

Использование ISSR- и SSR-полимеразной цепной реакции для создания ДНК-маркеров к генам *Ppd*

И. А. Балашова, В. И. Файт¹, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОН Украины
Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

¹ Селекционно-генетический институт
Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

Использование ISSR- и SSR-полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило получить маркеры к генам PpdD1a и PpdB1a. Маркерами являются нуль-аллель-продукт ISSR-ПЦР размером 350 п. н. и SSR-ампликон величиной 180 п. н. Использование маркеров позволяет с высокой степенью вероятности отбирать на ранних этапах селекционного процесса PpdD1a и PpdB1a генотипы, идентифицировать сорта и линии пшеницы с различной чувствительностью к фотопериоду.

Введение. Реализация потенциала продуктивности мягкой пшеницы в значительной мере определяется особенностями ее индивидуального развития. Скорость развития мягкой пшеницы зависит от уровня экспрессии генов нескольких генетических систем, в том числе генов, отвечающих за контроль чувствительности к фотопериоду (*Ppd*-гены). Система генов *Ppd* обуславливает до 20 % вариабельности по времени колошения [1]. Вовлечение данных генов в селекционные программы направлено на создание генотипов с заданной скоростью развития в конкретных климатических условиях. Использование ДНК-маркеров к генам *Ppd* представляет особый интерес в связи с необходимостью установления *Ppd*-генотипов значительного количества сортов пшеницы различного эколого-географического происхождения и устранения имеющихся противоречий в обозначении генов, контролирующей фотопериодическую реакцию [2]. Развитие методов молекулярно-генетического анализа показало широкие возможности для создания ДНК-маркеров к индивидуальным генам, в том числе к генам, отвечающим за чувствительность к фотопериоду [3].

Использование ДНК-маркеров в селекционных программах может способствовать интенсификации процесса отбора новых скороспелых сортов и линий мягкой пшеницы. В настоящей работе рассматривается возможность получения ДНК-маркеров к генам *PpdD1a* и *PpdB1a* с помощью ISSR- и SSR-полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы. Исходным материалом для маркирования генов *ppd* служили чувствительные к фотопериоду сорта (рецессивы по *ppdAlb*, *ppdB1b*, *ppdD1b*): Mercia, Avalon, Norman, Brimstoun, Brigand, Rendezvous; слабочувствительный к фотопериоду сорт Ciano-67 (носитель доминантного аллеля гена *PpdD1a*); замещенные по хромосоме второй гомологичной группы линии, созданные в генофоне сорта Mercia: Mercia/2D RCM-71, Mercia/2D Ciano-67 (*PpdD1a*); Mercia/2B Chinese Spring (*PpdB1a*), Mercia/2A C59 (*PpdA1a*); замещенные по хромосоме 2D (*PpdD1a*) линии, созданные в генофоне пяти сортов озимой пшеницы: Avalon/2D Ciano-67, Avalon/2D RCM-71, Norman/2D RCM-71, Brimstoun/2D RCM-71, Brigand/2D RCM-71, Rendczvous/2D RCM-71; 12 линий, характеризующихся разной чувствительностью к фотопериоду, полученных от скрещивания фоточувствительного сорта Mercia со слабочувствительной замещенной линией Mercia/2D Ciano-67;

10 линий, имеющих высокую (пять линий) и низкую (пять линий) чувствительность к фотопериоду, полученных от скрещивания сорта Mercia × Mercia/2B Chinese Spring (данный материал тестирован по чувствительности к фотопериоду в течение двух лет в климатических условиях Англии и Франции, предоставлен John Innes Centre, Great Britain).

Использовали F_2 популяцию (104 растения), полученную от скрещивания слабочувствительной к фотопериоду замещенной линии Avalon/2D Cianop-67 (носитель доминантного аллеля *PpdD1a*) с высокочувствительным к фотопериоду сортом Одесская 16 (рецессив по всем трем генам *ppd*); 18 сортов яровой и озимой мягкой пшеницы разного эколого-географического происхождения. Гибридологический анализ по системе генов *Ppd* проводили согласно методике [4].

Соответствие полученного расщепления теоретически ожидаемому оценивали по критерию χ^2 [5]. ДНК выделяли из пятидневных проростков (сортов, замещенные линии) и молодых листьев (растения F_2) по методике, разработанной в работе [6]. Реакцию амплификации проводили на приборе Термоциклер СМ2 при следующих режимах: денатурация ДНК при температуре 93 °С — 1 мин, элонгация при 72 °С — 40 с (конечная элонгация в течение 3 мин), отжиг с ISSR-праймерами при 58 °С — 30 с, отжиг с SSR-праймерами проводили при 60 °С. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала буфер, в состав которого входили 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,4, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01 % твин, 20 нг ДНК, NTP в концентрации 5 мкМ каждый, 1 ед. Tag-полимеразы, 5 мкМ праймер. Анализ продуктов реакции осуществляли в 2 %-м агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием и в 6 %-м ПААГ с окрашиванием нитратом серебра.

Результаты и обсуждение. Объектами анализа для создания ДНК-маркеров к генам *Ppd* служили замещенные по 2D, 2B, 2A хромосомам линии (носители генов *PpdD1a*, *PpdB1a*, *PpdA1a* соответственно) и их рекуррентный родитель, озимый сорт Mercia (носитель рецессивных аллелей генов *ppd*). ISSR-ПЦП с праймером (AG)₆C выявляет полиморфизм ДНК замещенных по второй гомологичной группе хромосом линий в генофоне сорта Mercia. Отличительной чертой полиморфизма является отсутствие одного из продуктов реакции величиной 350 п. н. у ДНК линий Mercia/2D Cianop-67 и Mercia/2D RCM-71 (носители доминантного аллеля гена *PpdD1a*) в сравнении с ДНК линий Mercia/2B Chinese Spring, Mercia/2A C591 и исходного рекуррентного родителя сорта Mercia. В дальнейшем



Рис. 1. Электрофореграммы ISSR-полимеразной цепной реакции ДНК замещенных линий и их рекуррентных родителей: 1 — Brigant/2D RCM-71 (*PpdD1a*); 2 — Brigant (рецессив по *ppd*); 3 — маркеры молекулярной массы; 4 — Mercia (рецессив по *ppd* генам); 5 — Mercia/2D Cianop-67 (*PpdD1a*); 6 — Mercia/2D RCM-71 (*PpdD1a*); 7 — Avalon (рецессив по *ppd*); 8 — Avalon/2D Cianop-6 (*PpdD1a*); 9 — Avalon/2D RCM-71 (*PpdD1a*). Цифры слева — величины фрагментов маркера молекулярной массы, представленного на дорожке 3 (pUC/mix); стрелками указано наличие (дорожка 4) и отсутствие (дорожка 5) продукта реакции размером 350 п. н.

отсутствие ампликона обозначали как нулевой аллель 350(—).

Подобные результаты получены также при проведении амплификации с праймером (AG)₆C на ДНК замещенных по хромосоме 2D линий, созданных в генофонах пяти разных фоточувствительных сортов пшеницы (рис. 1), и ДНК шести линий (слабая чувствительность к фотопериоду), полученных от скрещивания Mercia × Mercia/2D Cianop-67. На рис. 1 представлены различия в спектрах продуктов амплификации в области 350 п. н. У носителей рецессивных аллелей генов *ppd* (дорожки 2, 4, 7) детектируется ампликон величиной 350 п. н., в то время как нулевой аллель 350(—) наблюдался у замещенных линий носителей доминантного гена *PpdD1a* (дорожки 1, 5, 6, 8, 9). Следует отметить, что нуль-аллель детектируется независимо от происхождения донора хромосомы 2D. Так, ISSR-аллель 350(—) выявлен у замещенных линий Mercia/2D Cianop-67, Avalon/2D Cianop-67, Mercia/2D RCM-71 и Avalon/2D RCM-71. Линия RCM-71 представляет собой замещенную линию, где донором гена является сорт Мага. ISSR-анализ ДНК индивидуальных растений популяции F_2 , полученной от комбинации скрещивания

Таблица 1

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

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

* $\chi^2_{3;1} < 3,84$ при $df = 1$.

Avalon/2D Ciano-67 (носитель доминантного гена *PpdD1a*; ранняя) × Одесская 16 (носитель рецессивных генов *ppdD1b*, *ppdB1b*, *ppdA1b*; поздняя), позволил разделить популяцию по аллельному состоянию ISSR-локуса 350(-)/350(+) на два класса. Нулевой аллель 350(-) выявлен у слабочувствительной к фотопериоду родительской формы — замещенной линии Avalon/2D Ciano-67 и 22 анализируемых растений F_2 , как правило, наиболее рано колосющихся. Факт более ранних сроков колошения доминантных гомозигот по генам *Ppd* по сравнению с гетерозиготами [7] позволяет предположить, что такие растения из анализируемой популяции являются носителями доминантного гена *PpdD1a* в гомозиготном состоянии (теоретически в указанной комбинации скрещивания доминантных гомозигот должно быть 26). Электрофореграммы ДНК остальных 82 растений и их фоточувствительного родителя показали наличие ISSR-аллеля 350(+). Соотношение расщепления по ISSR-аллелям 350(-)/350(+) с высокой достоверностью соответствует 1:3, что свидетельствует о моногенном контроле фотопериодической чувствительности (табл. 1).

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 из-за их более раннего колошения по сравнению с рецессивами относят к классу носителей доминантных аллелей гена *PpdD1a*, тем самым увеличивая их долю в общей популяции до 3/4.

ISSR-анализ ДНК 18 сортов озимой и яровой пшеницы различного эколого-географического происхождения (*Ppd*-генотипы не установлены) позволил по наличию нулевого аллеля 350(-) идентифицировать семь сортов как носителей гена *PpdD1a*

Таблица 2

Результаты ISSR-анализа сортов озимой и яровой пшеницы различного эколого-географического происхождения

Сорт, линия	Страна	Наличие (+) или отсутствие (-) ампликона размером 350 п. н.
Norin 1	Япония	+
XIAOYAN 6	Китай	+
Yerek 79	Турция	-
Danica	Югославия	-
Capelle Desprez	Франция	+
H87CFH10-1675	Франция	+
Комсомольская	Казахстан	+
Эритроспермум-80	Киргизия	+
Новосибирская-67	Россия (Западная Сибирь)	+
Эритроспермум-841	Россия (Поволжье)	+
Erin	США	-
Triple Dirk C	Австралия	+
Seri	Мексика	-
Basswood	Мексика	+
Kentana 48	Мексика	-
Santa Catalina	Аргентина	+
Frontana	Бразилия	-
Beacon	Кения	-

Yerek 79, Erin, Seri, Danica, Beacon, Frontana, Kentana 48 (табл. 2).

В результате проведения SSR-ПЦР с направленными к микросателлитному локусу HVM36 праймерами показано наличие полиморфного ампликона величиной 180 п. н. у замещенной линии Mercia/2B Chinese Spring (рис. 2), а также у пяти слабочувствительных к фотопериоду линий, являющихся носителями гена *PpdB1a*.

Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК исходного рекуррентного родителя, пяти фоточувствительных линий, полученных от комбинации скрещивания Mercia × Mercia/2B Chinese Spring, и замещенных по 2D и 2A хромосомам линий (носителей генов *PpdD1a* и *PpdA1a*) свидетельствуют об отсутствии ампликона величиной 180 п. н.

Для создания ДНК-маркеров к генам *Ppd*, контролирующим чувствительность к фотопериоду у мягкой пшеницы, применяли SSR- и ISSR-ПЦР [8]. Сравнение электрофореграмм продуктов амплификации «рекуррентный родитель»—замещенная линия—«родитель—донор» позволяет выявлять по-

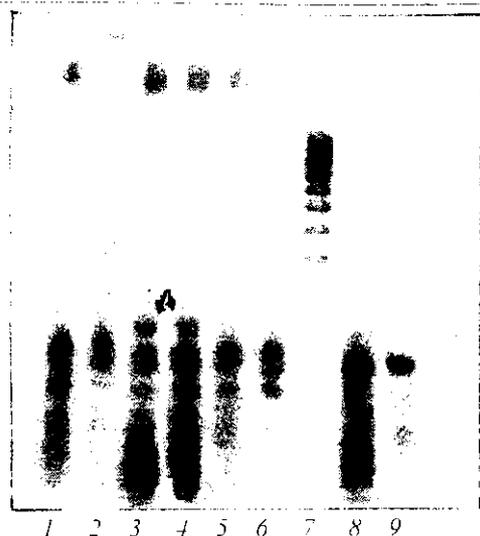


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов SSR-полимеразной цепной реакции замещенных линий и их рекуррентного родителя: 1 — Mercia (рецессив по *ppd*); 2 — Mercia/2D Ciano-67 (*PpdD1a*); 3, 4 — Mercia/2B Chinese Spring (*PpdB1a*); 5 — Mercia/2A C591 (*PpdA1a*); 6 — Avalon (рецессив по *ppd*); 7 — маркеры молекулярной массы; 8 — сорт Рось (ячмень); 9 — сорт Паллидум-107 (ячмень). Стрелками на дорожках 3 и 4 отмечены полиморфные фрагменты ДНК размером 180 п. н. Этот фрагмент является ДНК-маркером к гену *PpdB1a*

лиморфизм ДНК. В связи с тем, что ISSR-ПЦР проводили на контрастных по фоточувствительности генотипах, ISSR-аллель 350(–) рассматривается как маркер гена *PpdD1a*. Отсутствие одного из продуктов реакции амплификации, вероятно, связано с мутацией в сайте праймирования. Идентичный характер полиморфизма ДНК замещенных по хромосоме 2D линий в генотипах сортов Avalon, Mercia, Norman, Brigant, Brimstoun, Rendezvous позволяет с большой долей уверенности считать данный аллель 350(–) маркером гена *PpdD1a*. Результаты анализа ДНК 12 линий, полученных от комбинации скрещивания Mercia × Mercia/2D Ciano-67 и тестированных по чувствительности к фотопериоду, также дают основание использовать ISSR-аллель 350(–) для детекции слабочувствительных к фотопериоду растений пшеницы. Отсутствие полиморфизма ДНК у носителей одного и того же доминантного гена *PpdD1a*, ведущего свое начало от разных доноров, свидетельствует в пользу сделанного вывода. В результате ISSR-анализа индивидуальных растений F_2 популяции Avalon/2D Ciano-67 × Одесская 16 показана возможность маркирования доминантно гомозиготных по *PpdD1a* локусу генотипов. До настоящего времени значительное количество культивируемых сортов озимой, а также яровой пшеницы гибридологическим

анализом не идентифицировано по системе генов *Ppd* в отличие от яровых сортов, тестированных по системе *Vrn* генов. Электрофореграммы продуктов ISSR-ПЦР показали наличие нулевого аллеля 350(–) у ряда сортов, что дает возможность рассматривать данные сорта в качестве носителей гена *PpdD1a*. В связи с тем, что у *PpdB1a* и *PpdA1a* генотипов присутствует ампликон величиной 350 п. н. (замещенные линии Mercia/2B Chinese Spring, Mercia/2A C591), данный вариант ISSR-анализа пригоден для идентификации сортов и линий, находящихся под моногенно доминантным *PpdD1a* контролем.

Поиск ДНК-маркеров к генам *Ppd* проводили и с помощью SSR-ПЦР. Поскольку известна хромосомная локализация *Ppd* генов, для SSR-анализа использовали несколько пар праймеров, синтезированных к микросателлитным локусам 2-й гомологичной группы хромосом пшеницы [9]. Применение микросателлитных пар праймеров, синтезированных к ячменным хромосомам, обусловлено высокой степенью гомологии хромосом злаков и локализацией гена, ответственного за фоточувствительность ячменя на 2Н хромосоме [10].

SSR-анализ с парой праймеров к микросателлитному локусу HVM36 (2Н), проведенный на ДНК замещенных по 2D, 2B, 2A хромосомам линиях в генотипе сорта Mercia и их рекуррентном родителе, показал наличие полиморфизма ДНК линии Mercia/2B Chinese Spring — носителя гена *PpdB1a*. Полиморфизм проявляется в наличии полиморфного ампликона величиной 180 п. н. у данной линии и в отсутствии его у ДНК сорта Mercia, а также линий, являющихся носителями генов *PpdD1a* и *PpdA1a*. SSR-анализ проводили на 10 линиях, полученных от скрещивания сорта Mercia (рецессив по *ppd*) × Mercia/2B Chinese Spring (*PpdB1a*). Спектры продуктов амплификации ДНК данных линий свидетельствуют о наличии полиморфного ампликона величиной 180 п. н. у фотонейтральных (пять линий) и об отсутствии его у ДНК фоточувствительных линий (пять линий). Полученные результаты дают возможность рассматривать полиморфный SSR-ампликон в качестве потенциального ДНК-маркера гена *PpdB1a*. Ген *PpdB1a* локализуется на коротком плече 2В хромосомы пшеницы, а микросателлитный локус HVM36 картирован на коротком плече хромосомы 2Н ячменя. В связи с тем, что в данном случае для маркирования *PpdB1a* гена пшеницы использовали праймеры к микросателлитному участку ДНК ячменя, локализованному на коротком плече 2Н хромосомы, не исключена вероятность создания ДНК-маркера к гену, отвечающему за чувстви-

тельность к фотопериоду у ячменя и установления его гомоаллельности с геном *PpdB1a* пшеницы.

Авторы выражают благодарность С. В. Чеботарь за оказанную помощь в выполнении данной работы.

I. A. Balashova, V. I. Feit, Yu. M. Sivolap

Usage of ISSR and SSR-PCR DNA-marker to *Ppd* genes

Summary

SSR- and ISSR-analyses were used for creating a marker to genes responsible for the sensitivity to photoperiod, in particular, the genes *PpdD1a* and *PpdB1a*. The gene marker to *PpdB1a* is a polymorphic SSR-aplicon of size 180 b. p. The gene marker to *PpdD1a* is nulle-allelic 350(-). The genotypes homozygous on *PpdD1a* are identified by the absence of amplification product of size 350 b. p.

I. A. Балашов, В. І. Фейт, Ю. М. Сиволап

Використання ISSR- і SSR-полімеразної ланцюгової реакції для створення ДНК маркерів до генів *Ppd*

Резюме

Для маркування генів, які відповідають за чутливість до фотоперіоду, зокрема, генів *PpdD1a* та *PpdB1a* використовували ISSR- та SSR-полімеразну ланцюгову реакцію. Маркером гена *PpdB1a* є поліморфний SSR-амплікон розміром 180 п. н. Гомозиготні за *PpdB1a* генотипи ідентифікували по відсутності продукту реакції ампліфікації розміром 350 п. н.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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 // С.-х. биология.—1986.—№ 11.—С. 84—90.
3. Worland A. S., Borner A., Korzun V., Ganai M. W. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat // Euphytica.—1998.—100.—Р. 385—394.
4. Фейт В. І., Стельмах А. Ф. Ідентифікація *Ppd* генотипів деяких сортів озимої м'якої пшениці // Агроекологія і біотехнологія.—1998.—№ 2.—С. 189—194.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.—Минск: Вышэйш. шк., 1973.—319 с.
6. Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н., Нецветаев В. П. Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare L.*) // Генетика.—1997.—33, № 1.—С. 56—30.
7. Гончаров Н. П. Генетический контроль фотопериодической реакции мягкой яровой пшеницы в связи с селекцией на скороспелость: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Ленинград, 1986.—18 с.
8. Малышев С. В., Картель Н. А. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений // Молекуляр. биология.—1997.—31, № 2.—С. 197—208.
9. Roder M.-S., Korzun V., Gill B. S., Li W. M., Petrovic S., Sayers E. J. The physical mapping of microsatellite markers in wheat // Genome.—1998.—41.—Р. 278—283.
10. Liu Z., Biashev R., Saghai Maroof M. A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their interation into a barley linkage map // Theor. and Appl. Genet.—1996.—93.—Р. 869—876.

УДК 575.116; 633.16: 557.1
Надійшла до редакції 17.12.01