

На правах рукописи

КАВРАКОВА ЗУБАЙДА БУРИХОНОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК У ВИДОВ
РОДА *AEGILOPS L.*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В
РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ
УСЛОВИЯХ ТАДЖИКИСТАНА**

03.00.12- физиология и биохимия растений,
03.00.15-генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ДУШАНБЕ- 2009

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии и геномной инженерии Института физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор
Насырова Фируза Юсуфовна,

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Наимов Сафарали

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Гиясов Таваккал Джураевич,
Таджикский национальный университет,

кандидат биологических наук
Усманов Тимур Пулатович,
Институт физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан

Ведущая организация: Таджикский аграрный университет

Защита состоится "___" _____ 2009 г. в ___ ч. на заседании диссертационного совета Д 047. 001.01 при Институте физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан (734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2, e-mail: asrtkarimov@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. И. Ганди Академии наук Республики Таджикистан.

Автореферат разослан "___" _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент Б.Б. Джумаев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в области сравнительной генетики зерновых злаков интенсивно проводятся эксперименты с использованием молекулярных маркеров. В результате таких исследований либо строятся практически лишённые функциональных генов карты, либо проводится "сравнительная привязка" того или иного гена разных видов к одним и тем же молекулярным маркерам (Гречко, 2002; Горюнова, 2004). Это связано с тем, что сравнительно-генетические исследования помогают эффективно сопоставить геномы разных видов растений и открывают дополнительные резервы мобилизации генетических ресурсов видов, родов при создании нового исходного материала, который может быть использован как для повышения эффективности генетических исследований, так и для селекции (Вавилов, 1967; Конарев, 1980; Алтухов, 1989; Гончаров, 2002).

Важнейшей характеристикой популяций служит их внутривидовая генетическая изменчивость, "полиморфизм" по дискретным качественным и непрерывным количественным признакам (Дрейпер, 1991; Зеленин, 2001; Жимулев, 2002).

Изучение практически всех видов рода *Aegilops L.* развивалось и развивается в связи с их высокой устойчивостью к ряду грибковых болезней и некоторым насекомым-вредителям, а также с возможностью проведения между ними и возделываемыми видами пшеницы интрогрессивной гибридизации для передачи им полезных признаков (Корень, 1998; Картель, 1999).

Географическое расположение Таджикистана с его своеобразными климатическими условиями, а также разнообразием диких представителей зерновых злаков представляет особый интерес для изучения полиморфизма ДНК генома видов *Aegilops L.* Поэтому нам представлялось вполне актуальным провести исследование природных форм и типов (биотипов) видов рода *Aegilops L.*, произрастающих в различных природно-климатических условиях Таджикистана с применением молекулярных маркеров.

Цель и задачи работы. Целью нашей работы было изучение полиморфизма ДНК у видов рода *Aegilops L.* с использованием молекулярных маркеров, а также геномный анализ образцов видов рода *Aegilops L.*, произрастающих в различных регионах Таджикистана. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- экспедиционные сборы семян видов рода *Aegilops*, произрастающих в различных природно-климатических условиях

Центрального, Южного и Северного Таджикистана, и их краткое фенотипическое описание;

- использование молекулярных маркеров на основе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для анализа генетической variability каждого вида;
- геномный анализ образцов видов, собранных в различных природно-климатических условиях Таджикистана;
- использование RAPD - маркеров для геномного анализа образцов видов рода *Aegilops*;
- использование микросателлитов или SSR - маркеров для выявления филогенетических связей между видами и внутривидового полиморфизма представителей рода *Aegilops* флоры Таджикистана;
- определение генетического расстояния и построение дендрограммы на основе анализа различных молекулярных маркеров для выявления степени генетической близости или различия у образцов изученных видов.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые с использованием двух типов молекулярных маркеров (RAPD и SSR) проведен анализ широкого набора образцов представителей четырёх видов рода *Aegilops*, произрастающих на территории Таджикистана. На основе полученных данных определены уровни внутри- и межвидового геномного полиморфизма и показаны существенные различия внутривидовой геномной variability у изученных видов. Обнаружен определенный параллелизм внутривидовой variability морфо-биологических признаков с variability молекулярного анализа генома. У исследованных видов *Aegilops* выявлен внутри- и межвидовой полиморфизм по всем использованным молекулярным маркерам, что свидетельствует об информативности данных маркеров. Впервые был проанализирован полиморфизм ДНК у видов, произрастающих на разных высотах над уровнем моря и в разных природно-климатических условиях Таджикистана. В связи с этим особую практическую значимость имеют результаты, касающиеся образцов, обладающих высоким уровнем изменчивости генов, ответственных за соле - и засухоустойчивость, а также устойчивостью к различным заболеваниям. Подобранные нами методы и праймеры позволяют эффективно выявлять меж- и внутривидовую изменчивость у изученных видов и могут быть использованы селекционерами в их работе по созданию устойчивых сортов зерновых злаков. Кроме того, полученные результаты были использованы при создании коллекции рода *Aegilops*, произрастающих в различных экологических условиях Таджикистана.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены (или представлены) на: шестом съезде физиологов растений РФ (Сыктывкар, 2006), второй Центрально-Азиатской конференции по зерновым культурам (Иссык-Куль, Киргизия, 2006), конференции, посвященной 120-летию Н.И.Вавилова "Вклад Н.И.Вавилова в изучение растительных ресурсов Таджикистана" (Душанбе, 2006), конференции посвященной 120-летию Н.И.Вавилова в ВИРе (Санкт-Петербург, 2006), семинаре лаборатории молекулярной генетики зерновых злаков Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (Новосибирск, 2007), конференции молодых ученых Академии наук Республики Таджикистан (Душанбе, 2007), конференции "Адаптационные аспекты функционирования живых систем" (Душанбе, 2007), конференции, посвященной 100-летию профессора О.Ш. Шукурова (Душанбе, 2008), конференции, посвященной памяти академика АН Республики Таджикистан Ю.С. Насырова (Душанбе, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, заключения, выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 97 страницах печатного текста, включая 9 таблиц, 11 схем и 15 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 118 работ.

Благодарность. Экспериментальная работа выполнена при поддержке гранта Международного научно-технического центра №Т-1105.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. Объекты и методы исследований

Материалом для исследования служили образцы четырёх видов рода *Aegilops* L. (Эгилопе) - однолетние травянистые растения, относящиеся к семейству злаков, которые являются ближайшими сородичами пшеницы. *Aegilops* имеют в составе своего аллополидного генома геном D: *Aegilops crassa* (геном $X^{cr}D^{cr1}$ и $X^{cr}D^{cr1}D^{cr2}$), *Aegilops cylindrica* (C^cD^c) и диплоидный вид *Aegilops tauschii* (D), который является донором D-генома для культурных сортов пшеницы. Кроме того, в анализ был включен диплоидный вид *Aegilops triuncialis* с геномом C и U.

Географическое расположение Таджикистана с его своеобразными природно-климатическими условиями и рядом

экстремальных факторов (температурные перепады, высотные пределы, засушливость, засоленность почв) способствовали формированию уникальных морфотипов *Aegilops L.* В зависимости от мест произрастания видов *Aegilops L.* формировались биотипы (морфотипы) с различной степенью устойчивости. Одни морфотипы приспосабливались к жарким и засоленным местам произрастания, другие - к местам с умеренной температурой. Более жесткие климатические условия, действуя как селективный фильтр, способствовали сохранению и распространению наиболее приспособленных биотипов.

Каждый из видов имеет свой высотный предел распространения:

Aegilops crassa Boiss. произрастает на высоте от 400 до 600 м над ур. моря; *Aegilops triuncialis L.* произрастает повсеместно как в Центральном, Северном, так и Южном Таджикистане до 2000 м над ур. моря; *Aegilops cylindrica Host.* произрастает в среднегорье и долинной части до 1600-1800 м над ур. моря; *Aegilops tauschii Coss.* распространен повсеместно на высоте от 360 до 2000 м над ур. моря (Наимов, 2002). Для анализа генома видов *Aegilops L.* отбирали образцы, собранные в разных регионах Таджикистана, характеризующихся своими природно-климатическими особенностями.

1.1. Выделение ДНК из проростков *Aegilops* микрометодом

ДНК выделяли из проросших семян согласно общепринятой методике (Plaschke et al., 1996).

1.2. Проведение ПЦР - анализа

В стерильных условиях готовили реакционную смесь, содержащую: ПЦР-буфер, смесь dNTP, праймеры, фермент Taq - полимеразу и образцы ДНК. Полученную смесь доводили дистиллированной водой до 25 мкл. Смесь в пробирке ставили в амплификатор и проводили ПЦР (Sharma, 1995, 2002).

Для RAPD-анализа использовался набор случайных праймеров длиной 10-11 нуклеотидов.

Для SSR-анализа использовался набор праймеров длиной 20-22 нуклеотидов для выявления полиморфизма длины простых повторов ДНК.

1.3. Проведение электрофореза в агарозном геле

Электрофорез ПЦР - продуктов проводили в агарозном геле. Для электрофоретического разделения фрагментов амплифицированной ДНК использовали 2% агарозный гель с добавлением бромистого

этидия (Sharma, 1995). После окончания электрофореза электрофореграммы фотографировали под ультрафиолетовым светом и анализировали с помощью системы Bio Doc System.

1.4. Анализ продуктов ПЦР в полиакриламидном геле (ПААГ)

Разделение немеченых продуктов амплификации, полученных с праймерами к SSR-последовательностям, проводили в 10% и 12% ПААГ. Электрофорез вели при напряжении 3-10 вольт/см в течение 6-20 ч. Гель окрашивали в растворе бромистого этидия (5 мкг/мл) в течение 20 мин, затем отмывали в дистиллированной воде в течение 20 мин и электрофореграммы фотографировали в УФ-свете. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали PstI-гидролизат ДНК фага λ (Plaschke, 1995; Pestsova, 1998).

ГЛАВА 2. Результаты исследований

2.1 Анализ RAPD - маркеров для генотипирования видов рода *Aegilops L.* флоры Таджикистана

Применение различных типов генетических маркеров, морфологических, биохимических и, особенно, молекулярных становится все более обычным в изучении генетики злаковых растений (Peterson, 1997). Однако становится все более очевидным, что разные типы генетических маркеров могут решать разные задачи (Belaj, 2002). Поэтому нами была поставлена задача использовать RAPD-маркеры для генотипирования видов рода *Aegilops* Таджикистана. Цель работы заключалась в изучении генетической изменчивости представителей рода *Aegilops* и сравнении генетического расстояния между различными образцами разных видов *Aegilops* с помощью RAPD-анализа.

Использованные виды рода *Aegilops* отличались друг от друга не только по месту произрастания и фенотипическим признакам, но и по структуре генома.

В настоящее время мало изучены сравнительная характеристика уровней внутривидового полиморфизма и филогенетические отношения у всех видов *Aegilops* с D-геномом. Для молекулярного анализа было отобрано по 30 образцов каждого вида рода *Aegilops*, произрастающих на территории Таджикистана. При отборе образцов мы руководствовались их географической приуроченностью, так, чтобы максимально охватить ареал вида и, тем самым, попытаться наиболее полно охарактеризовать генетическую вариабельность каждого анализируемого вида.

Каждый ПЦР-продукт амплифицируется из участка геномной ДНК, который содержит две короткие последовательности ДНК. Эти последовательности должны находиться на противоположных цепях и на достаточно близком расстоянии, чтобы амплификация прошла успешно. Использование коротких праймеров гарантирует то, что несколько случайно распределенных в геноме локусов дадут амплификационные продукты. Полиморфизм между особями может возникать из-за различий в одном или обоих сайтах связывания праймера и тогда выявляется при электрофорезе как присутствие или отсутствие отдельной RAPD-полосы (Мальшев, 1997). Если же амплифицируемый фрагмент ДНК-матрицы содержит инсерцию или делецию, то RAPD в основном наследуются как доминантные маркеры, кодоминантное наследование встречается относительно редко.

Таблица 1

RAPD - праймеры, использованные при генотипировании видов рода *Aegilops L.*

Название праймеров	Первичная структура праймеров	Количество фрагментов
R 031	-GTCTGA-CGCAT-G-(63%)	14-17
R033	-TGGTG-CTGAG-A-(54%)	14-19
R039	-AGCAC-CTCAC-A-(54%)	15-26
R058	-ATCGG-TCGGT-A-(54%)	11-20
R064	-ATGCC-CTAGA-(54%)	14-26
R068	-CAACT-AGACG-G-(54%)	12-20
R074	-CCCTG-AAACA-C-(45%)	13-18
R082	-GATGG-AACGA-C-(45%)	10-20
R091	-CATAC-GATAC-G-(45%)	17-23
R156	-TGCAC-ACTGA-(50%)	14-20
R157	-TGGTG-ACTGA-(50%)	18-25
R158	-TGGTC-TCTGA-(50%)	14-23
R159	-TGGTC-AGTGA-(50%)	07-12
R160	-TGGTC-ACTCA-(50%)	14-25
R177	-CCGAA-CGGGT-(70%)	13-17
R342	-GGCTG-CAATG-(60%)	11-17
R565	-CCAAA-ATCGT-A-(60%)	12-19

Для RAPD-анализа было отобрано 17 праймеров (табл. 1) длиной в 10-11 нуклеотидов, отобранных на основании выявления большего числа ПЦР-фрагментов при использовании их для амплификации геномной ДНК образцов *Aegilops*. ПЦР - анализ продуктов

амплификации проводили согласно описанным ранее методикам (Lapitan, 1992; Salina, 1998).

Анализ амплификации ДНК четырёх видов *Aegilops* с использованием 17 RAPD-праймеров выявил 1118 ПЦР - фрагментов. Каждый из праймеров образовал от 7 до 26 фрагментов ДНК, в зависимости от вида и изучаемых образцов.

Полученные результаты представляют интерес в плане выявления внутри- и межвидовой изменчивости у *Aegilops*. В RAPD - генотипирование были включены образцы видов, отличающихся друг от друга по ряду морфологических признаков: окраске колосьев и остей, меняющихся от светло-желтой до зеленой, коричневой и фиолетовой, а также присутствием или отсутствием воскового налета. Результаты электрофоретического исследования RAPD 17- праймера у 16 образцов видов *Ae. triuncialis*, *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii* и *Ae. crassa* представлены на рис. 1 и 2, где наблюдается проявление полиморфизма между образцами одного и того же вида и между изученными видами.

Вид *Ae. triuncialis* распространен во всех климатических условиях Таджикистана и имеет большой диапазон внутривидовой изменчивости по фенотипическим признакам, что позволяет виду адаптироваться к самым неблагоприятным факторам среды.

Среди 278 обнаруженных ПЦР-фрагментов у образцов *Ae. triuncialis* 182 из них (65, 4%) оказались полиморфными, то есть фрагменты цепочки ДНК данного праймера оказались разной величины у каждого образца, 96 (34, 6%) оказались мономорфными, то есть имели одинаковую длину фрагментов у всех изученных образцов.

Сравнение результатов RAPD-анализа с SSR-праймерами показывает обратную картину. 14 SSR-праймеры (43,4%) оказались полиморфными, 56,6% мономорфными. Эти данные позволяют нам предположить, что RAPD-праймеры можно использовать для анализа внутривидовой изменчивости видов рода *Aegilops*.

Вид *Ae. crassa* имеет узкий ареал распространения в Таджикистане (400-550 м над ур. моря) и характеризуется небольшим разнообразием по фенотипическим признакам. В наших работах было показано, что по микросателлитному анализу у *Ae. crassa* было обнаружено 81,3% полиморфных и 18 ,6% мономорфных локусов. В отличие от других видов, у *Ae. crassa* по RAPD-праймерам выявлен самый низкий уровень изменчивости - 48,1 % полиморфных и 51,9% мономорфных локусов. Полученные данные свидетельствуют о среднем уровне внутривидовой изменчивости *Ae. crassa* по RAPD-анализу. Это позволяет сделать заключение о том, что молекулярные

маркеры можно использовать для изучения внутривидового разнообразия видов рода *Aegilops*.

У вида *Ae. cylindrica* обнаружен высокой внутривидовой полиморфизм по фенотипическим признакам. Различия между использованными образцами проявляется в интенсивности окраски колосковых элементов. Из 281 ПЦР-фрагментов 207 (73,7%) были полиморфны и 74 (26,3%) мономорфны. Эти данные подтверждают данные по 14 SSR-праймерам, где 88,8% были полиморфные и только 11,2% мономорфные. Необходимо отметить, что только у праймера R 058 у одного образца *Ae. cylindrica*, собранного в Файзабадском районе, было обнаружено 100% полиморфных локусов. Высокий уровень разнообразия у этого вида, по-видимому, связан с тем, что вид очень пластичный и имеет большой диапазон внутривидовой изменчивости по местам их широкого произрастания в различных регионах Таджикистана.

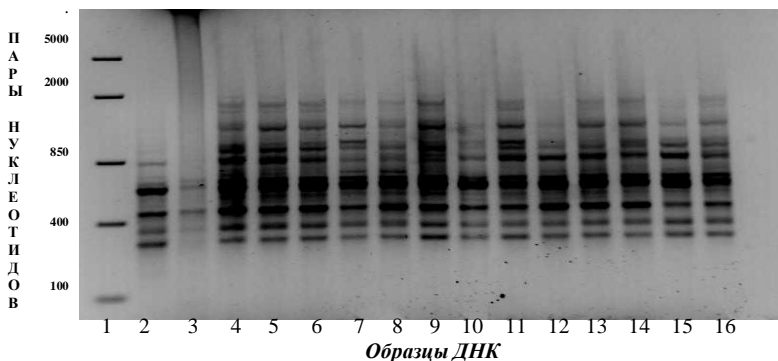


Рис.1. Электрофореграммы ПЦР - продуктов 157-RAPD праймера образцов *Ae. triuncialis*. **Обозначения:** 1.линейка; 2.Файзабадский р-н, около к-ка Дубеда, 3; 3.Гиссарский р-н, около соледобывающего источника, 5; 4. Рудакинский р-н, Эсанбой, 31-06; 5.Пенджикентский р-н, 33-06; 6. Пенджикентский р-н, 38-06; 7. Файзабадский р-н, Бодомо; 16; 8. Ходжа Обигарм, 17; 9. Пенджикентский р-н, 42-06; 10. Окулок, 8-06; 11. Файзабадский р-н, 15-06; 12. Файзабадский р-н, Чашмасор, 17-06; 13. Рудакинский р-н, Лохур, 22-06; 14. Рудакинский р-н, Лохур, 23-06; 15. Окулок, 25-06; 16. Рудакинский р-н, Эсанбой, 27-06. Указаны места произрастания и каталожные номера (Наимов и др., 2007).

Многие исследователи считают, что *Ae. tauschii* является донором современных тетраплоидных и гексаплоидных пшениц. Этот вид

используется в селекционной программе как донор устойчивости к абиотическим и биотическим факторам среды. В зависимости от места произрастания, возможно, разные биотипы *Ae. tauschii* адаптировались к различным воздействиям неблагоприятных факторов среды и, соответственно, это не могло не отразиться на молекулярном уровне генома.

Из 289 ПЦР-фрагментов, выявленных с помощью 17 RAPD-праймеров, у изученных образцов *Ae. tauschii* 161 (55,7%) были полиморфными и 128 (44,3%) фрагментов мономорфными. У этого вида почти половина обнаруженных фрагментов у всех изученных образцов остаются стабильными. Это свидетельствует о небольшой информативности данного праймера по отношению к геному *Aegilops*. При анализе 14 SSR-праймеров обнаружилась обратная картина по сравнению с RAPD-праймерам. Самый высокий уровень внутривидового полиморфизма (до 90,4 % у *Ae. tauschii*) был обнаружен у всех изученных видов с использованием данного праймера. Нами рекомендуется использовать этот праймер для изучения генома видов *Aegilops*.

На рис. 1 и 2 представлены результаты ПЦР-анализа по RAPD-праймерам, где имеются отличия в количестве фрагментов у различных видов рода *Aegilops*.

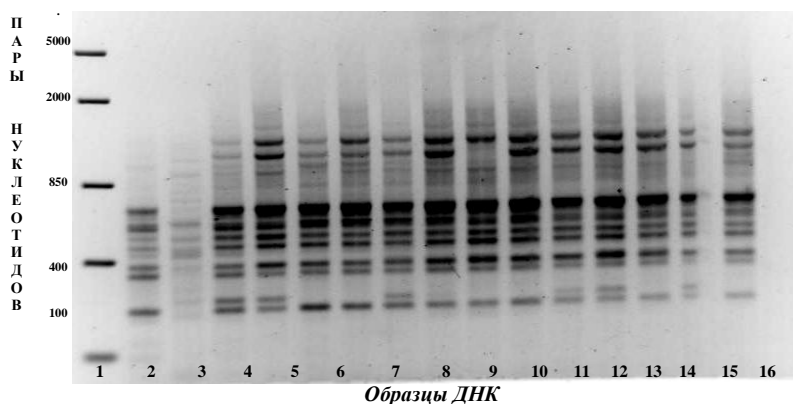


Рис. 2. Электрофореграммы ПЦР - продуктов с 157 -RAPD праймером образцов *Ae. tauschii*. **Обозначения:** 1. линейка; 2. Рудакинский р-н, Эсанбой, 7; 3. Карагазы, 10-1; 4. Пянджеский р-н, 16-2; 5. Оби Киик 3-1; 6. Раитский р-н, 36-1; 7. Тавилдаринский р-н, 37-1; 8. Рудакинский р-н, 41-1; 9. Файзабадский р-н, 14-06; 10. Рудакинский р-н, 24-06; 11. Пенджикентский р-н, 28-06; 12.

Пенджикентский р-н, 32- 06; 13. Пенджикентский р-н, 12-06; 14. Пенджикентский р-н, 26 06; 15. Гиссарский р-н, около соледобывающего источника, 42-06; 16. Раитский р-н, 35-1. Указаны места произрастания и каталожные номера (Наимов и др., 2007).

В качестве примера на рис. 1 приведены результаты анализа продуктов ПЦР, полученных с праймером R-157. Длина фрагментов - в пределах от 200 до 2000 п.н. при амплификации ДНК по 15 образцам каждого из видов *Aegilops*. Фрагменты ДНК, имеющие 340, 450, 420, 550, 650, 700, 850 п.н., оказались неполиморфными, а фрагменты длиной 380, 500, 750, 770 и выше 1000 п.н. оказались полиморфными.

Вид *Ae. crassa* имеет фенотипическую изменчивость, что подтвердил RAPD-анализ (48,1% фрагментов полиморфные). Уровень внутривидового различия по RAPD-анализу у различных видов *Aegilops* неодинаковый, что подтверждает их разнообразие в природе. В табл. 2 приведены сравнительные данные по RAPD- и SSR-анализу видов *Aegilops*, произрастающих в Таджикистане. В основном результаты по двум молекулярным маркерам совпадают с фенотипическим разнообразием признаков у всех изученных видов *Aegilops L.*

Таблица 2

Сравнительный анализ между RAPD- и SSR- праймерами
у видов *Aegilops*

Образцы <i>Aegilops L.</i>	SSR-фрагменты			RAPD-фрагменты		
	количество фрагментов в	полиморфные, %	мономорфные, %	количество фрагментов	полиморфные, %	мономорфные, %
<i>Ae. tauschii</i>	52	90,4	9,6	289	55,7	44,3
<i>Ae. cylindrica</i>	18	88,8	11,2	281	73,7	26,3
<i>Ae. crassa</i>	59	81,3	18,6	270	48,1	51,9
<i>Ae. triuncialis</i>	23	43,4	56,6	278	65,4	34,6

Как следует из приведенных выше данных, RAPD-анализ образцов *Ae. tauschii* проявляет примерно 50%-ный внутривидовой полиморфизм, что, вероятно, связано с его адаптивными возможностями. С использованием того же праймера у вида *Ae. crassa* проявился небольшой уровень внутривидового полиморфизма. Возможно, это связано с узким ареалом распространения данного вида в Таджикистане. В то же время из литературных источников известно,

что этот вид имеет высокий уровень хромосомного полиморфизма и разнообразие морфологических признаков (Гончаров, 2002).

В целом, виды, имеющие D-геном, проявляют общую картину фенотипической изменчивости по сравнению с видами, не имеющими D-геном. Таким образом, в результате RAPD-маркирования видов рода *Aegilops*, произрастающих в Таджикистане, впервые определен уровень генетического полиморфизма и коэффициент сходства их геномов с использованным молекулярным маркером.

Для оценки уровня внутривидовых различий для каждого из анализируемых видов *Aegilops* методом RAPD-маркирования было использовано 17 отобранных праймеров, которые показали высокую информативность при анализе геномов злаковых. Было проанализировано 53 образца четырех видов *Aegilops*, из которых обнаружено всего 1117 RAPD-фрагментов. По результатам анализа были определены генетические расстояния и иерархические кластерные группы внутри каждого вида (с использованием стандартной компьютерной программы NTSYS-рс, 2.0) и построены дендрограммы кластерного анализа. Максимальное внутривидовое сходство между группами образцов было отмечено для *Ae. cylindrica* (коэффициент генетического сходства составил 0,92).

Анализ коэффициента генетического сходства между различными образцами вида *Ae. triuncialis* показал, что имеется два основных кластера: первый кластер объединяет, в основном, образцы, произрастающие в северных регионах Таджикистана, а второй кластер - в южных регионах. Показано, что данный вид имеет наибольший уровень биоразнообразия среди всех изученных видов *Aegilops*. С точки зрения места произрастания по наибольшему генетическому разнообразию выделяются представители образцов, собранных в Файзабадском районе (населенный пункт Бодомо). Между образцами из Рудакинского и Варзобского районов (Лохур и Ходжа Обигарм) существенного различия не обнаружено. У вида *Ae. cylindrica* выделяются два кластера, внутри которых образцы располагаются равномерно. У видов *Ae. crassa* и *Ae. tauschii* по изученным праймерам выявлен примерно 50%-ный полиморфизм.

В задачу наших исследований входил также анализ филогенетических связей в группе видов *Aegilops*, имеющих D-геном, а также родственные отношения видов, не имеющих D-геном.

Как известно, диплоидный вид *Ae. tauschii* имеет D-геном, а виды *Ae. crassa* и *Ae. cylindrica* являются полиплоидными видами, но также имеют D-геном (Castilho, 1995). Поэтому молекулярный анализ установления филогенетических связей у видов с D-геномом является актуальным.

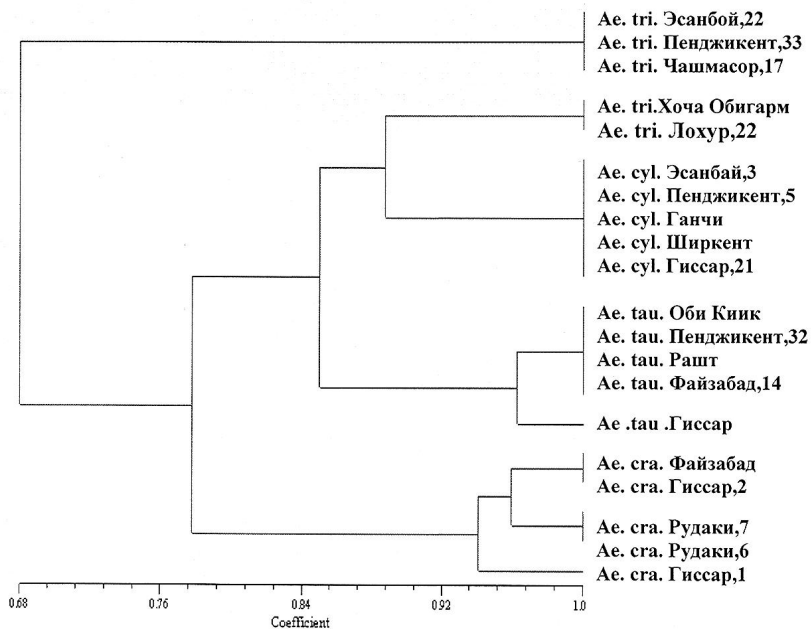


Схема 1. Дендрограмма, отражающая степень генетического сходства у изученных образцов различных видов рода *Aegilops* на основании данных RAPD-анализа.

Что касается полиплоидных видов *Ae. crassa* и *Ae. cylindrica* (схема 1) с D-геномом, то они имеют более низкий уровень внутривидового разнообразия. Наши данные показывают, что образцы вида *Ae. crassa* имеют более близкий уровень генетического сходства с *Ae. tauschii*, чем с *Ae. cylindrica*, что, по-видимому, связано с тем, что вид *Ae. cylindrica*, кроме D-генома, имеет еще и С-геном. Иногда образцы *Ae. cylindrica* могут образовывать один кластер с представителями других видов, в частности, наши данные показывают, что образцы *Ae. cylindrica* образуют общий подкластер с образцами вида *Ae. triuncialis* из Ходжа Обигарма и Лохура. Полиплоидный вид *Ae. triuncialis* не имеет D-генома, но имеет С и U -геном, благодаря которому этот вид образует единый кластер с *Ae. cylindrica*. Таким образом, виды *Ae. cylindrica* и *Ae. triuncialis* имеют общий геном С, что подтверждается наличием общего кластера по RAPD-праймеру.

В отличие от видов, имеющих D-геном, представители вида с U-геномом (*Ae. triuncialis*) характеризуются значительным уровнем внутривидового разнообразия. Этот вид является одним из

распространенных во флоре Таджикистан и имеет высокий уровень генетического разнообразия.

Как известно, различные виды рода *Aegilops L.* всегда привлекали большое внимание исследователей в качестве перспективных разнообразных генетических источников для селекции. Как показали многочисленные исследования, некоторые виды рода *Aegilops L.* принимали непосредственное участие в эволюционном становлении тетраплоидных и гексаплоидных пшениц (Долгушин, 1935; Дорофеев, 1966).

В последнее время для определения уровней межвидового и внутривидового геномного полиморфизма, определения филогенетических и эволюционных отношений между видами широко используются методы молекулярного анализа. Нами на основе результатов анализа полиморфизма фрагментов RAPD - праймера составлены дендрограммы, позволяющие определить коэффициент генетического сходства между различными образцами видов рода *Aegilops*. Необходимо отметить, что использование одновременно нескольких праймеров дает более полную картину генетического сходства при изучении генома растений.

2.2. Микросателлитный (SSR) анализ генома видов *Aegilops*, произрастающих в Таджикистане

Выбор SSR - маркеров для генотипирования основан, прежде всего, на высокой информативности данного метода. SSR - маркеры кодоминантны, близкородственные локусы содержат различные аллели, они широко распространены по всему геному и встречаются с частотой

1/10000 п.н. Также привлекает простота, доступность и экономичность этого метода. Выбор праймеров был основан на литературных данных и по рекомендации профессора М. Родер из Гатерслебена, Германия (Roder, 1998). Была выделена геномная ДНК из 5-8 растений микрометодом. Проведен ПЦР-анализ с каждой из выделенных ДНК и с каждой парой праймеров к микросателлитным районам, после этого был проведен электрофорез в агарозном геле и полиакриламидных гелях для выявления микросателлитных локусов. Нами был использован электрофорез продуктов ПЦР в 2% агарозном, а также в 8% и 12% - ых неденатурирующих полиакриламидных гелях для изучения в сравнительном аспекте методов разделения полиморфных микросателлитных локусов, различающихся по своей длине на несколько десятков пар нуклеотидов. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в 2% -ом агарозном геле при напряжении 100 V, в течение 2 ч. В 12 %-ом ПААГ концентрирование

продуктов ПЦР, имеющих одинаковый нуклеотидный размер, происходит наиболее четко, ампликоны определяются в виде неразмытых тонких полос с характерной локализацией для каждого образца ДНК. При анализе продуктов ПЦР в 12 %-ом ПААГ стало возможным выявить как внутривидовой микросателлитный полиморфизм (*Ae. crassa*), так и межвидовой (между *Ae. crassa*, *Ae. triuncialis*, *Ae. cylindrica*), что хорошо согласуется с уже известными и опубликованными данными по SSR-маркированию (Roder, 1998). Для обнаружения внутривидового и межвидового полиморфизма среди видов рода *Aegilops* использовали SSR-праймеры, любезно предоставленные нам из Германии профессором М. Родер. Нами было использовано 106 образцов *Aegilops* для анализа полиморфизма ДНК по SSR - праймерам.

В результате амплификации с использованием 14 SSR-маркеров было получено в общей сложности 152 ПЦР - фрагмента, из них 121 - полиморфные и 31 - мономорфные фрагменты.

Микросателлитный анализ показал, что количество ПЦР - фрагментов у использованных праймеров на один маркер варьировало от 1 до 20. В некоторых вариантах встречается только один ПЦР - фрагмент - мономорфный. Иногда у одного образца выявлялся более чем один фрагмент, что можно объяснить наличием внутривидовой гетерогенности. Данные SSR-анализа показали, что каждый вид обладал характерными, не повторяющимися ПЦР-фрагментами.

На рис. 3 приведены данные ПЦР-анализа SSR-праймера WSP-190 у различных образцов разных видов *Aegilops*. Например, микросателлитный анализ WSP-190 SSR-праймера показал наличие высокого полиморфизма ДНК внутри каждого изученного вида, а также между различными видами. Как показано на рис. 3, различные образцы *Ae. triuncialis*, произрастающего в различных регионах Таджикистана, дают три ПЦР-фрагмента.

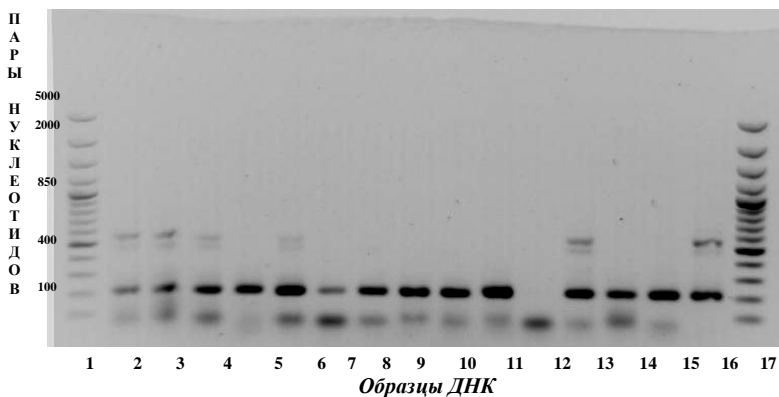


Рис. 3. Электрофореграммы ПЦР продуктов с 190-SSR праймером образцов *Ae. triuncialis*. **Обозначения:** 1. линейка; 2. Файзабадский р-н, возле к-ка Дубеда. 3; 3. Гиссарский р-н, около соледобывающего источника 5; 4. Рудакинский р-н, Эсанбай, 31-06; 5. Пенджикентский р-н, 31-06; 6. Пенджикентский р-н, 31-06; 7. Пенджикентский р-н, 38-06; 8. Пенджикентский р-н, 16; 9. Пенджикентский р-н, 17; 10. Пенджикентский р-н, 42-06; 11. Пенджикентский р-н, 46-06; 12. Пенджикентский р-н, 48-06; 13. Восточные Холмы г. Душанбе, 52-06; 14. Гиссарский р-н, около соледобывающего источника, 54-06; 15. Оқулок, 11-06; 16. Рудакинский р-н, Эсанбай, 2-06; 17. линейка. Указаны места произрастания и каталожные номера (Наимов и др., 2007).

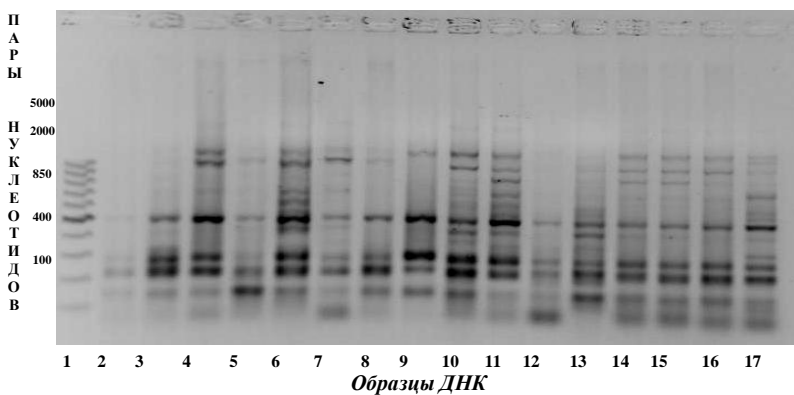


Рис.4. Электрофореграммы ПЦР продуктов с 190-SSR праймером образцов *Ae. tauschii*. **Обозначения:** 1-линейка; 2.

Рудакинский р-н, Эсанбой 3; 3. Карагазы 9-2; 4. Карагазы 10-1; 5. Карагазы 10-2; 6. Пянджский р-н, 12; 7. Пянджский р-н, 16-2; 8. Оби Киик; 9. Раштский р-н; 10. Тавилдаринский р-н; 11. Восточные Холмы, г. Душанбе; 12. Файзабадский р-н, 40; 13. Рудакинский р-н, 41-1; 14. Варзобский р-н, 15. Пенджикентский р-н, 2-06. Указаны места произрастания и каталожные номера (Наимов и др., 2007).

На рис. 4 представлены данные по ПЦР-фрагментам 30 образцов *Ae. tauschii* также с использованием WSP-190 SSR-праймера, свидетельствующие об обнаружении шести ПЦР-фрагментов. Эти результаты показывают, что 90% изученных образцов *Ae. tauschii* по данному праймеру полиморфные.

Таким образом, результаты анализов WSP-190 SSR-праймера, а также других праймеров выявили четкое внутривидовое различие у всех видов *Aegilops*.

Так, маркеры WSP- 006, WSP- 044, WSP-058 у всех изученных образцов и видов *Aegilops* имеют по одному фрагменту, маркеры WSP-046, WSP-082, WSP-130, WSP-156, WSP-190, WSP-192, WSP-619 для отдельных образцов и видов имеют по одному фрагменту. Обнаружено более трёх ПЦР-фрагментов по WSP-107 и WSP-120 - праймерам у всех видов *Aegilops*. Эти данные приведены в табл. 3. В основном, полиморфизм видов *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii* и *Ae. crassa* по 14 SSR-праймерам составляет 80-95%, за исключением вида *Ae. triuncialis*, у которого полиморфизм составляет всего 47%. Интересно, что результаты, полученные по *Aegilops triuncialis*, сильно отличаются от данных, полученных по другим видам.

Возможно, этот вид менее изменчив, независимо от места обитания. Литературные данные также подтверждают, что вид *Ae. triuncialis* более мономорфный. Результаты межвидового сравнения ПЦР-фрагментов показали, что между изученными нами видами наблюдается четкое различие при использовании различных праймеров. Данные микросателлитного анализа содержат информацию, необходимую для оценки генетического разнообразия, в частности таких характеристик, как число аллелей на locus и коэффициент сходства. Таким образом, использованный набор из 14 микросателлитных маркеров для анализа генома четырёх видов *Aegilops* позволяет охарактеризовать каждый изученный вид.

На основании полученных данных можно утверждать, что использованные нами SSR-праймеры весьма информативны и их можно использовать при изучении межвидовых и внутривидовых различий у злаковых культур и их сородичей. В литературе описано,

что D-геномные группы растений характеризуются меньшим внутривидовым полиморфизмом, чем большинство полиплоидных видов с U-геномом. Интересные результаты получила С.В. Горюнова (2004) - проведенный RAPD-анализ не выявил различия между плоидностью двух видов *Aegilops*, хотя эти виды очень сходны морфологически и некоторые авторы не рассматривают их как два самостоятельных вида.

По данным RAPD-анализа единственным исключением среди полиплоидных видов с U - геномом является *Ae. triuncialis*, который имеет крайне низкий уровень внутривидового различия, а также является малополиморфным по данным дифференциального окрашивания, что подтверждает наши результаты по SSR-маркированию.

Микросателлиты позволяют выявлять высокий уровень полиморфизма у зерновых злаков по сравнению с другими молекулярными маркерами. Из-за большого размера генома пшеницы только 30 % всех праймеров являются функциональными и пригодными для генетического анализа. Большинство таких маркеров наследуется кодоминантным способом и в большинстве случаев они являются хромосомоспецифичными и подходящими для изучения полиплоидных геномов. На рис. 3 и 4 представлены материалы по изучению различных SSR-маркеров у видов рода *Aegilops*. Эти данные показывают, что четко наблюдается внутривидовой полиморфизм среди образцов видов рода *Aegilops*, произрастающих в различных регионах Таджикистана. Также можно наблюдать межвидовые различия.

В табл. 3 представлены использованные SSR-маркеры, а также соотношение полиморфных и мономорфных локусов у изученных видов *Aegilops* и количество молекулярных фрагментов у различных SSR-праймеров. У SSR-праймеров WSP-190, WSP-192 встречаются фрагменты с молекулярной массой 100, 800, 1000 и 1200 п.н. У SSR-праймеров WSP- 6, WSP-58, WSP-82, WSP-107 WSP-120, WSP-130, WSP-192, WSP-513 и WSP-619 наблюдается 100%-ный полиморфизм. В табл. 3 представлено общее количество фрагментов ДНК у всех изученных видов рода *Aegilops*, произрастающих в Таджикистане. В этой же таблице приведены данные о полиморфных и мономорфных локусах всех использованных праймеров у всех видов *Aegilops*. Как видно из представленных данных, по SSR-маркерам у вида *Ae. triuncialis* наблюдается примерно 50 % полиморфных локусов, а у остальных видов (*Ae. cylindrica*, *Ae. crassa*, *Ae. tauschii*) полиморфные локусы составляют более 80%. Эти данные указывают на то, что уровень изменчивости у видов *Aegilops*, имеющих D-геном, примерно

одинаков. Используя программу соотношения генетического сходства и различия, составлена дендрограмма по данным SSR-маркеров. Данные по генетическому сходству *Ae. triuncialis* указывают на высокий уровень генетического разнообразия среди всех изученных видов *Aegilops*. Вид *Ae. triuncialis* образует несколько кластеров и подкластеров.

Наибольшее генетическое разнообразие встречается у образцов, произрастающих на территории Файзабадского, Пенджикентского и Рудакинского районов. Самый высокий коэффициент разнообразия наблюдается у образца 48, собранного в Пенджикентском районе, (коэффициент генетического сходства 0,70).

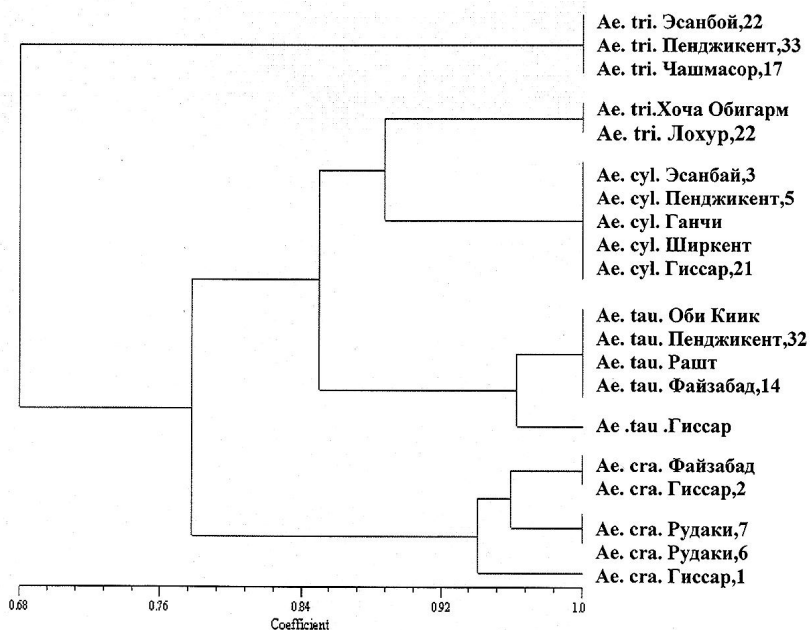


Схема 2. Дендрограмма, отражающая степень генетического сходства у изученных образцов различных видов рода *Aegilops* на основании данных SSR -анализа.

У вида *Ae. crassa* образцы, собранные в соседних регионах, располагаются в одни и те же группы кластеров. Среди образцов *Ae. tauschii*, произрастающего в различных регионах Таджикистана, нет четкого образования кластеров по месту их произрастания, о чем свидетельствует равномерный полиморфизм данного вида.

На дендрограмме 2 представлены данные SSR-маркеров по всем изученным нами видам рода *Aegilops* L., произрастающим в Таджикистане. Данная дендрограмма подтверждает результаты использования RAPD-праймеров о том, что образцы вида *Ae. triuncialis* образуют общий кластер с образцами видов *Ae. cylindrica*, хотя вид *Ae. triuncialis* не имеет D-генома. Но у них имеется общий геном С. Виды, имеющие геном D (*Ae. cylindrica*, *Ae. crassa*, *Ae. tauschii*), в дендрограмме расположены рядом и образуют свои кластеры и в некоторых случаях образуют общие кластеры.

Полученные нами данные на основании молекулярного генотипирования по SSR-праймерам показали различную степень внутри- и межвидового полиморфизма у различных видов *Aegilops*.

Таблица 3

Количество SSR- фрагментов, выявленных у различных видов *Aegilops*

SSR -праймеры	wsp 006	wsp 044	wsp 046	wsp 058	wsp 082	wsp 107	wsp 120	wsp 130	wsp 156	wsp 190	wsp 192	sp 32	wsp 513	wsp 619	Итого
Количество фрагментов	Aegilops tauschii														
всего	2	2	8	2	3	3	5	3	4	6	4	2	7	1	52
полиморфные	2	1	7	2	3	3	5	3	3	5	4	1	7	1	47
мономорфные	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	5
%полиморфных	100	50	87,5	100	100	100	100	100	75	83,3	100	50	100	100	90,4
%мономорфных	-	50	12,5	-	-	-	-	-	25	16,7	-	50	-	-	9,6
Aegilops triuncialis															
всего	2	2	1		2		5	1	2	4	1		3		23
полиморфные	1	2	-		1		-	-	1	1	1		3		10
мономорфные	1	-	1		1		5	1	1	3	-		-		13
%полиморфных	50	100	-		50		-	-	50	25	100		100		43,4
%мономорфных	50	-	100		50		100	100	50	75	-		-		56,6
Aegilops cylindrica															
всего			2			3	5		1	1	6				18
полиморфные			2			3	5		-	-	6				16
мономорфные			-			-	-		1	1	-				2
%полиморфных			100			100	100		-	-	100				88,8
%мономорфных			-			-	-		100	100	-				11,2
Aegilops crassa															
всего			4	1	2	2	20	5	5			6	5	9	59
полиморфные			3	-	1	-	17	5	2			6	2	9	48
мономорфные			1	1	1	2	3	-	3			-	3	-	11
%полиморфных			75	-	50	-	85	100	40			100	40	100	81,3
%мономорфных			25	100	50	100	15	-	60			-	60	-	18,6

ВЫВОДЫ

1. Впервые с использованием SSR -и RAPD- молекулярных маркеров проведен геномный анализ четырёх видов рода *Aegilops L*, произрастающих на территории Таджикистана. Определен уровень внутри- и межвидового полиморфизма видов *Aegilops* на уровне случайных ДНК-повторов (RAPD) и микросателлитных простых повторов генома (SSR).

2. Показано, что на молекулярном уровне виды, имеющие D-геном (*Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica* и *Ae. crassa*), содержат одинаковые фрагменты ДНК, а вид *Ae. triuncialis* - отличные от них фрагменты.

3. По результатам RAPD- и SSR- маркирования наиболее полиморфным является вид *Ae. tauschii* (по SSR- маркерам 90% составляет полиморфность и около 10% мономорфность).

4. По коэффициенту генетического сходства между различными образцами вида *Ae. triuncialis* образуется два основных кластера: первый кластер объединяет в основном образцы, произрастающие в северных регионах Таджикистана, а второй кластер - образцы *Aegilops*, распространенные в южных регионах.

5. Образцы вида *Ae. crassa* имеют более близкий уровень генетического сходства с *Ae. tauschii*, чем с *Ae. cylindrica*, что, по-видимому, связано с тем, что вид *Ae. cylindrica*, кроме D-генома, имеет еще и С-геном.

6. Микросателлитный анализ показал, что количество ПЦР -фрагментов у использованных праймеров на один маркер варьировало от 1 до 20. В некоторых вариантах встречается только один ПЦР -фрагмент- мономорфный. ПЦР-анализ праймера WSP-190 у различных образцов видов *Aegilops* выявил наличие высокой степени полиморфизма ДНК внутри каждого изученного вида, а также между различными видами.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Кавракова З.Б., Хурматов Х.Х. Перспективы использования молекулярных маркеров в селекции пшеницы // Материалы конф. молодых ученых АН РТ. Душанбе. 2007. С. 80-83.

2. Хурматов Х.Х., Кавракова З.Б., Файзиева С. А., Гулов М.К., Сергеев Д. А., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Анализ генетического разнообразия рода *Aegilops* с помощью молекулярных маркеров // Адаптационные аспекты функционирования живых систем. Материалы Республиканской конф. Душанбе. 2007. С. 154-158.

3. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Наимов С., Насырова Ф.Ю. Молекулярные маркеры ДНК в генетико-популяционных исследованиях // Изв. АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. 2007, №1 (158). С. 32-37.

4. Наимов С., Нигмонов М., Насырова Ф.Ю., Касымова Г.Ф., Хурматов Х.Х., Донцова С.В., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Сергеев Д.А., Гулов М.К., Алиев К.А., Рахматов А.С., Кичитов В.К. Каталог видов и образцов рода *Aegilops L.*, собранных в различных эколого-географических зонах Таджикистана // Институт физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан. Душанбе. 2007.

5. Наимов С., Нигмонов М., Насырова Ф.Ю., Касымова Г.Ф., Хурматов Х.Х., Донцова С.В., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Сергеев Д.А., Гулов М.К., Алиев К.А., Рахматов А.С., Кичитов В.К. // Авторское свидетельство № 048ТJ. Душанбе. 2007.

6. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Кавракова З.Б., Салина Е.А., Хлёткина Е.К., Насырова Ф.Ю. Геномный анализ культурных и дикорастущих форм зерновых злаков в Таджикистане // Материалы VI съезда Общества физиологов России. Межд. конф. Сыктывкар. 2006. С. 223-225.

7. Кавракова З.Б., Хурматов Х.Х., Наимов С., Насырова Ф.Ю. Изучение биоразнообразия видов рода *Aegilops L.* с помощью молекулярных маркеров // Материалы конф., посвящённой 100-летию со дня рождения проф. О.Ш. Шукурова. Душанбе. 2008. С. 47-48.

8. Кавракова З.Б., Хурматов Х.Х., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Молекулярное генотипирование видов *Aegilops L.*, произрастающих в Таджикистане // Материалы научной конф., посвящённой памяти академика Академии наук Республики Таджикистан Ю.С. Насырова. Душанбе. 2008. С. 44-45.

Подписано в печать 19.02.2009 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать ризография.
Тираж 100 шт. Объем 1,5 п.л.

Отпечатано в ООО «Азия-Принт»