

УДК 631.577.21;579.23; 579.64

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ

О.Н. Хапилина, О.Б. Райзер

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Астана

oksfur@mail.ru

Мировые генетические ресурсы растений являются основным источником улучшения сельскохозяйственных культур. В первую очередь - это количественные и качественные признаки, такие как устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам, качество зерна, признаки продуктивности [1, 2].

Проблема сохранения биологического разнообразия на уровне генов является весьма актуальной. Одной из первостепенных задач является выбор подходов, технологий и критериев оценки генетического разнообразия. К приоритетным направлениям науки относятся развитие технологий анализа геномов растений. Одним из важных аспектов генетики и практической селекции растений является детальная характеристика используемого материала. Для решения этой задачи внедряются новые технологии, которые базируются на анализе полиморфизма ДНК. Созданные в результате селекции сорта растений сочетают уникальные комбинации аллелей генов, обеспечивающих адаптацию к условиям жизни и необходимый уровень развития ценных технологических признаков. Особенности набора аллелей генов и, следовательно, последовательностей нуклеотидов ДНК, по сути, представляют «генетический паспорт» сорта [3, 4].

Целью данных исследований было поиск наиболее информативных IRAP маркеров для выявления генетической оригинальности сортов пшеницы. В качестве объектов исследований использованы семена яровой мягкой пшеницы различных сортов.

В результате исследований для дальнейших исследований по идентификации генотипов пшеницы были выделены наиболее информативные праймеры, обладающие наиболее высокими значениями индекса полиморфизма: 2109 Daniela (PIC равен 0,875), Sukkula (PIC равен 0,731), и 1095 (PIC равен 0,718).

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, молекулярный маркер, IRAP, генотипирование, полимеразная цепная реакция, ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Обязательными условиями успешного сохранения и использования различных сортов сельскохозяйственных культур является идентификация и контроль генетической изменчивости, для изучения которых используются различные методы, в том числе и методы молекулярно-генетического анализа. Молекулярно-генетические маркеры, используемые для изучения генофонда сельскохозяйственных культур, можно подразделить на разные поколения. К первому из них относятся электрофоретические варианты белков, полиморфизм которых отражал несинонимичные замены в кодирующих последовательностях, которые приводили к существенному изменению электрического заряда белковой молекулы – продукта конкретного гена. В настоящее время в связи со стремительным развитием ДНК-технологий белковые маркеры оказались практически вытесненными из популяционной генетики изучением полиморфизма на уровне ДНК, что позволяет тестировать генетическую изменчивость не на уровне продуктов экспрессии гена, а на уровне генома. Следующим было выявление мини- и микросателлитных повторов, полиморфизм которых был связан со вставками-делециями элементарной единицы повтора и, как правило, отличался от белкового полиморфизма более широким аллельным разнообразием, а также отсутствием информации о функции [5].

К настоящему времени сменился целый ряд поколений различных типов молекулярно-генетических маркеров, начиная от моногенных «сигналий» А.С. Серебровского, полиморфизма запасных белков, ферментов, мини- и микросателлитных локусов, фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами, а в последние годы и метод выявления мононуклеотидного полиморфизма (*Single-nucleotide Polymorphisms, SNP*). Каждый из этих методов имеет свои достоинства и сложности, и они, в общем, дополняют друг друга [6].

Значительный уровень полиморфизма, выявляемый с использованием молекулярных маркеров, свидетельствует о высоком уровне работы этих молекулярных систем и определяет возможность использования при оценке генетической изменчивости между сортами, достоверная идентификация сортов. Молекулярные маркеры, ассоциативно связанные с генами, отвечающими за хозяйственно ценные признаки

растений, позволяют достоверно проводить отбор на уровне индивидуального растения или селекционной линии.

Возможности молекулярной селекции растений возросли настолько, что генетическая модификация стала практической технологией, созданы генетические карты десятков видов экономически важных растений, клонированы сотни ключевых генов, определяющих агрономически важные признаки у ведущих культур. В последние годы все увереннее обсуждается роль ДНК-технологий в ускорении процесса селекции, охране авторских прав селекционеров и защите продукции растениеводства от возможных фальсификаций [2, 3].

Многие методы ДНК-анализа являются высокоинформативными, хорошо воспроизводятся, надежны при установлении индивидуальных особенностей генотипа, но практически все они обладают некоторыми недостатками, такими как трудоемкость, дороговизна, сложность в постановке методик, трудности в интерпретации результатов, отсутствие надежной воспроизводимости протоколов.

В настоящее время насчитывается более 15 различных типов маркеров, используемых для молекулярно-генетического анализа генома растений. К наиболее популярным молекулярным маркерам можно отнести *RFLP*-, *CAPS*-, *STS*-, *SSR*-, *SNP*-, *RAPD*-, *SCAR*-, *AFLP*-, *SSCP*-, *ISSR*-маркеры [6]. Кроме вышеперечисленных, для генотипирования и паспортизации сортов и внутрисортных форм ячменя, пшеницы и других злаков в последнее время широко используются методы геномного фингерпринта – *IRAP* (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) и *REMAP* (*Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism*) (Ragupathy R. et al, 2010; Kalendar R. & Schulman A.H. et al, 2011; Boronnikova S.V., Kalendar R.N., 2010; Hosid E. et al, 2012). Данные методы основываются на полиморфизме ретротранспозонов – мобильных элементов генома.

Ретротранспозоны относятся к мобильным генетическим элементам, которые составляют основную часть генома растений. Эти мобильные элементы перемещаются по геному растений по принципу «копирование и встройка» транспозиции, с помощью РНК. По сравнению с другими методами, маркерные системы, основанные на ретротранспозонах, могут идентифицировать существенные изменения генома.

Ретротранспозоны используют как промежуточный этап жизненного цикла копирование своей РНК с помощью обратной транскрипции в ДНК-копию, которая встраивается в ДНК хозяина с помощью интегразы.

Последовательности ретротранспозонов несут регуляторные сайты (промоторы), опознаваемые ядерными факторами инициализации транскрипции для синтеза РНК-полимеразы II и III (рисунок 1) [7].

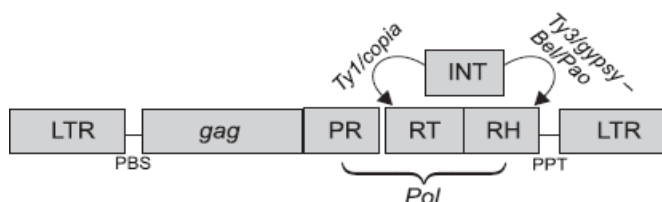


Рис. 1. Структурная организация *LTR*-ретротранспозонов

Мутации, создаваемые инсерцией ретротранспозона, оказываются стабильными в отличие от мутаций, вызываемых ДНК-транспозонами, поскольку последние при перемещении вырезают свою исходную копию из генома и уже затем встраиваются в другой сайт, в то время как копия ретротранспозона, встроившись, уже нигде не исчезает [7].

Ретротранспозоны имеют ряд преимуществ использования их в качестве молекулярных маркеров, ввиду их дисперсии в геноме, а также высокой степени выявляемого полиморфизма. Данный тип маркеров довольно широко используется в разработке стратегии маркерной (*marker assisted selection*) селекции [8, 9]. *LTR*-ретротранспозоны являются одним из наиболее распространенных и мобильных структур, играющих определенную роль в создании генетической пластичности и адаптации в ответ на экологический стресс [10, 11]. Активация ретротранспозонов в ответ на стрессовое воздействие определяется способностью их промоторов реагировать на сигнальные пути, регулирующие адаптации растений к биотическим и/или абиотическим стрессам. Был выделен новый ретротранспозон типа *Ty1-Copia*, названный *Ttd1a*, активизирующийся в ответ на засоление. Методами *RT-PCR* и *SSAP* было показано, что данный ретротранспозон расположен рядом с геном устойчивости. Мобилизация этого элемента может играть важную роль в ответной реакции на экологические стрессы [12].

Активация ретротранспозонов в ответ на биотический стресс (инфицирование токсинпродуцирующими грибами *рода Fusarium*) выявлена в работе Khairul I. Ansari [13].

Длинные концевые повторы (*LTR*) ретротранспозонов несут регуляторные сайты, опознаваемые некоторыми ядерными факторами. Последовательности *LTR*-ретротранспозонов используются для выявления полиморфизма между исследуемыми формами одного вида с помощью ПЦП-фингерпринтинга – *IRAP*, *REMAP* и *iPBS* методами.

IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polimorphism*) метод амплификации геномной ДНК между близкорасположенными последовательностями ретротранспозонов. Продукт ПЦП-амплификации геномной

ДНК является стабильным генетическим *IRAP*-маркером. Полиморфизм в данном случае обусловлен либо мутацией в участке связывания праймера, либо уникальным биологическим процессом – ретротранспозицией, в результате встраивания ретротранспозона в новый участок геномной ДНК без потери первоначального участка (рисунок 2) [14].

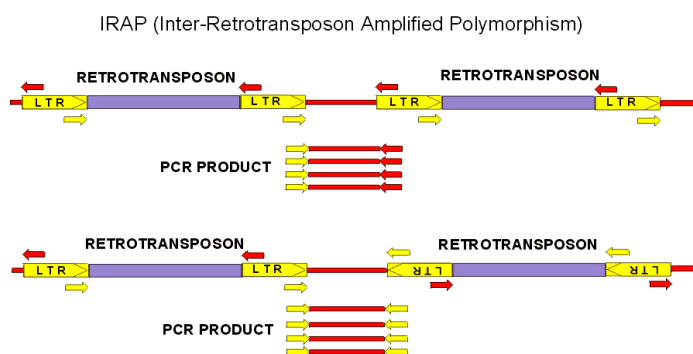


Рис. 2. Схематичное изображение IRAP-анализа

REMAP-анализ является методом ПЦП-фингерпринта, в котором в паре с праймером к последовательности ретротранспозона используются микросателлитные праймеры. Микросателлитный праймер имеет последовательность вида $(NN)n$, $(NNN)n$ или $(NNNN)n$, где $n=5-10$. Микросателлиты генома демонстрируют накопление мутаций со скоростью примерно соответствующей скорости видообразования (Kalendar R. & Schulman A.H., et al, 2011).

К основным достоинствам этих методов анализа генома относятся их информативность, способность выявлять полиморфизмы на внутри- и межвидовом уровне, и при этом - относительная простота выполнения, высокая воспроизводимость и экономичность.

Это связано с тем, что ретротранспозоны рассеяны по всему геному, включая теломерные и центромерные участки хромосом, кодирующие участки и гетерохроматин. Поскольку последовательности ретротранспозонов принимают участие в рекомбинации в мейозе и в митозе, они могут быть эффективно использованы для выявления внутривидовых генетических различий между линиями, сортами и популяциями, а также для близких видов, например, других злаковых, что чрезвычайно расширяет возможности направленной селекции растений. Методы *IRAP* и *REMAP* могут использоваться одновременно как на мягкой пшенице, так и на других видах пшеницы, также ячмене, ржи и овсе.

Важным моментом является и то, что активация ретроэлементов в растительном геноме происходит под влиянием различных стрессов – обезвоживания, низких или высоких температур, воздействия фитопатогенов, а также в ответ на введение в культуру *in vitro*. В некоторых исследованиях показано, что ретротранспозиция является наиболее вероятной причиной соматической изменчивости, индуцируемой культивированием *in vitro* (Campbell B.C., et al, 2011; Horáček J., et al, 2012).

Маркерные системы, основанные на полиморфизме ретротранспозонов, были использованы для идентификации и паспортизации разного рода растений. В частности, разработаны молекулярно-генетические паспорта для природных популяций *A. vernalis*. Авторы предлагают следующие этапы паспортизации: выбор эффективных стабильных молекулярных маркеров; сбор материала; подбор эффективных праймеров и проведение молекулярно-генетического анализа с использованием ПЦП; анализ выявленных *ISSR*- и *IRAP*-маркеров и определение идентификационных (мономорфных и полиморфных), а также составление молекулярно-генетической формулы, штрих-кода и генетического паспорта [15, 16].

Технология молекулярно-генетической идентификации и сертификации с использованием ретротранспозонов была апробирована на четырех популяциях редкого реликтового вида *A. lilifolia* (L.) A. DC. Молекулярно-генетический анализ, проведенный с использованием *ISSR*- и *IRAP*-маркеров на основе ПЦП позволил выявить сочетания специфических фрагментов ДНК. Составлены молекулярно-генетической формулы, штрих-коды и генетические паспорта популяций [17].

Подобные маркерные системы были использованы для паспортизации сортов ячменя. Была показана возможность использования *IRAP* и *REMAP*-маркеров для анализа генетического разнообразия сортов ячменя, а также выявлена высокая разрешающая способность этих маркеров при определении меж- и внутрисортного полиморфизма у сортов ярового и озимого ячменя. Проведенный анализ генетических взаимоотношений сортов ячменя позволил разработать молекулярно-генетические паспорта исследованных сортов ячменя в виде формул, отражающих аллельное состояние фиксированных локусов [18].

С использованием двух маркерных систем *IRAP* и *SSR* была проведена идентификация сортов картофеля. Были выявлены высокополиморфные локусы, характерные для конкретного сорта, однако авторы рекомендуют использовать, помимо молекулярных маркеров, еще и морфобиологические критерии, что продиктовано особенностями размножения данной культуры [19].

Для идентификации коммерческих сортов тетраплоидной пшеницы данные маркеры были использованы в исследованиях португальских ученых. С использованием маркеров, ориентированных на последовательности ретротранспозонов, относящихся к семействам *Fatima* и *Angela*, была выявлена внутрисортная изменчивость, проявляющаяся в качественных показателях муки, при этом была проведена идентификация сортов и их характеристика по этому показателю [20].

В связи со стремительными темпами развития селекции и появлением новых сортов растений, становится все более актуальной проблема их генотипирования и паспортизации, поэтому использование данных методов для выявления генетической оригинальности и оценки генетического разнообразия растений представляет несомненный интерес. Целью данных исследований было выявление генетической оригинальности сортов пшеницы с использованием маркеров, комплементарных последовательностям *LTR*-ретротранспозонов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве исходного материала использованы семена сортов яровой мягкой пшеницы, предоставленные сотрудниками лабораторий НПЦ ЗХ им. А.И. Бараева (п. Шортанды), ТОО КНИИРС (Карагандинская обл.) и различные типы молекулярно-генетических маркеров. Название праймеров и их нуклеотидная последовательность представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности выбранных праймеров

Название	Последовательность	Источник
Nikita	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC	Брик А.Ф.и др. (2006) [18]
Sukkula	GATAGGGTTCGCATCTGGGCGTGAC	Брик А.Ф.и др. (2006) [18]
LTR6149	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGGTTTATT	Carvalho A. et al. (2010) [21]
5'LTR2	ATCATTGCCTCTAGGGCATAATTC	Carvalho A. et al. (2010) [21]
LTR6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGGTA	Carvalho A. et al. (2010) [21]
LTR7286	GGAATTCATAGCATGGAATAATAAACGATTATC	Carvalho A. et al. (2010) [21]
8081	(GA) ₉ C	Carvalho A. et al. (2010) [21]
8082	(CT) ₉ G	Carvalho A. et al. (2010) [21]
8564	(CAC) ₇ T	Carvalho A. et al. (2010) [21]
560 Wis2	TTGCCTCTAGGGCATATTTCCAACA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
554 Wis2	CCAACTAGAGGCTTGCTAGGGAC	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2106 Wilma	AGCATGATGCAAAATGGACGTATCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2107 Wilma	AGCATGATGCAAAATGGACGTATCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2109 Daniela	TACCCCTACTTTAGTACACCGACA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2110 Daniela	TCGCTGCGACTGCCCGTGACA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
1090	AGAGAGGCTCGGATACCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
1091	CCCCTACCTGGCGTGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
1092	ACCTAGCTCATGATGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
1093	ACCTAGGCTCGGATGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
1096	CATCGTAGGTGGGCGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2074	GCTCTGATACCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2075	CTCATGATGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2077	CTCACGATGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2078	GCGGAGTCGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]
2079	AGGTGGGCGCCA	Calendar R., Alan H. Schulman [22]

Для проведения амплификации использовали ПЦП-смесь следующего состава: ДНК 25 нг; *Tris HCl* – 20 mM (pH 8,8); 2 mM $MgSO_4$; 10 mM KCl ; 10 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 μM праймеров; 200 μM *dNTP*, 1 е.а. полимеразы.

Амплификацию проводили при следующих условиях: первичная денатурация при 95°C в течение 3 мин; затем 31 цикл, состоящий из денатурации при 95°C в течение 15 сек, затем отжиг 30 сек при 52-61°C в зависимости от праймера и элонгация в течение 1 мин при 72°C, конечная элонгация проводилась при 72°C в течение 10 мин.

Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей Gel Doc, (Bio-Rad), с программным обеспечением QuantityOne (Bio-Rad). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали «DNA Ladder 1kb», (Ferments).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для обеспечения максимального выхода и специфичности продукта в каждом конкретном случае использования ПЦП необходимо оптимизировать условия реакции (подобрать концентрацию праймеров, ионов Mg^{2+} , дезоксинуклеотидов, матричной ДНК и полимеразы, подобрать время инкубации и температуру, состав инкубационной смеси [23].

Одним из основных факторов, влияющих на специфичность праймеров, является температура отжига, поскольку чаще всего она оказывает наибольшее влияние на связь праймера с матрицей и определяет термодинамическое перемещение компонентов реакционной смеси и определяет, какое усилие требуется праймеру для удержания на матрице.

Для определения оптимальных температур отжига праймеров была использована программа FastPCR (<http://www.primerdigital.com>) (таблица 2) [24].

В результате исследований были установлены оптимальные температуры отжига для каждого используемого в отдельности праймера.

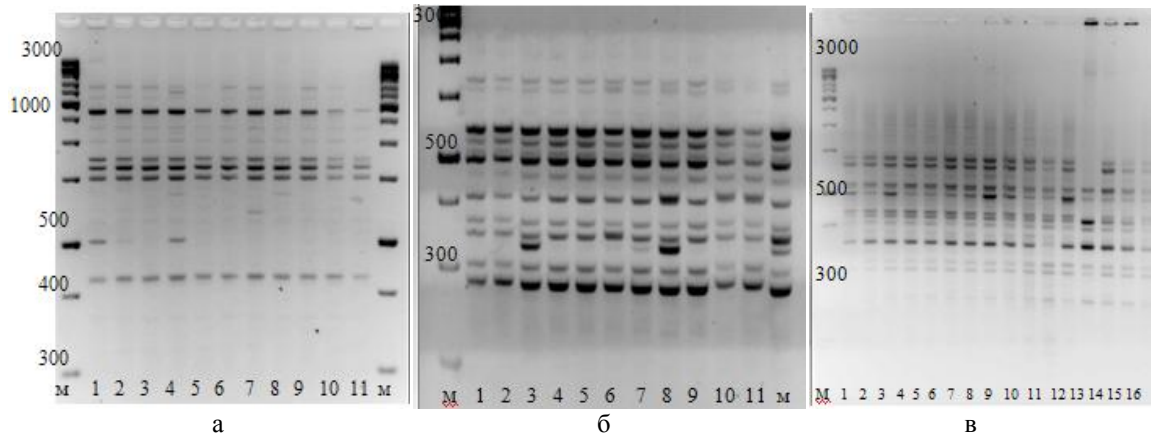
Таблица 2. Оптимальная температура для проведения амплификации

Праймер, комбинация	Оптимальная температура отжига, °C
8082	63,0
8081	57,0
8564	59,0
Sukkula; Nikita	61,0
Bare-1	62,0
5'LTR2;	63,0
554 Wis 2;560 Wis 2	64,0
2106 Wilma; 2107 Wilma	64,0
2109 Daniela; 2110 Daniela	59,0
1090; 1091; 1092; 1093; 1096; 2074; 2075; 2077; 2078; 2079	55,0

В ходе выполнения работы, с целью получения наиболее насыщенных спектров продуктов амплификации, были оптимизированы концентрации ионов магния, количество DMSO, количество и качество ДНК.

В наших исследованиях оптимальная концентрация магния для проведения ПЦП реакции составила 2,5 Мм в сочетании с 0,75 μ DMSO в смеси. Наиболее насыщенные спектры с характерными бендами наблюдали при использовании 25-50 нг ДНК в рабочей смеси.

В результате амплификации были получены четко различимые ампликоны, количество которых варьировало в зависимости от используемого праймера (рисунки 3, 4, 5).



а – праймер Sukkula; б - праймер 1089; в – праймер 1090

Рис. 3. Результаты амплификации ДНК пшеницы с праймерами, нацеленными на *LTR*-ретротранспозоны

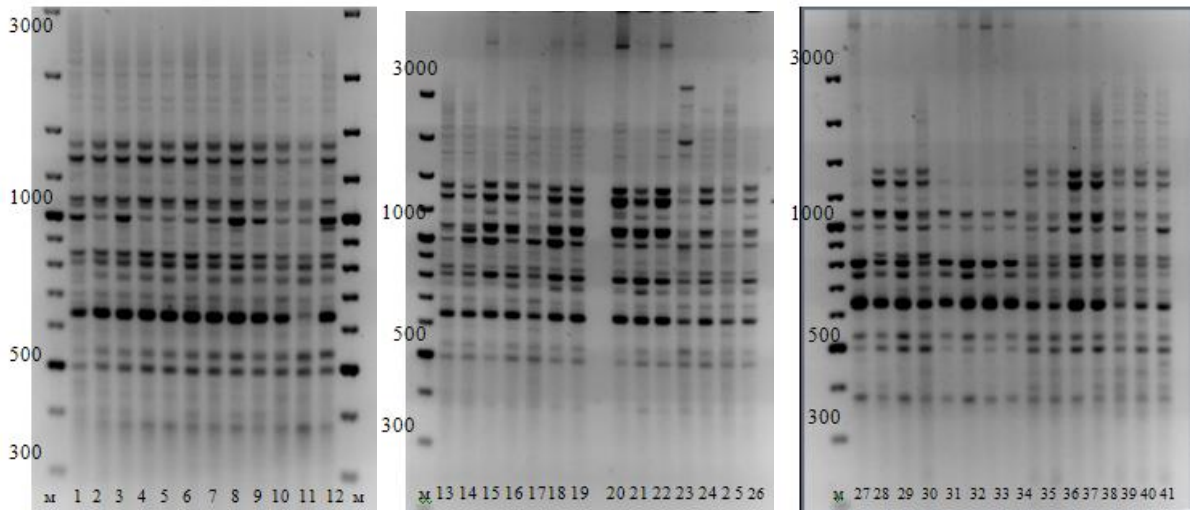


Рис. 4. Результаты амплификации ДНК пшеницы с видоспецифичным праймером 2109 Daniella, нацеленным на *LTR*-ретротранспозоны

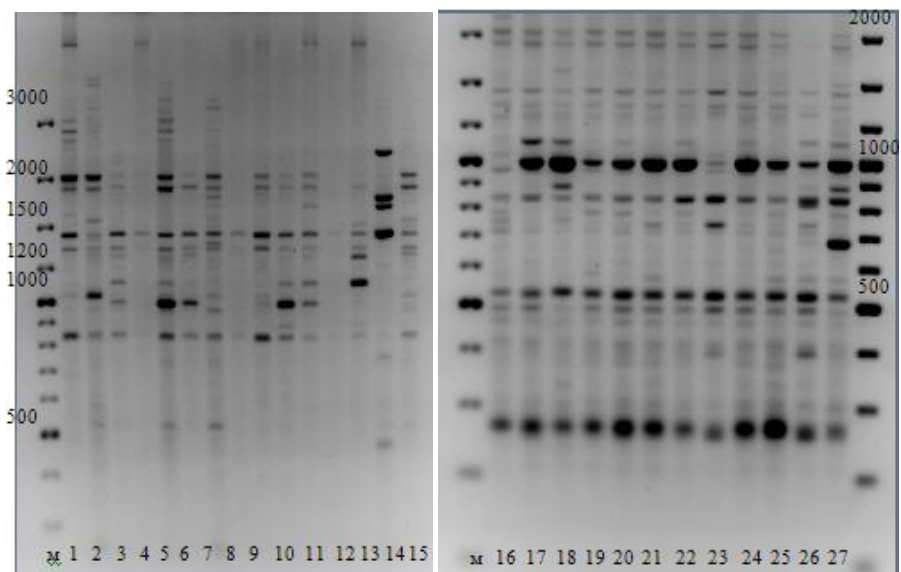


Рис. 5. Результаты амплификации ДНК пшеницы с праймером 1095, нацеленным на *PBS LTR*-ретротранспозонов

Фингерпринтинг проводили вручную путем подсчета амплифицированных фрагментов с использованием двойной системы переменных (1 и 0), в зависимости от наличия/отсутствия полос.

При исследовании 44 генотипов с использованием 19 праймеров было получено 217 ампликонов, размерами от 100 до 3000 bp, общее количество полиморфных фрагментов было 107, что составило 49,3% (таблица 2).

По результатам амплификации, наибольшее количество ампликонов было при использовании PBS праймера – 1095, было детектировано 29 ампликонов, из которых 13 были полиморфными.

Таблица 2. Анализ спектров амплификации ДНК пшеницы различных генотипов с использованием REMAP-ПЦР

Комбинация праймеров	Общее кол-во ампликонов	Кол-во полиморфных ампликонов	Процент полиморфизма, %	Размеры амплифицированных фрагментов
Универсальные праймеры				
Sukkula	12	10	83,3	400-3000
Nikita	8	6	75,0	500-4000
Видоспецифичные праймеры				
560 Wis2	14	2	14,3	550-2000
554 Wis2	8	2	25,0	600-1500
2106 Wilma	14	3	21,4	200-1500
2107 Wilma	9	2	22,2	300-2000
2109 Daniela	26	15	58,1	380-2100
PBS праймеры				
1089	14	7	50,0	290-4000
1090	11	9	81,8	200-2000
1091	7	4	57,1	400-2000
1092	7	4	57,1	400-2000
1093	11	4	36,4	100-2000
1096	7	5	71,4	490-1500
1095	29	13	45,1	280-3000
2074	5	-	-	500-4000
2075	4	1	25,0	500-800
2077	10	8	80,0	400-2000
2078	11	4	36,4	200-1000
2079	10	8	80,0	100-2000

При использовании универсальных праймеров наибольшее количество ампликонов (12) было детектировано у праймера Sukkula, при этом количество полиморфных ампликонов было 10, что составило 83,3% полиморфизма. Это был наиболее высокий показатель полиморфизма в данном исследовании. Высокая разрешающая способность данного праймера для выявления генетической оригинальности сортов была показана и в других исследованиях [18, 21]. Если оценивать группы праймеров по уровню определяемого полиморфизма, то очевидно преимущество универсальных праймеров. Видоспецифичные праймеры обладали незначительным уровнем полиморфизма (14,3-58,1%). Из этой группы праймеров наиболее эффективным оказался праймер 2109 Daniela, который позволил генерировать 26 ампликонов, из которых 15 были полиморфными.

Данные профилей амплификации, полученные с использованием различных маркеров, также оценивали с использованием техники фингерпринтинга с помощью информативных параметров, таких как индекс информативности праймера (PIC), средней информативности бендов (I_{bav}) и генетического индекса (GI), отражающего количество уникальных генотипов, детектируемых с использованием конкретного праймера.

Для определения индекса полиморфизма учитывались только все хорошо детектируемые бенды (полиморфные и мономорфные). Те бенды, наличие/отсутствие которых нельзя было четко различить, не включались в анализ [24].

Значение каждого из праймеров оценивали с помощью индекса полиморфизма (PIC) по формуле:

$$PIC = \sum (1 - P_i^2) / n, \quad (1)$$

где P_i - частота i-го образца (расположение бенда, так как каждая полоса рассматривается как один локус IRAP);

n - число бендов анализируемых регенерантов.

Также мы рассчитывали и среднюю информативность бендов I_{bav} по формуле:

$$I_b = 1 - (2 \times (0,5 - p_i)) \quad (2),$$

где p_i - доля регенерантов, содержащих i -бенд.

Этот показатель напрямую отражает разрешающую способность праймеров выявлять отличия между генотипами, который вычисляли по формуле (3) [24]:

$$R_p = \sum I_b \quad (3)$$

Результаты представлены в таблице 3. Индексы полиморфизма при использовании праймеров варьировали от 0,127 до 0,875. Генетический индекс изменялся в интервале 0–0,83. Разрешающая способность была наибольшей у праймера 2109 Daniela и составила 10,28.

Таблица 3. Оценка информативности праймеров, комплементарных последовательностям ретротранспозонов

Праймер	PIC	I _{bav}	R _p	GI
Sukkula	0,731	0,86	8,91	0,83
Nikita	0,432	0,69	8,50	0,75
560 Wis2	0,143	0,04	2,18	0,14
554 Wis2	0,219	0,39	1,32	0,25
2106 Wilma	0,308	0,23	3,01	0,21
2107 Wilma	0,272	0,18	1,93	0,22
2109 Daniela	0,875	0,64	10,28	0,78
1089	0,504	0,65	5,86	0,50
1090	0,714	0,50	9,20	0,82
1091	0,392	0,25	1,95	0,57
1092	0,233	0,15	1,23	0,57
1093	0,667	0,44	5,68	0,36
1096	0,191	0,35	2,84	0,71
1095	0,718	0,51	7,12	0,45
2074	0,127	0,03	3,85	0
2075	0,138	0,08	2,55	0,25
2077	0,248	0,04	3,98	0,80
2078	0,387	0,03	3,45	0,36
2079	0,485	0,05	1,34	0,80

По классификации Botstein et al (1990), к высокоинформативным праймерам относятся те, у которых $PIC \geq 0,5$, к среднеинформативным – имеющие значение PIC в интервале 0,5-0,25; к низкоинформативным – $PIC \leq 0,25$ [25].

Таким образом, данные исследования выявили, что наибольшая информативность праймера была в результате использования видоспецифичного праймера 2109 Daniela, PIC которого составил 0,875 при значениях I_{bav} 0,64 и генетическом индексе GI 0,78. Довольно высокие значения индекса информативности праймера (PIC) наблюдали при использовании праймеров Sukkula и PBS 1095, показатели которых составили 0,731 и 0,718 соответственно.

В результате для дальнейших исследований по идентификации генотипов пшеницы были выделены наиболее информативные праймеры, обладающие наиболее высокими значениями индекса полиморфизма: 2109 Daniela (PIC равен 0,875); Sukkula (PIC равен 0,731); и 1095 (PIC равен 0,718).

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории Института Биотехнологии, университета Хельсинки (**Institute of Biotechnology** МТТ/BI Plant Genomics Lab) г. Хельсинки (Финляндия), доценту, Ph.D Kalendar R. за оказанную помощь в конструировании праймеров и оптимизации условий амплификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // Сельскохозяйственная биология. - 1998. - С. 3-25.
2. Rieger R., Michaelis A., Green M.M. *Glossary of Genetics. Classical and Molecular.* - Springer. – Verlag. - 1991. - P. 550-553.

3. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю.М. Сиволапа. — Киев: Агрпромиздат, 1998. - 271 с.*
4. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. ДНК-технології вресстрації і охороні прав на сорти рослин // *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2005. - №1. - С. 66-74.*
5. Kalendar R.N., Price Z., Schulman A.H., Mays S. *Development of new marker methods – an example from oil palm // Plant Genetic Resources. – 2004. - №1. – Vol. 2/3. – P. 103-113.*
6. Глазко В.И., Цветков И.А., Иванов А.Н. IRAP маркеры в оценках дифференциации сортов риса // *Доповіди Національної академії наук України. - 2007. - №7. - С. 153-159.*
7. Llorens C., Futami R., Covelli L. et al. *The Gypsy Database (GyDB) of Mobile Genetic Elements: Release 2.0 // Nucl. Acids Res. (NARESE). - 2011. - Vol.39(1). - P.70-74.*
8. Vershinin A.V., Allnutt T.R., Knox M.R. *Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in Pisum diversity, evolution, and domestication // Mol. Biol. Evol. - 2003. - Vol.20. - P. 2067-2075.*
9. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Зинченко В.В. *Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции. - М.: Макс Пресс, 2006. – 80 с.*
10. Woodrow P., Pontecorvo G., Fantaccione S., Fuggi A., Kafantaris I., Parasi D., Carillo P. *Polymorphism of a new Ty-1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses // Theor. Appl. Genet. - 2010. – P.311–322.*
11. Ungerer M.C., Kawakami T. *Transcriptional Dynamics of LTR Retrotransposons in Early Generation and Ancient Sunflower Hybrids // Genome Biol. Evol. – 2013. – Vol. 5(2). – P. 329–337.*
12. Woodrow P., Pontecorvo G., Ciarmiello L.F., Fuggi A., Carillo P. *Ttd1a promoter is involved in DNA-protein binding by salt and light stress // Mol. Biol. Rep. - 2011. – Vol. 38. – P. 3787–3794.*
13. Botstein D., White R., Skolnick M., Davis W. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. - 1980. - Vol.32. - P. 314-331.*
14. Боронникова С.В., Календарь Р.Н. *Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений // Генетика. - 2010. - Т. 46, №1. - С. 44-50.*
15. Боронникова С.В. *Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода Adonis с использованием ISSR- и IRAP-маркеров // Известия ТСХА. - 2009. - №1. - С. 83–89.*
16. Боронникова С.В. *Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой уничтожения видов растений / Перм. ун-т. – Пермь, 2008. - 120 с.*
17. Боронникова С.В., Нечаева Ю.С. *Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редкого вида растений Пермского края A. lilifolia (L.) A. DC // Вестник Пермского университета. – 2012. – №1. – С. 41-44.*
18. Брик А.Ф., Календарь Р.Н., Стратула О.П., Сиволап Ю.М. *IRAP- и REMAP-анализ сортов ячменя одесской селекции // Цитология и генетика. – 2006. - №3. – С. 24-33.*
19. Novakova A. *Utilization of molecular markers in potato for variety identification and GMO detection and quantification // Phd. Thesis. – University of South Bohemia. – 2009. – 117 p.*
20. Pereira S. A.G., Silva M., Bento M. *Genomic analysis of commercial varieties of tetraploid wheat / Institute Superior de Agronomia. – Lisbon, 2012. – 15 p.*
21. Carvalho A., Guedes-Pinto H., Martins-Lopes P., Lima-Brito J. *Genetic variability of Old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers // Annals of Applied Biology. – 2010. – Vol. 156. – P. 337–345.*
22. Kalendar R., Schulman Alan H. *Transposon-Based Tagging: IRAP, REMAP, and iPBS // Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – 2014/ 01. - Edition: Volume 1115, Chapter: 12, Publisher: Humana Press, Editors.*
23. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Зинченко В.В. *Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции. - М.: Макс Пресс, 2006. – 80 с.*
24. Campbell B.C., LeMare S., Piperidis G., Godwin I.D. *IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley // Mol Breeding. - 2011. - Vol. 27. - P. 193–206.*
25. Botstein D. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. - 1980. - Vol. 32. - P.314-331.*

ТҮЙІН

Ауылшаруашылық дақылдарын жақсартудың негізгі көзі өсімдіктердің әлемдік генетикалық ресурстары болып табылады. Біріншіден - ол биотикалық және абиотикалық стрестерге төзімділік, тұқымның сапасы, өнімділік белгілері сияқты сапалық және сандық қасиеттері болып табылады [1, 2].

Гендік деңгейдегі биологиялық әртүрлілікті сақтау өзекті мәселе болып табылады. Бірінші дәрежелік міндеттердің бірі генетикалық әртүрліліктің технология мен критерилеріне баға беру тәсілін таңдау. Ғылымның басым бағытына өсімдік гендерінің талдауының даму технологиясы жатады. Практикалық селекция мен генетикалық аспектердің маңызды мәселелердің бірі қолданылатын материалға егжей-тегжей сипаттама беру. Осы мәселені шешу үшін ДНҚ полиморфизмінің талдауына негізделген жаңа технологиялар ойлап табылуда. Селекция нәтижесінде жасалған өсімдік сорттары өте сирек кездесетін қиыстырылған гендер аллелінен құрастырылады. Олар тіршілік жағдайына бейімделушілікті және құнды технологиялық белгілердің даму

деңгейіне жағдай жасайды. Өсіресе гендер аллелінің жиыны және ДНҚ нуклеотидтерінің тізбегі, сорттың «генетикалық паспорты» [3, 4].

Ұсынылып отырған зерттеу жұмыстарының мақсаты бидай сорттарының түпнұсқалық гендерін табу үшін ақпараттандырылған IRAP маркерлерін іздеу. Зерттеу объектісі ретінде жаздық жұмсақ бидайдың әр түрлі сорттарының тұқымдарын қолдандық. Нәтижесінде келесі зерттеулер үшін бидайдың генетикалық идентификациясына арналған полиморфизм индексінің мәні жоғары: 2109 Daniela (PIC тен 0,875), Sukkula (PIC тен 0,731), және 1095 (PIC тен 0,718) ең ақпараттандырылған праймерлер анықталды.

Кілтті сөздер: жаздық жұмсақ бидай, молекулалық маркер, IRAP, генотиптеу, полимераздық тізбектік реакция, ДНҚ.

SUMMARY

Global plant genetic resources are the main source of crop improvement. In the first place - is the quantitative and qualitative characteristics, such as resistance to abiotic and biotic stresses, grain quality, productivity features.

The problem of the conservation of biological diversity at the level of genes, is very important. One of the primary problems is the choice of approaches, techniques and criteria for assessing genetic diversity. Priority areas include the development of science technology analysis of plant genomes.

One of the important aspects of genetics and plant breeding practices in detail the material used. To solve this problem, introducing new technologies, which are based on the analysis of DNA polymorphism.

Created as a result of breeding plant varieties combine the unique combination of alleles of genes that adapt to the conditions of life and the level of development of technological features. Features a set of alleles and therefore sequences of DNA nucleotides, in fact, represent a "genetic passport" varieties [3, 4].

The aim of this research was to find the most informative IRAP markers to identify genetic originality wheat varieties. As objects of research used the seeds of spring wheat grades.

As a result of research for further studies on the identification of wheat genotypes were identified most informative primers having the highest values of the index of polymorphism 2109 Daniela (PIC is 0,875), Sukkula (PIC equals 0.731), and 1095 (PIC equal to 0,718).

Keywords: spring wheat, molecular marker, IRAP, genotyping, polymerase chain reaction, DNA.