be grouped according to the degree of genetic relationship and to choose genetically distant parental pairs for crosses to obtain heterotic hybrids.

Key words: triticale, RAPD and ISSR markers, heterosis.