

УДК 577.29

О. Ф. Мутерко¹, студент,**О. В. Галаєв**², канд. биол. наук, ст. науков. співроб.¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра генетики та молекулярної біології, пров. Шампанський, 2, Одеса, 65058, Україна, e-mail: muterko@gmail.com² Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААНУ, Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна, e-mail: genome2006@mail.ru

МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ПШЕНИЦІ В ПЛР-АНАЛІЗІ ГЕНОМУ *AEGILOPS CYLINDRICA* HOST

Визначалась можливість використання мікросателітних (МС) маркерів пшениці в ПЛР-аналізі геному *Aegilops cylindrica* Host. Протестовано 20 пар праймерів до 27 МС локусів пшениці на 23 лініях егілопсу. Виявлено 17 пар праймерів, за якими вдається отримати продукти ампліфікації в геномі егілопсу. За продуктами ампліфікації восьми з них вдалося виявити поліморфізм серед досліджуваних ліній. Обговорюється можливість використання мікросателітних маркерів пшениці для аналізу геному *Ae. cylindrica*.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, *Aegilops cylindrica*, поліморфізм, ПЛР-аналіз.

В наш час *Aegilops cylindrica* Host (егілопс циліндричний) розглядають як один із видів, що є перспективним джерелом збагачення геномів культурних злаків генами стійкості до різного роду фізичних, хімічних та біологічних стресорів [1—6]. А оскільки таке збагачення значно зменшує втрату врожаю зернових культур, то використання *Ae. cylindrica* в селекції має і економічний зиск. У зв'язку з тим, що останнім часом все частіше для поліпшення геному м'якої пшениці використовується генетичний пул *Ae. cylindrica*, існує значний інтерес в створенні молекулярно-генетичних карт геному *Ae. cylindrica* для ефективного їх використання: при оцінці потоку генів за гібридизації між пшеницею та егілопсом; у порівняльному картуванні геномів; для визначення локалізації господарсько-цінних генів; «головних» генів кількісних ознак (QTL (quantitative trait locus)), а також у вирішенні ряду інших прикладних та теоретичних завдань.

Ідентифікація інтрогресивних ділянок та визначення їх хромосомної локалізації в гібридних пшенично-егілопсних лініях вимагає, щоб маркери були картвані в геномах батьківських видів. На даний час немає інформації ні в літературних джерелах, ні в електронних базах даних про наявність молекулярно-генетичних карт *Ae. cylindrica* ($2n = 4x = 28$; геном CCDD), тоді як удосталь представлені карти геномів *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$; геном AABBDD) або *Ae. tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$; геном DD), отримані за допомогою різних маркерних систем [7—9].

Існує безліч методів отримання молекулярних маркерів для картування геномів рослин [10]. Однак одним з найбільш перспективних типів молекулярних ДНК-маркерів є мікросателітні маркери (SSR (simple sequence repeat)-маркери), які отримують в ході полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за участю специ-

фічних праймерів, що фланкують ділянки ДНК геному з короткими тандемними повторами нуклеотидів. Молекулярно-генетична карта *T. aestivum* налічує більше 2000 мікросателітних маркерів [8, 11—13]. Проте, не дивлячись на всі переваги SSR-маркерів, на сьогодні відсутні публікації про видоспецифічні мікросателітні локуси, які були б картовані в геномі *Ae. cylindrica* та в інших диких видах, а проблема їх власного картування полягає у високих економічних витратах.

Велика кількість пар праймерів до мікросателітів пшениці успішно використано для ампліфікації ДНК декількох близьких видів, таких як *Triticum diccoides* [14], *T. durum* [15], *Ae. squarrosa* [16] та *T. timopheevii* [17], а також видів *Aegilops* з секції *Sitopsis*, у тому числі *Ae. longissima*, *Ae. searsii* і *Ae. speltoides* [18]. SSR-маркери пшениці можуть бути ефективно використані для аналізу гібридів пшениці з *T. timopheevii* [17, 19], *Ae. squarrosa* [20], *Hordeum chilense* [21] та *Ae. cylindrica* [5]. Пшеничні SSR-маркери успішно застосовані для виявлення генетичного різноманіття видів [14, 16], картування агрономічно важливих генів [5, 17, 22, 23], у філогенетичних дослідженнях споріднених з пшеницею видів [18].

Метою дослідження було визначити можливість використання мікросателітних маркерів пшениці в дослідженні геному *Ae. cylindrica*.

Матеріали і методи досліджень

Матеріалом дослідження були 23 лінії місцевої (Одеської) популяції *Ae. cylindrica*, надані д-ром біол. наук, зав. відділом якості зерна (Селекційно-генетичний інститут — НЦНС, м. Одеса) А. І. Рибалкою.

ДНК виділяли з етиольованих паростків за допомогою СТАВ-буфера [24]. Реакційна суміш ПЛР об'ємом 12,5 мкл містила: 50 мМ КСl, 20 мМ трис-НСl (рН 8,4 при 25 °С), 2 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween-20; 0,15 мМ кожного dNTP; 0,2 мкМ кожного праймера; 10—20 нг ДНК, 1 од. Таq-полімерази.

ПЛР-аналіз проводили за допомогою 20 пар праймерів до 27 мікросателітних локусів м'якої пшениці, з відомою локалізацією на хромосомах (*Xgwm165-4A*, *Xgwm165-4B*, *Xgwm186-5A*, *Xgwm325-6D*, *Xgwm389-3B*, *Xgwm499-5B*, *Xgwm577-7B*, *Xgwm192-5D*, *Xgwm3-3D*, *Xgwm437-7D*, *Xgwm18-1B*, *Xgwm182-5D*, *Xgwm382-2A*, *Xgwm382-2B*, *Xgwm382-2D*, *Xgwm314-3D* [8]; *Xbarc88-5B*, *Xcfd7-5B*, *Xbarc286-5D*, *Xgwm443-5A*, *Xgwm443-5B*, *Xwmc31-1B*, *Xgwm66-3B*, *Xgwm66-4B*, *Xgwm66-5B*, *Xcfd48-1B*, *Xcfd48-1D*) [7].

Для ампліфікації використовували прилад «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) з параметрами ампліфікації згідно М. S. Roder [8] та GrainGenes [7]. Продукти ампліфікації фракціонували електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили шляхом їх фарбування 0,012 М AgNO₃ [25]. Молекулярну масу продуктів ампліфікації визначали відносно маркера pUC18/MspI за допомогою комп'ютерної програми «Image Master 1D Elite» (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Документували отримані електрофореграми відеосистемою VDS.

Результати досліджень та їх обговорення

Під час дослідження було протестовано 20 пар праймерів до 27 мікросателітних локусів м'якої пшениці на ДНК 23 ліній *Ae. cylindrica*. В результаті ПЛР-аналізу, за 17 парами праймерів вдалося отримати продукти ампліфікації в усіх досліджуваних лініях егілопсу, загалом ампліфікується 24 локуси, при цьому 4 з них (16,7 %) картовані в геномі А (*Xgwm165-4A*, *Xgwm186-5A*, *Xgwm*

443-5A, *Xgwm382-2A*), 12 (50 %) в геномі В (*Xcfd7-5B*, *Xbarc88-5B*, *Xgwm499-5B*, *Xgwm165-4B*, *Xcfd48-1B*, *Xgwm66-3B*, *Xgwm66-4B*, *Xgwm66-5B*, *Xgwm443-5B*, *Xwmc31-1B*, *Xgwm18-1B*, *Xgwm382-2B*) та 8 (33,3 %) в геномі D (*Xgwm325-6D*, *Xcfd48-1D*, *Xgwm192-5D*, *Xgwm3-3D*, *Xgwm437-7D*, *Xgwm182-5D*, *Xgwm382-2D*, *Xgwm314-3D*) пшениці (табл. 1).

Таблиця 1

ПЛР-аналіз 23 ліній *Ae. cylindrica* за 27 мікросателітними локусами пшениці

Геном пшениці	Кількість МС локусів пшениці	Кількість МС локусів, що детектуються в геномі <i>Ae. cylindrica</i>	Кількість поліморфних МС локусів в геномі <i>Ae. cylindrica</i>
Геном А	4	4	0
Геном В	14	12	2
Геном D	9	8	6
Загалом:	27	24	8

Серед 24 локусів, що ампліфікуються в геномі *Ae. cylindrica*, при використанні 17 пшеничних пар праймерів, тільки за 8 з них (33,3 %) виявлено поліморфізм серед 23 ліній егілопсу. Фланкуються ці локуси парами праймерів: *BARC88-5B*, *WMS18-1B*, *WMS314-3D*, *WMS382-2D*, *WMS3-3D*, *WMS192-5D*, *WMS182-5D*, *WMS437-7D*.

Слід зазначити, що низький відсоток поліморфізму, вочевидь, пов'язаний з близькою спорідненістю ліній егілопсу, які фактично є представниками однієї популяції. Як відомо, ступінь поліморфності серед представників однієї популяції завжди значно нижче поліморфності між представниками різних популяцій, саме тому можна вважати, що при ПЛР-аналізі представників виду *Ae. cylindrica* з різних популяцій слід чекати більшого поліморфізму.

Відомо, що основними критеріями придатності ДНК маркера для його використання в процесі генетичного картування є, по-перше, здатність маркера до детекції в геномі, що картується, та по-друге, маркер повинен бути поліморфним, тобто можлива реєстрація поліморфізму за цим маркером серед окремих представників виду. Саме виявлена під час дослідження здатність МС маркерів пшениці до детекції в геномі *Ae. cylindrica* та встановлений поліморфізм серед представників популяції егілопсу за декількома з цих маркерів дозволяють припустити можливість використання мікросателітних маркерів пшениці для картування геному *Ae. cylindrica*. Для підтвердження чи спростування цього припущення необхідно провести картування хоча б одного гена (або групи зчеплення) *Ae. cylindrica* з використанням МС маркерів пшениці.

Не вирішеним залишається питання стосовно природи ампліфікованих в геномі егілопсу фрагментів. Грунтуючись на тому, що споріднені види злаків мають гомеологічні мікросателітні послідовності, ми припускаємо, що в геномі егілопсу ампліфікується саме мікросателітна ДНК, до того ж розміри отриманих в ході ПЛР геному егілопса фрагментів близькі до розмірів фрагментів, отриманих в ході ПЛР геному пшениці з використанням аналогічних праймерів (див. рис. 1).

Та для підтвердження цього припущення необхідне секвенування ампліфікованих в ході ПЛР ділянок ДНК *Ae. cylindrica*.

Висновки

1) Показана здатність пар праймерів до мікросателітних локусів пшениці давати в ході ПЛР-аналізу продукти ампліфікації в геномі *Ae. cylindrica*.

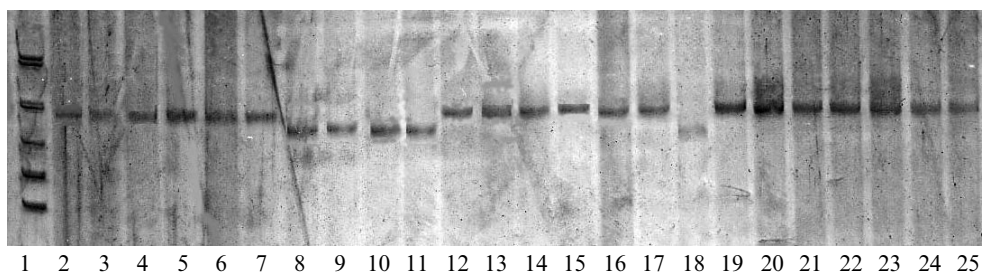


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній *Ae. cylindrica* та м'якої пшениці за пшеничним мікросателітним маркером BARC88-5B:

1 — маркер молекулярної ваги pUC18/MspI, 2—24 — лінії *Ae. cylindrica*, 25 — м'яка пшениця

2) Виявлено поліморфізм серед досліджуваних 23 ліній *Ae. cylindrica* за восьми з 24 локусів, що ампліфікуються в ході ПЛР-аналізу з використанням МС маркерів пшениці.

Література

1. Бабаянц Л. Т., Рибалка О. І., Аксельруд Д. В. Нове джерело стійкості пшениці до основних хвороб // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України: Зб. наук. пр. — Одеса, 1996. — С. 111—116.
2. Hanson D. E., Ball D. A., Mallory-Smith C. A. Herbicide resistance in jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*): Simulated responses to agronomic practices // Weed Tech. — 2002. — Vol. 16. — P. 156—163.
3. Singh S., Franks C. D., Huang L., Brown-Guedira G. L., Marshall D. S., Gill B. S., and Fritz A. Lr41, Lr39, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS // Theor. Appl. Genet. — 2004. — Vol. 108 (4). — P. 586—91.
4. Галаєв А. В., Бабаянц Л. Т., Сиволян Ю. М. Молекулярне картирование и маркирование перенесенного от *Aegilops cylindrica* в мягкую пшеницу гена устойчивости к твердой головне // Цитология и генетика. — 2006. — Т. 40 (2). — С. 3—11.
5. Perez-Jones A., Mallory-Smith C. A., Zemetra R. S., Watson C. J. Introgression of a strawbreaker foot rot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) resistance gene from winter wheat (*Triticum aestivum*) into jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) // Crop Sci. — 2006a. — Vol. 46. — P. 2155—2160.
6. Perez-Jones A., Mallory-Smith C. A., Hansen J. L., Zemetra R. S. Introgression of an imidazolinone-resistance gene from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) into jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host) // Theor. Appl. Genet. — 2006. — Vol. 114 (1). — P. 177—86.
7. GrainGenes: A Genomic Database // Режим доступу: (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).
8. Roder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P., Ganal M. W. A microsatellite map of wheat // Genetics. — 1998. — Vol. 149 (4). — P. 2007—2023.
9. Boyko E., Kalendar R., Korzun V., Fellers J., Korol A., Schulman A. H., Gill B. S. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function // Plant Mol. Biol. — 2002. — Vol. 48(5—6). — P. 767—790.
10. Semagn K., Bjornstad A., Ndjiondjop M. N. An overview of molecular marker methods for plants // African Journal of Biotechnology. — 2006. — Vol. 5 (25). — P. 2540—2568.
11. Bryan G. J., Collins A. G., Stephenson P., Orry A., Smith J. B., Gale M. D. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat // Theor. Appl. Genet. — 1997. — Vol. 94. — P. 557—563.

12. Pestsova E., Ganal M. W., Rüdger M. S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat // *Genome*. — 2000. — Vol. 43. — P. 689—697.
13. Röder M. S., Huang X. Q., Ganal M. W. Wheat microsatellites in plant breeding-potential and implications / In: *Molecular markers in plant breeding*. Edited by H. Loerz and G. Wenzel. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. — 2004. — P. 255—266.
14. Fahima T., Rüdger M., Grama A., Nevo E. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — Vol. 96. — P. 187—195.
15. Korzun V., Röder M., Wendehake K., Pasqualone A., Lotti C., Ganal M. W., Blanco A. Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid bread wheat into a genetic linkage map of durum wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — Vol. 98. — P. 1202—1207.
16. Pestsova E., Korzun V., Goncharov N. P., Hammer K., Ganal M. W., Röder M. S. Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — Vol. 101. — P. 100—106.
17. Salina E. A., Leonova I. N., Rüdger M. S., Laikova L. I., Maystrenko O. I., Budashkina E. B., Shumny V. K. Wheat microsatellites: the prospects of application for gene mapping and analysis of the reconstructed genomes // *Rus. J. Physiol.* — 2001. — Vol. 48. — P. 377—381.
18. Sourdille P., Tavaud M., Charmet G., Bernard M. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes // *Theor. Appl. Genet.* — 2001. — Vol. 103. — P. 346—352.
19. Leonova I. N., Röder M. S., Budashkina E. B., Kalinina N. P., and Salina E. A. Molecular analysis of leaf rust resistant introgression lines obtained by crossing of hexaploid wheat *Triticum aestivum* with tetraploid wheat *Triticum timopheevii* // *Rus. J. Genet.* — 2002. — Vol. 38. — P. 1397—1403.
20. Pestsova E. G., Börner A., Röder M. S. Development of wheat D-genome introgression lines assisted by microsatellite markers // *Proceedings of the 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, 10—12 September, 2001*. Edited by Hernández P., Moreno M. T., Cubero J. I., Martín A., Junta de Andalucía, Consejera de Agricultura y Pesca, Cordoba, Spain. — 2002. — P. 207—210.
21. Hernandez P., Laurie D. A., Martin A., Snape J. W. Utility of barley and wheat simple sequence repeat (SSR) markers for genetic analysis of *Hordeum chilense* and tritordeum // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — Vol. 104. — P. 735—739.
22. Korzun V., Rüdger M. S., Ganal M. W., Worland A. J., Law C. N. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — Vol. 96. — P. 1104—1109.
23. Xie C., Sun Q., Ni Z., Yang T., Nevo E., Fahima T. Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — Vol. 106. — P. 341—345.
24. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (Научно-методическое руководство) Под. ред. Ю. М. Сиволапа. — К.: Аграрна наука, 1998. — 156 с.
25. *Promega Technical Manual*. — USA Gene Print. STR Systems. — 1999. — Vol. 7. — P. 52.

А. Ф. Мутерко¹, **А. В. Галаев**²

¹ Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
биологический факультет, кафедра генетики и молекулярной биологии;
пер. Шампанский, 2, Одесса, 65058, Украина,
e-mail: muterko@gmail.com

² Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААНУ,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина,
e-mail: genome2006@mail.ru

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ПШЕНИЦЫ В ПЦР-АНАЛИЗЕ ГЕНОМА *AEGILOPS CYLINDRICA* HOST

Резюме

Определялась возможность использования микросателлитных (МС) маркеров пшеницы в ПЦР-анализе генома *Aegilops cylindrica* Host. Протестировано 20 пар праймеров к 27 МС локусам пшеницы на 23 линиях *Ae. cylindrica*. Обнаружено 17 пар праймеров, по которым удается получить продукты амплификации в геноме эгилопса. По продуктам амплификации восьми из них удалось обнаружить полиморфизм среди исследуемых линий. Обсуждается возможность использования МС маркеров пшеницы для исследования генома *Ae. cylindrica*.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, *Aegilops cylindrica*, полиморфизм, ПЦР-анализ.

A. F. Muterko¹, **A. V. Galaev**²

¹ Odesa National Mechnykov University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: muterko@gmail.com

² South Plant Biotechnology Center Ukrainian National Academy of Agrarian Science,
Ovidiopolska str., 3, Odesa, 65036, Ukraine,
e-mail: genome2006@mail.ru

THE POSSIBILITY OF USING MICROSATELLITE MARKERS OF WHEAT FOR GENOME PCR-ANALYSIS'S OF *AEGILOPS CYLINDRICA* HOST

Summary

Ability of using microsatellite markers of wheat in the genome mapping *Aegilops cylindrica* was investigated. It is tested 20 pair primers of wheaten MC markers on 23 lines *Ae. cylindrica*. 17 pair primers detected amplification products in genome egilops, 8 of them has appeared polymorphic. The possibility using of wheat microsatellite markers for analysys's of genome *Ae. cylindrica* were discus. sed.

Key words: molecular markers, *Aegilops cylindrica*, polymorphism, PCR-analysis.