

**АРТЮХОВА А.В., ГРИШИН С.Ю., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.**

*Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского  
Россия, 241000, Брянск, ул. Бежицкая, 14. e-mail: nasteva@list.ru*

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ISSR-PCR ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАЗНЫХ ВИДОВ РОДА *LUPINUS***

Паспортизация и маркирование сортов растений имеет большое значение для селекции и семеноводства хозяйственно ценных культур. Для этих целей применяются различные методы: морфологические, биохимические, генетические. Фенологические и морфологические характеристики не всегда позволяют оценить необходимые для селекции признаки и параметры.

Анализ генотипов и сортов разных культур с помощью белковых маркеров часто сопряжен с трудностями, прежде всего связанными с недостаточным количеством разработанных белковых маркерных систем. Кроме того, для растений с низким уровнем межсортового полиморфизма использование белковых маркеров для сортовой идентификации не представляется возможным [1].

В настоящее время для изучения генетического полиморфизма разных видов растений применяются методы молекулярного маркирования генома [2]. Для этого разработаны методы полимеразно-цепной реакции с использованием различными типами праймеров. Хорошие результаты при работе с сельскохозяйственными культурами показало использование RAPD- и ISSR-праймеров [1, 2].

Люпин представляет собой важную зернобобовую культуру кормового и сидерального направления, с высоким содержанием запасных белков. В доступных литературных источниках удалось найти данные о маркировании и паспортизации лишь его видов [5], но не сортов. Методы молекулярной генетики могут помочь в селекционной работе, в проведении контроля качества семян. В Брянской области ведется селекция люпина 3 видов [3, 4].

Цель нашей работы заключалась в выявлении с использованием ISSR-праймеров полиморфизма внутри трех видов люпина, селекционная работа с которыми ведется в Брянской области.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования служили образцы трех видов малины — *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus*. Все образцы предоставлены ВНИИ люпина.

ДНК выделяли из 300 мг свежих незрелых семян или из 100 мг сухих семян в трехкратной повторности. Сухие семена предварительно замачивали в воде в течение 20 минут для того, чтобы плотная оболочка разбухла и лучше удалялась. Выделение проводили фенольным методом [6] с некоторыми изменениями.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в четырехканальном ДНК-амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Москва). Использовали

ISSR и RAPD-праймеры, синтезированные фирмой “Синтол” (Москва). Применялись ферменты и реактивы фирмы “СибЭнзим” (Москва).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала следующие компоненты: 2 ед. Taq-полимеразы E338, 2 мкл SE-буфера AS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM каждого dNTP, 50 mM каждого из праймеров, 2 мкг тотальной геномной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл вазелинового масла.

Условия амплификации были следующими: начальная денатурация 5 мин при 94 °С, 35 циклов: денатурация при 94 °С — 45 с, отжиг при рассчитанной температуре — 45 с, элонгация при 72 °С — 90 с; заключительная элонгация 7 мин при 72 °С.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле с буфером TBE в присутствии бромистого этидия и визуализировали при помощи прибора Gel-Doc XR фирмы Bio-Rad. В качестве маркера молекулярной массы использовали M27. Полиморфными считались фрагменты ДНК, присутствующие на электрофореграммах не всех сортов.

Длины полиморфных фрагментов измеряли с помощью программы QuantityOne, поставляемой в комплекте с Gel-Doc XR.

### Результаты и обсуждение

Для изучения полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК образцов люпина использовали 19 ISSR-праймеров (табл. 1). Продукты амплификации не были получены для праймеров K37 и K38. При проведении ПЦР с этими олигонуклеотидами на электрофореграммах наблюдался низкомолекулярный шмер. Для всех остальных праймеров были получены продукты амплификации, каждый из них обеспечил амплификацию полиморфных фрагментов для различных видов. Праймеры IS4, IS5 оказались высокочувствительны к условиям проведения ПЦР.

Таблица 1

### Характеристика используемых праймеров

№	Название праймеров	Последовательность нуклеотидов	№	Название праймеров	Последовательность нуклеотидов
1	UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	12	IS6	(AG) <sub>8</sub> (Y)T
2	UBC810	(GA) <sub>8</sub> T	13	K10	(AC) <sub>8</sub> YG
3	UBC823	(TC) <sub>8</sub> C	14	K11	(GA) <sub>8</sub> YC
4	UBC824	(TC) <sub>8</sub> G	15	K19	(AC) <sub>8</sub> YA
5	UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	16	K22	(CA) <sub>8</sub> GT
6	UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT	17	K27	(AG) <sub>8</sub> C
7	IS1	(AG) <sub>8</sub> (Y)G	18	K30	(TG) <sub>8</sub> G
8	IS2	(AC) <sub>8</sub> G	19	K34	(CT) <sub>8</sub> G
9	IS3	(GA) <sub>8</sub> C	20	K37	(GT) <sub>8</sub> T
10	IS4	(CA) <sub>8</sub> A	21	K38	(GT) <sub>8</sub> YT
11	IS5	(CA) <sub>8</sub> (R)C			

Полиморфные фрагменты ДНК сортов люпина узколистного обнаружены при использовании праймеров IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS6, K10, UBC809, UBC810, UBC824. В среднем в каждом случае амплифицировалось 18 фрагментов, полиморфными оказывались от 1 до 10. Внутривидовой полиморфизм люпина узколистного составил около 25%.

При анализе сортов люпина желтого полиморфные фрагменты получили при использовании праймеров UBC809, UBC810, UBC824, UBC826, IS1, IS2. Каждый праймер позволял амплифицировать до 25 фрагментов, полиморфными оказались от 1 до 7. Отношение количества полиморфных к общему количеству амплифицируемых фрагментов для люпина желтого составило около 13%.

Анализ сортов люпина белого выявил амплификацию полиморфных фрагментов при применении праймеров UBC810, UBC823, UBC824, K10, K11. С помощью каждого из них получено по одному полиморфному фрагменту при среднем количестве полос 17. Полученное значение внутривидового полиморфизма люпина белого составляет 6%. Такой низкий результат связан с недостаточным количеством исходного материала.

В целях создания паспортов различных сортов люпина все данные о наличии полиморфных фрагментов у данного генотипа фиксировались в виде формулы сорта, в которой праймер, с которым получен данный фрагмент обозначили буквой латинского алфавита, а сам фрагмент — нижним

Таблица 2

**Соответствие праймеров и букв латинского алфавита, используемых для записи полученных полиморфных фрагментов**

Название праймера	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5	IS6	K10	UBC809	UBC810	UBC823	UBC824	K10	K11
Символ	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N

Таблица 3

**Генетические формулы сортов люпина узколистного**

Название сорта	Общая формула полиморфных фрагментов
Сидерат 38	$^{10}A_{320} \ ^1B_{860} \ ^1B_{450} \ ^1B_{370} \ ^{10}B_{210} \ ^{10}B_{180} \ ^0C_{670} \ ^1C_{655} \ ^0C_{640} \ ^{10}C_{590} \ ^0C_{550} \ ^1C_{520}$ $^{10}C_{490} \ ^1C_{450} \ ^1C_{320} \ ^1C_{210} \ ^{10}D_{600} \ ^{10}D_{340} \ ^0D_{320} \ ^1D_{310} \ ^1E_{440} \ ^{10}E_{400} \ ^1F_{860} \ ^1F_{750}$ $^1F_{640} \ ^{10}F_{550} \ ^1G_{1350} \ ^1G_{1150} \ ^1G_{480} \ ^{10}G_{420} \ ^{10}H_{1380} \ ^1H_{330} \ ^1I_{520} \ ^{10}I_{470} \ ^1I_{420} \ ^{10}I_{360}$ $^1I_{320} \ ^1I_{290} \ ^1L_{1150} \ ^{10}L_{770} \ ^1L_{680} \ ^{10}L_{570}$
СН 78-07	$^1A_{320} \ ^1B_{860} \ ^1B_{450} \ ^1B_{370} \ ^{10}B_{210} \ ^{10}B_{180} \ ^0C_{670} \ ^0C_{655} \ ^0C_{640} \ ^0C_{590} \ ^1C_{550} \ ^1C_{520}$ $^{10}C_{490} \ ^1C_{450} \ ^1C_{320} \ ^1C_{210} \ ^{10}D_{600} \ ^{10}D_{340} \ ^0D_{320} \ ^1D_{310} \ ^1E_{440} \ ^{10}E_{400} \ ^1F_{860} \ ^1F_{750}$ $^1F_{640} \ ^{10}F_{550} \ ^{10}G_{1350} \ ^{10}G_{1150} \ ^0G_{480} \ ^{10}G_{420} \ ^{10}H_{1380} \ ^1H_{330} \ ^1I_{520} \ ^{10}I_{470} \ ^1I_{420} \ ^{10}I_{360}$ $^1I_{320} \ ^1I_{290} \ ^1L_{1150} \ ^{10}L_{770} \ ^1L_{680} \ ^{10}L_{570}$
Снежесть	$^?A_{320} \ ^1B_{860} \ ^1B_{450} \ ^{10}B_{370} \ ^{10}B_{210} \ ^{10}B_{180} \ ^0C_{670} \ ^1C_{655} \ ^0C_{640} \ ^1C_{590} \ ^{10}C_{550} \ ^1C_{520}$ $^{10}C_{490} \ ^1C_{450} \ ^1C_{320} \ ^1C_{210} \ ^1D_{600} \ ^?D_{340} \ ^1D_{320} \ ^0D_{310} \ ^1E_{440} \ ^{10}E_{400} \ ^1F_{860} \ ^0F_{750}$ $^1F_{640} \ ^1F_{550} \ ^1G_{1350} \ ^1G_{1150} \ ^0G_{480} \ ^{10}G_{420} \ ^1H_{1380} \ ^1H_{330} \ ^1I_{520} \ ^{10}I_{470} \ ^1I_{420} \ ^{10}I_{360}$ $^1I_{320} \ ^{10}I_{290} \ ^1L_{1150} \ ^{10}L_{770} \ ^1L_{680} \ ^1L_{570}$

индексом, соответствующим его молекулярному весу (табл. 2). Верхним индексом обозначали наличие (1) или отсутствие (0) фрагмента на электрофореграмме. Пример получаемых формул для трех сортов люпина узколистного приведен в табл. 3.

### **Выводы**

Выявлен межвидовой и внутривидовой полиморфизм трех видов люпина узколистного, селекция которых проводится в Брянской области.

Метод ISSR-PCR можно использовать в целях молекулярного маркирования видов и сортов люпина, при создании генетических паспортов сортов этих видов при дальнейшем расширении набора праймеров.

### **Литература**

1. Кочиева Е.З. Молекулярное маркирование сортов баклажанов (*Solanum melongena* L.) // Сельскохозяйственная биотехнология / Под. ред. Шевелухи В.С. 2000. Т.1.— С. 17–24

2. Tikunov Yu. M., Khrystaleva L. I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* // *Euphatica*.— 2003.— №131.— С. 71–80.

3. Агеева П. А. Селекция узколистного люпина в Юго-западном регионе Центральной России: Дис. в виде науч. докл. канд. с.-х. наук / Всерос. НИИ люпина.— Брянск, 1998.— 47 с.

4. Лукашевич М. И. Селекционно-генетическое изучение исходного материала и результаты селекции люпина желтого: Дис. в виде науч. докл. докт. с.-х. Наук / Всерос. НИИ люпина.— Брянск, 1997.— 76 с.

5. Ainouche A.-K., Randall J. B. Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA // *American Journal of Botany*.— 1999.— №86(4).— P. 590–607.

6. Дрейпер Дж. Генная инженерия растений: Лабораторное руководство / Пер. с англ / Дж. Дрейпер, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена: Под ред. Дж. Дрейпера. Москва, 1991.

### **Резюме**

Подобраны условия для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ISSR-праймерами на ДНК, выделенной из трех культурных видов люпина. Испытанные праймеры позволили выявить полиморфные фрагменты (от 1 до 10). При анализе сортов каждого из трех видов люпина по 19 праймерам полиморфные полосы составляли до 25%.

There were selected conditions for PCR with ISSR-primers for three lupine species. Tested primers had shown 1–10 polymorphic bands. Intraspecies polymorphism had reached 25%.

БАТУРИН С.О.,<sup>1</sup> АМБРОС Е.В.,<sup>2</sup> КУЗНЕЦОВА Л.Л.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: SO\_baturin@mail.ru

<sup>2</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Россия, 630090, г.

Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

<sup>3</sup>Новосибирский государственный аграрный университет, Россия, 630039,

Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

## МАТРОКЛИННОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИ СКРЕЩИВАНИЯХ *FRAGARIA* × *POTENTILLA*

Межродовые скрещивания *Fragaria* × *Potentilla* проводились многими исследователями как с теоретической целью — выяснения филогенетических связей между двумя очень похожими родами, так и практической — интрогрессии ценных признаков представителей рода *Potentilla* в генофонд крупноплодной земляники *Fragaria* × *ananassa* Duch. ( $2n=8x=56$ ). Большинство опытов по межродовой гибридизации имели успех лишь в том случае, если в качестве материнской формы были использованы представители рода *Fragaria*, и только в скрещивании *Potentilla* (*Duchesnea*) *indica* ( $8x$ ) × *Fragaria* × *ananassa* ( $8x$ ) авторы у 40 семян по морфологическим и молекулярным маркерам предположили гибридную природу (Marta et al., 2004). Образцы диплоидной лесной земляники *Fragaria vesca* при гибридизации с различными видами *Potentilla* дают сублетальные гибриды (Mangelsdorf, East, 1927; Jones, 1955; Ellis, 1962; Asker, 1971). При использовании тетраплоидного образца *F. vesca* в скрещиваниях с *Potentilla fruticosa* ( $2n=14$ ) образуются триплоидные нецветущие гибриды, а с *Potentilla* (*Comarum*) *palustris* семена не завязываются (Ellis, 1962). Успешными оказались опыты по межродовой гибридизации с участием гексаплоидного вида *F. moschata* ( $2n=42$ ). Так, S. Asker (1970) и W.H. MacFarlane Smith и J.K. Jones (1985), используя в качестве отцовского родителя *P. fruticosa* ( $2n=14$ ), получили белоцветковые, но стерильные  $4x$  гибриды, которые фенотипически были подобны материнской форме.

Подавляющее количество скрещиваний было проведено с использованием в качестве материнских форм различных октоплоидных образцов *Fragaria* r *ananassa* ( $2n=56$ ). Причем полученные сеянцы, как правило, были двух типов — матроморфные (агамоспермного происхождения) с  $2n=28, 56$  (Asker, 1971; Barrientos, Bringham, 1973; Jelenkovic et al., 1984) и ожидаемые гибриды. Однако межродовые гибриды были получены лишь в комбинациях, где в качестве опылителя использовались  $2x$  образцы *Potentilla fruticosa* и  $6x$  образцы *Potentilla palustris*. В комбинации скрещивания *F. ananassa* × *P. fruticosa* полученные гибриды были *Fragaria*-типа, имели ожидаемое число хромосом  $2n=35$ , полную стерильность и бледно-желтую либо белую окраску венчика цветка (Harland, 1957, цит. по Asker, 1971; Ellis, 1962; Jelenkovic et al., 1984; Niemirowicz-Szczytt, 1984; Sayegh, Hennerty, 1993). Особо следует отметить результаты скрещивания *F. ananassa* × *P. palustris*