

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СОРТОВ РИСА ПО IRAP МАРКЕРАМ

И.А. ЦВЕТКОВ\*, А.Н. ИВАНОВ\*\*, В. И. ГЛАЗКО

**Выполнен сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК с использованием праймеров RawS5, RawS6 и RawS11, концевых фрагментов ретротранспозон подобных элементов семейства R173 у 14 сортов риса. Получены данные о выраженных межсортных отличиях по сочетанию длин амплифицированных фрагментов ДНК, что свидетельствует о возможности их использования для генетической паспортизации сортов риса.**

Одной из актуальных проблем в селекции культурных растений является подбор молекулярно-генетических маркеров для создания генетического паспорта, выяснения генеалогических взаимоотношений между сортами, а также маркирования главных генов хозяйственно ценных признаков. В этом отношении последнее время особый интерес вызывает новый вариант молекулярно-генетических маркеров, основанный на изучении фрагментов ДНК, на концах которых находятся последовательности, комплементарные флангу ретротранспозона и его инвертированному повтору (IRAP), либо флангу ретротранспозона и участку микросателлитного локуса (REMAP) [2, 4, 5]. Чтобы оценить эффективность применения оценок полиморфизма IRAP маркеров (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism — полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными терминальными участками ретротранспозона) для сортовой идентификации в настоящей работе выполнен сравнительный анализ спектров таких маркеров у 14 сортов риса при использовании в качестве праймеров фрагментов ретротранспозон-подобных элементов одного и того же семейства R173 [1, 7, 8]. Это семейство исходно было описано у ржи (*Secale cereale*). Показано, что оно включает в себя около 15 тыс. индивиду-

альных копий на диплоидный геном, рассеянных по всем 7 хромосомам. Размер индивидуальных элементов его представителей варьирует от 3000 до 6000 пар нуклеотидов (п.н.) и 2 области, фланкирующие R173 элементы, несут высокую степень гомологии с флангами одного из ретротранспозонов пшеницы [7-8].

### Материалы и методы

В анализ включены 14 сортов риса из коллекции ВНИИ Риса (РАСХН, Краснодар), которые отличались по продолжительности вегетационного периода: раннеспелые сорта — Дальневосточный, Изумруд, Новатор, Садко, Спринт, Фонтан, Факел; средне-спелые — Виола, Лиман, Приморский, Янтарь и позднеспелые — Лидер, Снежинка. Препараты ДНК готовили с помощью набора реагентов «Silika» (ООО «Компания Биоком», Москва). Для этого 3-дневные проростки отделяли от зерновки и объединив их по 10 шт. гомогенизировали в лизирующем буфере из комплекта набора. ПЦР-смесь использовали готовую на основе «сухого ядра» (ООО «Компания Биоком»), праймеры прибавляли в количестве 20 пкмоль на реакцию. Длина праймера составляла 18 н., температура отжига варьировала от 50 до 56°C. В качестве праймеров использовали нуклеотидные последовательности, опубли-

\* Компания «Биоком», Москва.

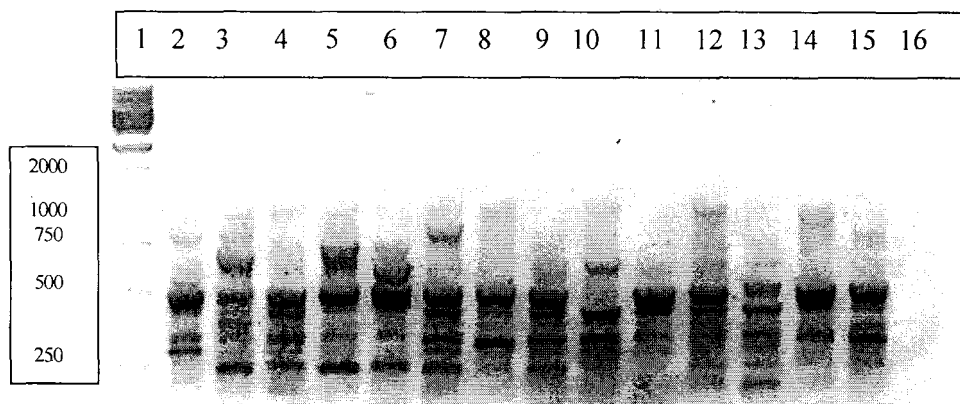
\*\* ВНИИ Риса, РАСХН, Краснодар.

кованные в работах [7-8], подобранные для амплификации фрагментов ДНК, на флангах которых находятся участки, комплементарные концевым последовательностям RawS5, RawS6 и RawS11 ретротранспозон подобных элементов семейства R173. Эти праймеры успешно применялись для генотипирования растений [1]. Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с трис-боратным буфером, окрашивали бромистым этидием, визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью геледокументирующей системы «vitran».

### Результаты и их обсуждение

Суммарный спектр продуктов амплификации (ампликонов) участков ДНК, фланкированных инвертированным повтором RawS5, полученный на ДНК разных сортов риса, включал 13 основных фрагментов, длиной от 1000 до 200 п.о., которые отчетливо воспроизводились при повторных амплификациях. При ПЦР с этим праймером у разных групп растений одних и тех же сортов не было обнаружено внутрисортных отличий по основным ампликонам.

В то же время, наблюдаются выраженные межсортные отличия: количество ампликонов варьировало от 5 (сорта Садко, Фонтан, Янтарь) до 9 (сорта Дальневосточный, Факел, Снежинка, рисунок). В спектрах ампликонов почти всех исследованных сортов регулярно присутствовали 2 фрагмента с длинами в районе 500-450 п.о. (табл. 1). В суммарном спектре ампликонов у 14 исследованных сортов преобладали относительно короткие фрагменты длиной 400-200 п.о. (42 ампликона) по сравнению с более длинными, 1000-700 п.о. (23 ампликона) (см. табл. 1). В то же время каждый сорт имел уникальное сочетание ампликонов. Наиболее сходными по такому сочетанию оказались сорта Приморский и Янтарь; они отличались только по присутствию у сорта Приморский фрагмента длиной около 1000 п.о., не выявленного у сорта Янтарь (см. табл. 1). Эти фрагменты маркируют последовательности ДНК, расположенные между участками, комплементарными праймеру и его инвертированному варианту. Можно ожидать, что их длина указывает на взаимное расположение копий ретротранспозон-подобного эле-



Спектр продуктов амплификации, полученный с использованием в качестве праймера последовательности RawS5: 1 — маркер молекулярной массы Gene *Rutre 1 kb DNA Ladder* (фрагменты 250, 500, 750, 1000, 2000 и более п.н.), 2 — Виола, 3 — Дальневосточный, 4 — Изумруд, 5 — Лидер, 6 — Лиман, 7 — Новатор, 8 — Приморский, 9 — Рапан, 10 — Садко, 11 — Спринт, 12 — Снежинка, 13 — Факел, 14 — Фонтан, 15 — Янтарь, 16 — отрицательный контроль

Таблица 1

Длины основных продуктов амплификации, выявленных у сортов риса при использовании в качестве праймера последовательности PawS5

Сорт	Длины ампликонов (п. о.)												Кол-во ампликонов	
	1000	950	850	750	700	600	500	450	400	350	300	250		200
<i>Раннеспелые:</i>														
Дальневосточный	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	9
Изумруд	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	7
Новатор	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	8
Садко	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	5
Спринт	0	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	6
Факел	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	9
Фонтан	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	5
В сумме 49 ампликонов у 7 сортов; в среднем 7 ампликонов на 1 сорт														
<i>Среднеспелые:</i>														
Виола	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	6
Лиман	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	7
Рапан	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	6
Приморский	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	6
Янтарь	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	5
В сумме 30 ампликонов у 5 сортов; в среднем 6 ампликонов на 1 сорт														
<i>Позднеспелые:</i>														
Лидер	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	7
Снежинка	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	9
В сумме 16 ампликонов у 2 сортов; в среднем 8 ампликонов на 1 сорт														
В сумме 23 ампликона					В сумме 42 ампликона									
длиной в 1000–700 п. о.					длиной в 400–200 п. о.									

мента, локализованных в комплементарных цепях ДНК. Судя по полученным данным, расстояние между такими копиями достаточно короткое по сравнению с длиной самого элемента (3000–6000 п.о., [7]), от 1000 до 200 п.о., преимущественно в районе 500–200 п.о., что позволяет предполагать кластерную организацию таких повторов в геноме риса. Интересно отметить, что использование того же праймера PawS5 в исследованиях разных таксонов растений позволило получить сходную с рисом картину распределения длин продуктов амплификации у сортов картофеля, но не у подсолнечника, у которого большинство полученных ампликонов оказалось длиннее 1000 п.о. [1].

Разнообразие сортов по продуктам амплификации свидетельствует о том, что инсерции / делеции таких фрагментов достаточно активно происходят в рассмотренных сортах риса.

Высокая скорость эволюции генома риса, связанная с транспозирующими элементами, достаточно подробно

описана в литературе [6]. Показано, что скорость делеций и инсерций транспозирующихся элементов у риса в 2 раза выше, чем средний уровень синонимичных замен по структурным генам. Повышенная мобильность членов семейства R173 обнаружена по внутрисортной изменчивости их присутствия/отсутствия у сорта ржи в связи с продолжительностью хранения семян [3].

По-видимому, именно высокая скорость эволюции транспозирующихся последовательностей в геноме риса и может объяснять уникальность сочетания продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором PawS5 для каждого из 14 исследованных сортов риса.

В нашей работе у тех же сортов риса был выполнен сравнительный анализ спектров продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймеров пары PawS6 и PawS11, маркирующих расстояние между инсерциями в альтернативных цепях ДНК

2 разных членов семейства R173. Полученные данные представлены в табл. 2. Количество четко выявляемых продуктов амплификации в этой системе оказалось существенно меньше (7), а длина их заметно больше (от 1900 до 400 п.о.), чем в случае использования в качестве праймера одной последовательности RawS5. У сорта Спринт продуктов амплификации в этой системе получить не удалось, у 5 сортов выявлены 1-2, у остальных — 3-6 ампликонов. Каждый сорт и по этим ампликонам имел уникальный, сорт-специфичный спектр, позволяющий отличать один сорт от другого по присутствию/отсутствию отдельных фрагментов ДНК. Таким образом, и по распределению сайтов инсерции этих 2 элементов семейства R173 наблюдается выраженная межсортовая изменчивость.

По спектрам продуктов амплификации, полученным с использованием в качестве одного праймера RawS5 и 2 — RawS6 и RawS11, не удалось обнаружить выраженных различий между группами сортов по продолжительности вегетационного периода (табл. 1, 2).

Можно ожидать, что сортовая специфика спектров ампликонов, их относительно повышенное или пониженное количество по сравнению с другими сортами может в определенной степени отражать потенциальную генетическую стабильность сорта, поскольку она тесно ассоциирована с актами инсерций/делений элементов семейства R173. В этой связи интересно отметить, что по суммарному количеству выявленных ампликонов (см. табл. 1,2) наибольшее их количество наблюдается у сортов Дальневосточный и Снежинка, один из которых, Дальневосточный, относительно недавно интродуцирован в Краснодарский край. Однако этот вопрос, очевидно, нуждается в дальнейших исследованиях.

Выполненные исследования свидетельствуют о высокой сорт-специфичной изменчивости сайтов инсерции элементов семейства R173 в геноме риса. Использование в качестве праймера последовательности RawS5 позволяет получать относительно простые, хорошо воспроизводимые спектры продуктов амплификации, удобные для их

Таблица 2

Длины продуктов амплификации, выявленных у сортов риса при использовании в качестве праймеров последовательностей RawS6 + RawS11

Сорт	Длины ампликонов (п. о.)							Кол-во ампликонов
	1900	1000	950	900	650	600	400	
<i>Раннеспелые:</i>								
Дальневосточный	+	+	0	+	0	+	+	5
Изумруд	+	0	0	0	0	0	0	1
Новатор	+	0	0	0	0	+	0	2
Садко	+	0	0	0	0	0	0	1
Спринт	0	0	0	0	0	0	0	0
Факел	0	0	0	0	0	0	+	1
Фонтан	+	+	+	+	+	+	0	6
В сумме 16 ампликонов у 7 сортов; в среднем 2,3 ампликона на 1 сорт								
<i>Среднеспелые:</i>								
Виола	+	+	0	0	0	0	0	2
Лиман	+	0	+	+	0	+	+	5
Рапан	+	0	0	0	+	+	0	3
Приморский	+	0	+	+	+	0	0	4
Янтарь	+	+	0	0	+	0	0	3
В сумме 17 ампликонов у 5 сортов; в среднем 3,5 ампликона на 1 сорт								
<i>Позднеспелые:</i>								
Лидер	+	+	0	+	+	+	0	5
Снежинка	+	+	+	+	0	0	+	5
В сумме 10 ампликонов у 2 сортов; в среднем 5,0 ампликона на 1 сорт								

применения при сортовой идентификации исследованных сортов риса. Использование 2 последовательностей в качестве праймеров (PawS6 и PawS11) относительно менее эффективно в связи с меньшим количеством продуктов амплификации в спектрах и возможностью их отсутствия у отдельных сортов. Тем не менее, и в этом случае выявляется сорт-специфичность спектров ампликонов у исследованных сортов риса. В общем, эта система оказывается достаточно удобной для исследований молекулярно-генетической дифференциации между сортами риса и использования полученных данных в прикладных и теоретических исследованиях.

*Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-96788-р\_юг\_а)*

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Зайцев В.С., Хавкин Э.Е.** Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173 // Докл. РАСХН, 2001. № 2. С. 3-5. — 2. **Календарь Р.В., Глазко В.И.** Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений, 2002. Т. 34. № 4. С. 141-156. — 3. **Chwedorzewska K.J., Bednarek P.T., Puchalski J.** // Cell Mol Biol Lett, 2002. V. 7. N. 2A. P. 569-576. — 4. **Flavell A.J., Knox M.R., Pearce S.R.** // Plant J., 1998. V. 16. P. 643-650. — 5. **Kalendar R., Grob T., Regina M. et al.** // Theor. Appl. Genet., 1999. V. 98. P. 704-711. — 6. **Ma J., Bennetzen J.L.** // PNAS, 2004. V. 101. N. 34. P. 12404-12410. — 7. **Rogowsky P.M., Liu J.Y., Manning S. et al.** // Plant Mol Biol, 1992. V. 20, N. 1. P. 95-102. — 8. **Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P.** // Genome, 1992. V. 35. N. 4. P. 621-626.

*Статья поступила  
12 октября 2006 г.*

## SUMMARY

The comparative analysis of amplification product DNA spectra, which were received with the use as primers PawS5, PawS6 and PawS11, the end fragments of retrotransposon-like elements of family R173, in 14 rice varieties was carried out. The data about expressive differentiation between rice varieties on the combination of amplification products with different length of DNA fragments were obtained. It demonstrated the possibility to use these fragments for genetic identification of rice varieties.