

УДК 577.21:633.11

DOI: <http://dx.doi.org/10.14258/turczaninowia.16.3.21>

М.Г. Куцев¹
М.В. Скапцов¹
М.А. Холодкова¹
М.С. Иванова¹
С.В. Смирнов¹
Т.А. Синицына¹
Н.В. Фризен^{1,2}

M.G. Kutsev
M.V. Skaptsov
M.A. Kholodkova
M.S. Ivanova
S.V. Smirnov
T.A. Sinitsyna
N.V. Friesen

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAF-АНАЛИЗА ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ СОРТОВ МЯГКОЙ И ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦ

USING RANDOMLY AMPLIFIED DNA FINGERPRINTING (RAF) FOR GENOTYPING COMMON AND DURUM WHEATS VARIETIES (*TRITICUM DURUM* AND *T. AESTIVUM*)

Аннотация. В сообщении анализируется подход для генотипирования сортов мягкой и твердой пшеницы сибирской селекции. Показано, что при использовании RAF-анализа сорта твердых и мягких пшениц достоверно распределяются в отдельные кластеры с небольшим перекрытием. Однако чистота семенного материала не позволяет определять конкретные сорта достаточно точно, без использования в качестве поверочного контроля эталонных образцов.

Ключевые слова: генотипирование, RAF, сорта, пшеница.

Summary. The report analyzes the approach to genotyping varieties of common and durum wheat. It is shown that using of RAF-analysis 2 separate clusters of common wheat varieties and durum wheat varieties with little overlap. However, the purity of seeds doesn't allow us to determine the specific varieties for sure without the use of reference samples.

Key words: genotyping, RAF, grades, *Triticum*.

Для реализации проекта по генотипированию сортов культурных и культиваров дикорастущих растений мы использовали различные подходы. Секвенирование ДНК – недостаточно удобный способ идентификации сортов растений, т. к. отличия в маркерных не кодирующих участках минимальны; к тому же, полногеномное секвенирование пока еще требует значительных материальных затрат. Одним из приемлемых способов генотипирования сортов растений является фрагментный анализ. Для генотипирования сортов пшеницы были использованы различные варианты фрагментного анализа.

Метод RAF (randomly amplified DNA fingerprinting) является вариантом DAF-метода (DNA amplification fingerprinting) – воспроизводства большого количества коротких фрагментов ДНК (до 1000 пар нуклеотидов длиной) и характеризуется более высокой надежностью, повторяемостью и чувстви-

тельностью ДНК-маркеров. В отличие от RAPD и DAF, RAF-анализ позволяет выявить максимально малые количества амплифицированного фрагмента и обладает низкой чувствительностью к чистоте ДНК. RAF-маркеры обычно выявляют доминантное наследование, но значительная часть выявляет и кодоминантное наследование, и микросателлитные локусы (Waldron et al., 2002).

Материалы и методы. Материалом для выделения ДНК послужили образцы зерновок четырех сортов твердой яровой пшеницы: «Жемчужина Сибири», «Памяти Янченко», «Алейская 50», «Омский Изумруд» и пяти сортов мягкой яровой пшеницы: «Сибирский Альянс», «Новосибирская 15», «Алтайская 530», «Гюменская 30» и «Сударыня» (табл.). Ранее эти же сорта мы изучали для сравнительного анализа количественного содержания ретротранспозона Tu1-сорга относительно общего размера генома (Куцев и др., 2012).

¹Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия; e-mail: serg_sm@mail.ru

²Оснабрюкский университет, ботанический сад, Альбрехтштрассе, 29; 49076, Оснабрюк, Германия; e-mail: friesen@biologie.uni-osnabrueck.de

¹Altai State University, Lenina str., 61; 656049, Barnaul, Russia

²Botanical Garden, University of Osnabrück, Albrechtstrasse 29; 49076, Osnabrück, Germany

Таблица

Характеристика сортов пшениц, использованных в анализе

№	Название	Оригинатор	Происхождение	Использование
Мягкие сорта				
1	Алтайская 530	ГНУ Алтайский НИИСХ	(Лютесценс 281 × К-54975) × Лютесценс 281	Включен в госреестр в 2007 г.
2	Сибирский Альянс	ГНУ Алтайский НИИСХ, ГНУ Кемеровский НИИСХ	(Лютесценс 281 × к-54975) × Лютесценс 281	Включен в госреестр в 2012 г.
3	Сударыня	ГНУ Владимирский НИИСХ	Разновидность: лютесценс	На испытаниях с 2009 г.
4	Новосибирская 15	ГНУ Сибирский НИИСХ	[(Безенчукская 98 × Иртышанка 10) × Тулунская 10] × Новосибирская 22	Включен в госреестр в 2003 г.
5	Тюменская 80	Тюменский СХИ, ГНУ НИИСХ Северного Зауралья	Безостная 1 × Саратовская 29	Районирован в 1985 г.
Твердые сорта				
6	Омский изумруд	ГНУ Сибирский НИИСХ	Гордеиформе 94-8-5 × Омская янтарная*	На испытаниях с 2010 г.
7	Алейская	ГНУ Алтайский НИИСХ	(Алтайская Нива х НТ-7) × Алтайская Нива	Включен в госреестр в 2005 г.
8	Жемчужина Сибири	ГНУ Сибирский НИИСХ	[(Антей × Леукурум 6953) × (Алмаз × Омский рубин)] × Светлана	Включен в госреестр в 2006 г.
9	Памяти Янченко	ГНУ Алтайский НИИСХ	Гордеиформе 235 × Зарница Алтая	Включен в госреестр в 2012 г.

Примечание: *Омская янтарная = Гордеиформе ЕК27-1-1 × Гордеиформе 3Л35-2.

Для выделения и очистки ДНК из растительного материала использованы наборы реагентов DiamondDNA (ООО «АБТ», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Праймеры. Для подбора праймеров проводили экспериментальную амплификацию. Для подбора использовали праймеры серий А – 01-10 и RAF – К-01, К-01а, К-01b, К-02, К-02а, К-02b, из которых для дальнейшего анализа был выбран праймер RAF К-02а.

Для RAF-анализа использовалось 10 образцов растений каждого сорта. Амплификация осуществлялась на термоциклере MyCycler (Bio-Rad, USA). Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 25 мкл содержала: 2 мкл ДНК образца, по 2,5 мкл 10х буфера и 25 ммоль MgCl₂, 2 мкл 10-миллимолярного раствора праймера, 1 мкл 5-миллимолярного раствора нуклеотидной смеси. Использовалась программа RAF: денатурация 94,0° С в течении 5 мин., 35 циклов в следующей повторности: 94,0° С на 30 сек., 57,0° С на 1 мин., 56,0° С на 1 мин., 55,0° С на 1 мин., 54,0° С на 1 мин., 53,0° С на 1 мин.; затем 72,0° С на 10 мин. и снижение температуры до 4,0° С.

Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофорезом на чипах с помощью автоматической электрофорезной станции Expression (Bio-Rad, USA).

В ходе анализа составляли матрицу для фенетического анализа в программе Microsoft Excel на основе присутствия (1) или отсутствия (0) фрагментов одинаковой длины, что определялось прикладыванием линейки для каждого образца на фотографии электрофорезного геля.

Для дальнейшего анализа электрофорезных профилей использовалось 153 фрагмента для 9 сортов, по 10 образцов каждого сорта.

Матрицу анализировали с помощью программы для фенетического анализа NTSYS-рc, Numerical Taxonomy System, version 2.1: парные генетические расстояния были посчитаны, используя коэффициент Линча (Lynch, 1990), на основе которого данные были обработаны методом UPGMA. Многомерное шкалирование (multidimensional scaling) (Kruskal, 1964) также проведено в программе NTSYS-рc.

Результаты и обсуждение. Проблема генотипирования сортов и картирования генотипов пшениц важна не только для эффективной селекции, но и для защиты правообладателей коммерческих сортов. Для быстрого и надежного различения и идентификации генетических ресурсов растений возникла необходимость анализа полиморфизма на генетическом уровне. Наиболее перспективным подходом для анализа генетического разнообразия представляется ис-

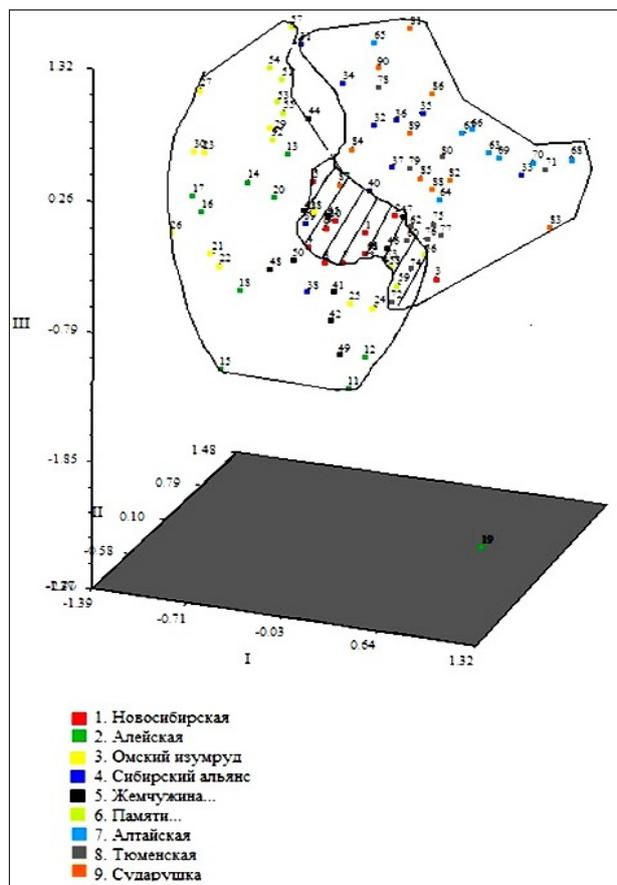


Рис. Кластерный анализ данных RAF-анализа (заштрихованная область визуализирует перекрытие твердых и мягких сортов).

пользование методов молекулярной генетики, основанных на анализе полиморфизма ДНК (RAPD, AFLP, SSR, SNP и т. п.), позволяющих получить индивидуальную характеристику отдельного генотипа – ДНК-профиль (Абугалиева и др., 2012; Agarwal, Shrivastava, Padh, 2008). Однако эффективность применения таких методов

ограничивается рядом обстоятельств: во-первых, важно понимать, что большинство сортов пшениц не являются полностью генетически однородными; во-вторых, чувствительность некоторых методов не позволяет эффективно разделять разные сорта в пределах одной селекционной линии. Например, было показано, что использование маркеров RAPD и RFLP неприемлемо или малоэффективно для генотипирования сортов пшеницы (Chao et al., 1989; Penner et al., 1995). В наших собственных исследованиях (неопубл.) мы столкнулись с проблемой невозможности различения близких сортов ячменей при использовании микросателлитных маркеров.

RAF-анализ, проведенный нами, показал (рис.), что метод позволяет определить внутрисортную изменчивость. При этом все изученные сорта показали достаточно высокую генетическую изменчивость.

При кластеризации достаточно четко графически локализируются сорта твердых и мягких пшениц с небольшим перекрытием.

Однако при установлении сортовой принадлежности обязательным требованием является наличие для контроля эталонных (проверочных) сортовых образцов. В то же время, метод достаточно чувствителен для разделения родственных линий, что видно на следующем примере: кластеризация сортов Сибирский Альянс и Алтайская, являющихся гибридными линиями одних и тех же родителей ((Лютесценс 281 × к-54975 США) × Лютесценс 281), не перекрываются.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, проект 14.В37.21.0848.

ЛИТЕРАТУРА

- Абугалиева С.И., Волкова Л.А., Ермекаев К.А., Турусбеков Е.К.* Генотипирование коммерческих сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана с использованием микросателлитных ДНК-маркеров // Биотехнология. Теория и практика, 2012. – № 2. – С. 35–45.
- Куцев М.Г.* Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. – Барнаул, АРТИКА, 2009. – 164 с.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H.* Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences // Plant Cell Reports, 2008. – Vol. 27. – P. 617–631.
- Chao S., Sharp P.J., Worland A.J., Warham E.J., Koebner R.M.D., Gale M.D.* RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes // Theor. Appl. Genet., 1989. – № 78. – P. 495–504.
- Lynch M.* The similarity index and DNA fingerprinting // Molecular Biology and Evolution, 1990. – Vol. 7. – P. 478–484.
- Kruskal J.B.* Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method // Psychometrika, 1964. – Vol. 29. – P. 115–129.
- Penner G.A., Clarke J.M., Bezte L.J., Leisle D.* Identification of RAPD markers linked to a gene governing cadmium uptake in durum wheat // Genome, 1995. – Vol. 38. – P. 543–547.
- Waldron J., Peace C.P., Carroll B.J.* Randomly amplified DNA fingerprinting: a culmination of DNA marker technologies based on arbitrarily-primed PCR amplification // Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2002. – Vol. 2. – № 3. – P. 141–150.