

УДК 575:116:633.16:557.1

Балашова И. А.¹, научн. сотр., **Файт В. И.**², канд. биол. наук, зав. отд. генетики, **Сиволап Ю. М.**¹, д-р биол. наук, академик УААН, директор

¹Южный биотехнологический центр в растениеводстве и МАИ Украины, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина

²Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения,

Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина.

МАРКИРОВАНИЕ ГЕНА *Ppd-D1a* МЕТОДОМ ISSR-ПЦР

Для маркирования генов, отвечающих за чувствительность к фотопериоду, в частности генов *Ppd-D1a*, применяли ISSR-ПЦР. Маркером к гену *Ppd-D1a* является отсутствие продукта амплификации — нулевой аллель 350(-). Гомозиготные по *Ppd-D1a* генотипы идентифицированы по выявлению нулевого ISSR-аллеля 350(-).

Ключевые слова: ISSR-ПЦР, *Ppd-D1a*-генотипы, полиморфизм ДНК.

Возделывание мягкой пшеницы в разных агроклиматических регионах обусловлено широкими возможностями этой культуры к адаптации, которая в значительной степени определяется генетическим разнообразием по скорости развития (колошения). Система генов *Ppd* (фотопериодическая чувствительность) обуславливает до 20 % вариабельности по времени колошения [1]. Для создания сортов, устойчивых к стрессовым воздействиям на разных стадиях развития, необходимо отбирать из гибридных популяций приспособленные к определённым климатическим условиям формы, обладающие определённым набором генов *Ppd* [2]. Сложность отбора продуктивных *Ppd*-генотипов требует внедрения методов идентификации соответствующих генов в используемом селекционном материале. Развитие методов молекулярно-генетического анализа показало широкие возможности создания ДНК-маркеров к индивидуальным генам, в том числе к генам *Ppd* [3]. Создание и использование маркеров в селекционных программах будет способствовать выведению новых высоко продуктивных сортов, адаптированных к конкретным природно-климатическим условиям региона возделывания сортов мягкой пшеницы. В настоящей работе рассматривается возможность получения ДНК-маркера к гену *Ppd-D1a* ISSR-ПЦР.

Материалы и методы

В качестве исходного материала для маркирования генов *Ppd* использовали чувствительные к фотопериоду сорта (рецессивы по *ppd-A1b*, *ppd-B1b*, *ppd-D1b*): Mercia, Avalon, Norman, Brimstoun, Brigand, Rendezvous; слабочувствительный к фотопериоду сорт Ciano-67, носитель доминантного аллеля гена *Ppd-D1a*; замещенные линии по хромосоме второй гомологичной группы, созданные в генофоне сорта Mercia (Mercia/2D RCM-71 (*Ppd-D1a*),

Mercia/2B Chienese Spring (*Ppd-B1a*), Mercia/2A C591 (*Ppd-A1a*); замещенные линии по хромосоме 2D (*Ppd-D1a*), созданные в генофоне пяти сортов озимой пшеницы: Avalon/ 2D Ciano-67, Avalon /2D RCM-71, Norman /2D RCM-71, Brimstoun/2DRCM-71, Brigand/2DRCM-71, Rendezvous/2DRCM-71; F₂ популяцию, состоящую из 104 растений, полученную от скрещивания слабочувствительной к фотопериоду замещенной линии Avalon/2D Ciano-67 (носитель доминантного аллеля *Ppd-D1a*) с высокочувствительным к фотопериоду сортом Одесская 16 (рецессив по всем трем генам *ppd*); гибридологический анализ по системе генов *Ppd* проводили согласно методике [4]. Соответствие полученного расщепления теоретически ожидаемому оценивали по критерию χ^2 [5]. ДНК выделяли из 5-дневных проростков (сорта, замещенные линии) и молодых листьев (растения F₂) по методике, разработанной Сиволапом с соавт. [6]. Реакцию амплификации проводили на приборе “Термоциклер СМ2” при следующих режимах: денатурация ДНК при 93 °С — 1 минута, элонгация при 72 °С — 40 секунд, (конечная элонгация в течение 3 минут), отжиг с ISSR-праймерами при 58 °С — 30 секунд. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала буфер, в состав которого входили 50 mM KCl, 20 mM трис-HCl pH 8,4; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % твин, 20 нг ДНК, 5 мкМ каждого из NTP, 1 ед. Tag-полимеразы, 5 мкМ праймера. Анализ продуктов реакции осуществляли в 2 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием и в 6 % ПААГ с окрашиванием нитратом серебра.

Результаты

Объектами анализа для создания ДНК-маркеров к генам *Ppd* служили замещенные по 2D, 2B, 2A хромосомам линии (носители генов *Ppd-D1a*, *Ppd-B1a*, *Ppd-A1a*, соответственно) и их рекуррентный родитель — озимый сорт Mercia (носитель рецессивных аллелей генов *ppd*). При использовании ISSR-ПЦР с праймером (AG)₆C выявлен полиморфизм ДНК замещенных по второй гомеологичной группе хромосом линий в генофоне сорта Mercia. Характер полиморфизма заключается в отсутствии одного из продуктов реакции величиной 350 п. н. у ДНК линии Mercia/2D Ciano-67 и Mercia/2D RCM-71 (носители доминантного аллеля гена *Ppd-D1a*), в сравнении с ДНК линий Mercia/2B Chinese Spring, Mercia/2A C591 и исходного рекуррентного родителя сорта Mercia. Подобные результаты получены также при проведении ISSR-ПЦР с праймером (AG)₆C на ДНК линий, замещенных по хромосоме 2D, созданных в генофонах пяти разных фоточувствительных сортов пшеницы (рис. 1). Электрофореграммы продуктов амплификации всех замещенных по 2D хромосоме линий и сорта Ciano-67 (носители доминантных аллелей гена *Ppd-D1a*) отличались от исходных родительских сортов Avalon, Norman, Brigant, Brimstoun, Rendezvous (рецессивы по *ppd*), использованных в качестве рекуррентных родителей в процессе создания замещенных линий (табл.1). У замещенных линий в спектрах продуктов амплификации нулевой аллель наблюдался независимо от про-

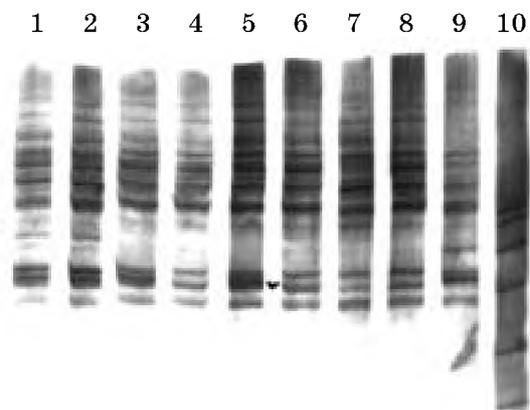


Рис.1. Электрофореграммы ISSR-ПЦР ДНК замещенных линий и их рекуррентных родителей:

1 — Mercia / 2B Chienese Spring (носитель гена *Ppd-B1a*); 2 — Mercia/2A C591 (носитель гена *Ppd-A1a*); 3 — Mercia (рецессив по *ppd* генам); 4 — Mercia/2D Ciano-67 (носитель гена *Ppd-D1a*); 5 — Avalon (рецессив по *ppd*); 6 — Avalon/2D Ciano-67 (носитель гена *Ppd-D1a*); 7 — Avalon/2D RCM-71(носитель гена *Ppd-D1a*); 8 — Brigant/2D RCM 71 (носитель гена *Ppd-D1a*); 9 — Brigant (рецессив по *ppd*); 10 — маркер мол. веса.

Таблица 1

Результаты ISSR-анализа замещенных по 2-й гомеологической группе хромосом линий пшеницы

Название: сорт/линия	Наличие ампликона величиной 350 п. н.
Ciano-67 — носитель гена <i>Ppd-D1a</i>	—
Mercia — носитель рецессивных <i>ppd</i>	+
Mercia/Ciano-67 — <i>Ppd-D1a</i> (2D)	—
Mercia/RCM-71 — <i>Ppd-D1a</i> (2D)	—
Mercia/Chinese Spring — <i>Ppd-B1a</i> (2B)	+
Mercia/C591 — <i>Ppd-A1a</i> (2A)	+
Avalon (<i>ppd</i>)	+
Avalon/Ciano-67 — <i>Ppd-D1a</i> (2D)	—
Avalon/RCM-71 — <i>Ppd-D1a</i> (2D)	—
Brigant (<i>ppd</i>)	+
Brigant/RCM-71 — <i>Ppd-D1a</i> (2D)	—
Norman (<i>ppd</i>)	+
Norman/RCM-71 — <i>Ppd-D1a</i> (2D)	—

Таблица 2

**Соотношение расщепления в комбинации скрещивания
Avalon/2D Ciano-67 (слабочувствительная к фотопериоду; ранняя) x
Одесская 16 (рецессив; поздняя) на “ранние” : “поздние” растения и
соотношение расщепления по аллельному состоянию ISSR-локуса
350(-) / 350(+)**

Метод анализа	Фактически наблюдаемое	Теоретически наблюдаемое	χ^2
Гибридологический	77 : 27	78 : 26	0,05*
ISR-ПЦР	22 : 82	26 : 78	0,82*

Примечание: * — $\chi_{3,1}^2 < 3,84$ при $df=1$.

исхождения донора хромосомы 2D. Так, ISSR-аллель 350(-) обнаружен у замещенных линий Mercia/2D Ciano-67, Avalon/2D Ciano-67, а также у Mercia/2D RCM-71 и Avalon/2D RCM-71. Линия RCM-71 представляет собой замещенную линию, где донором гена *Ppd-D1a* является сорт Мага. ISSR-анализ ДНК индивидуальных растений популяции F_2 , полученной от комбинации скрещивания Avalon/2D Ciano-67 (носитель доминантного гена *Ppd-D1a*; ранняя) x Одесская 16 (носитель рецессивных генов *ppd-D1b*, *ppd-B1b*, *ppd-A1b*; поздняя) позволил разделить популяцию по аллельному состоянию ISSR-локуса 350(-) / 350(+) на два класса (табл. 2). Нулевой аллель 350(-) наблюдали у слабо чувствительной к фотопериоду родительской формы — замещенной линии Avalon/2D Ciano-67 — и у 22 анализируемых растений F_2 , как правило, наиболее рано колосящихся. Факт более ранних сроков колошения доминантных гомозигот по генам *Ppd* по сравнению с гетерозиготами [7] позволяет предположить, что рано колосящиеся растения из анализируемой популяции являются носителями доминантного гена *Ppd-D1a* в гомозиготном состоянии (теоретически в указанной комбинации скрещивания доминантных гомозигот должно быть 26). Электрофореграммы остальных 82 растений и их фоточувствительного родителя показали наличие ISSR-аллеля 350(+). Соотношение расщепления по ISSR-аллелям 350(-) / 350(+) высоко достоверно соответствует 1 : 3, свидетельствуя о моногенном контроле фотопериодической чувствительности (табл. 2). Классический гибридологический анализ подтвердил моногенные различия по системе генов *Ppd* между замещенной линией и сортом Одесская 16, но в соотношении 3:1. При гибридологическом анализе гетерозиготы по факту более раннего колошения (по сравнению с рецессивами) относятся к классу носителей доминантных аллелей гена *Ppd-D1a*, увеличивая их долю в общей популяции до 3/4.

Обсуждение

Для создания ДНК-маркеров к генам *Ppd*, контролирующим чувствительность к фотопериоду у мягкой пшеницы, применяли ISSR-анализ [8].

Сравнение электрофореграмм продуктов амплификации: “рекуррентный родитель” — замещенная линия — “родитель-донор”, позволяет выявлять полиморфизм ДНК. В связи с тем, что ISSR-ПЦР проводили на контрастных по фоточувствительности генотипах, ISSR-аллель 350(-) рассматривается как маркер к гену *Ppd-D1a*. Отсутствие одного из продуктов реакции амплификации, вероятно, связано с мутацией в сайте праймирования. Идентичный характер полиморфизма ДНК замещенных по хромосоме 2D линий в генофонах сортов Avalon, Mercia, Norman, Brigant, Brimstoun, Rendezvous позволяет с большой долей уверенности считать аллель 350(-) маркером к гену *Ppd-D1a*. Отсутствие полиморфизма ДНК у носителей одного и того же доминантного гена *Ppd-D1a*, ведущего свое начало от разных доноров, свидетельствует в пользу сделанного вывода. Результаты ISSR-анализа индивидуальных растений F₂ популяции Avalon/2D Ciano-67 x Одесская 16 показал возможность маркирования доминантно гомозиготных по *Ppd-D1a* локусу генотипов. В связи с тем, что у *Ppd-B1a* и *Ppd-A1a* генотипов ампликон величиной 350 п. н. присутствует (замещенные линии Mercia/2B Chinese Spring, Mercia/2A C591), данный вариант ISSR-анализа позволяет идентифицировать сорта и линии, содержащие в своем генотипе только доминантный аллель гена *Ppd-D1a*. Полученные результаты согласуются и аналогичны ранее полученным данным по использованию в качестве маркера к гену *VrnD1* ISSR-аллеля 850(-) [9].

Литература

1. *Стельмах А. Ф.* Роль генетических систем в онтогенетической адаптации мягкой пшеницы // Экологическая генетика и эволюция. — Кишинев: Штиинца, 1987. — С.146-161.
2. *Гончаров Н. П.* Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы // Сельскохозяйственная биология. — 1986. — № 11. — С. 84-90.
3. *Worland A. S., Borner A., Korzun V. et al.* The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat // Euphytica 100. — 1998. — P. 385-394.
4. *Файт В. И., Стельмах А. Ф.* Ідентифікація Ppd генотипів деяких сортів озимої м'якої пшениці // Агроекологія і біотехнологія. — 1998. — Вип. 2. — С. 189-194.
5. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. — Минск: Вышэйшая школа, 1973. — С. 319.
6. *Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н., Нецветаев В. П.* Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Генетика. — 1997. — Т. 33, № 1. — С. 56-30.
7. *Гончаров Н. П.* Генетический контроль фотопериодической реакции мягкой яровой пшеницы в связи с селекцией на скороспелость // Автореф. ... дисс. канд. биол. наук. — Ленинград, 1986. — 18 с.
8. *Мальшев С. В., Картель Н. А.* Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений // Молекулярная биология. — 1997. — Т. 31, № 2. — С. 197-208.
9. *Балашова И. А., Сиволап Ю. М., Файт В. И., Стельмах А. Ф.* Использование ISSR-анализа для маркирования *Vrn*-локусов // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. Тез. конф. — Москва, 2000. — С. 78-79.

Балашова І. А.¹, Файт В. І.², Сиволап Ю. М.¹

¹Южний біотехнологічний центр в рослинництві та МАІ України,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна

²Селекційно-генетичний інститут УААН,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна

МАРКУВАННЯ ГЕНА *Ppd-D1a* МЕТОДОМ ISSR-ПЦР

Резюме

Для маркування генів, що відповідають за чутливість до фотоперіоду, зокрема гена *Ppd-D1a*, використовували ISSR полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Маркером до гену *Ppd-D1a* є ISSR-амплікон 350(-). Гомозиготні за *Ppd-D1a*-генотипи ідентифіковані по відсутності продукту реакції ампліфікації розміром 350 п. н.

Ключові слова: ISSR-ПЛР, *Ppd-D1a*-генотипи, поліморфізм ДНК.

Balashova I. A.¹, Fayt V. I.², Sivolap Yu. M.¹

¹South Plant Biotechnology Center UAAS,
Ovidiopolskaya Dor., 3, Odessa, 65036, Ukraine

²Plant Breeding and Genetics Institute,
Ovidiopolskaya Dor., 3, Odessa, 65036, Ukraine

***Ppd-D1a* GENE MARKERING BY ISSR-PCR METHOD**

Summary

ISSR-analysis were used for markering of gene responsibity to the photoperiod in particular of gene *Ppd-D1a*. Gene marker to *Ppd-D1a* is absense of amplification product — nulle-allelic 350 (-). Homozygotes on *Ppd-D1a* genotypes are identified by presence of amplification product by size 350 b. p.

Key words: ISSR-PCR, *Ppd-D1a* genotypes, polymorphism DNA.