The article considers a new method of sowing in the early stages of barley breeding. The experimental research was carried out in 2017 in the Krasnoufimsky breeding center. Barley was used as the test culture for seeding. Methods of sowing that have been used were as follows: manual method (method «in the pipe») and the method with the use of the mechanized seeder SSFK-7. In the design of the sowing device SSFK-7, plastic funnels were added, which are located in the apparatus of batch sowing, snug against the blades of the cells. Plastic funnels are located evenly, so that the distance between them is the same, they move in a circle, which ensures the seeding of the seeds in portions, each being a line or a family. The seed tube that

goes from the batching machine to the centrifugal seed distributor is disconnected, instead of it the branch pipe is connected to the cross, which distributes the seeds to two extreme right coulters, the other openers in this seeding method are not working. Analysis of the research results showed great practical value of the new method of seeding with the SSFK-7 seeder for the selection of breeding nurseries. The effectiveness of this method is characterized by a reduction in sowing time and labor intensity by 1,9 times. The improvement of the selection process and the replacement of manual labor with mechanized labor will make it possible to significantly increase the amount of selection in the future and to obtain high results in breeding.

© Максимов Р.А.

УДК 635.62: 575.174.015.3

DOI: 10.31563/1684-7628-2018-46-2-49-53

А.В. Худякова, А.В. Федоров

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ТЫКВЕННЫЕ

Ключевые слова: *Cucurbitaceae*; ISSR-праймеры; величина информационного полиморфизма; разрешающая способность праймера; дендрограмма генетического сходства.

Введение. Тыквенные (*Cucurbitaceae*) – крупное семейство растений, которое включает 960 видов и 125 родов. Виды семейства находят широкое применение: плоды многих из них съедобны (дыни, огурцы, тыквы, арбузы и др.), другие виды используются при изготовлении сосудов и музыкальных инструментов (лагенария), губок и набивочного материала (люффа) и т. п. Некоторые виды обладают лекарственными свойствами или разводятся как декоративные растения (переступень, люффа, лагенария) [3]. Для обеспечения более высокой устойчивости к вредителям, неблагоприятным факторам окружающей среды и повышения урожайности овощных культур зачастую применяют метод прививки [10]. Привитое растение состоит из двух частей: нижней, образующей корневую систему и называемой подвоем, и верхней части привитого растения, формирующей надземные органы, – привоя [2]. Успех срастания и последующего роста прививки зависит от степени совместимости привоя и подвоя. Существует несколько классификаций несовместимости прививки. Согласно одной из них выделяют механическую, выражающуюся в недостаточном срастании, и физиологическую несовместимость, которая ведет к снижению длины приростов и к отставанию в росте. Од-

ной из причин последней является генетическая отдаленность прививаемых компонентов и, как следствие, несоответствие их жизненных ритмов, особенно в сроках наступления периода покоя [4, 9]. Для выявления несовместимости привоя и подвоя используют визуальные и физиолого-биохимические методы диагностики [2, 10]. Однако в последнее время предпочтение получили молекулярно-генетические методы оценки генетической совместимости на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением ДНК-маркеров. Так, отбор подвоев, близких по профилю ДНК с привоем, активно развивается в отношении плодово-ягодных культур [1, 11]. Подобные работы, связанные с изучением генетического разнообразия растений семейства *Cucurbitaceae* с целью установления наилучших привойно-подвойных комбинаций, в доступной литературе отсутствуют.

Одним из наиболее эффективных инструментов оценки генетического полиморфизма являются микросателлиты, которые относятся к высокополиморфным маркерам растительных геномов [15]. Метод ISSR-типирования (Inter-Simple Sequence Repeat) является быстрым, экономически выгодным, не требует предварительного клонирования и секвенирования

фрагментов для подбора праймеров и хорошо воспроизводим в строгих условиях реакции [7]. Маркеры данного типа используются для выявления генетической идентичности, родословной, дифференциации клонов, микроклонов и линий, таксономии близкородственных видов.

Цель исследования – поиск наиболее информативных праймеров для ISSR-генотипирования растений семейства *Cucurbitaceae*.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили 10 видов семейства *Cucurbitaceae*: арбуз шерстистый *Citrulus lanatus* L., дыня *Cucumis melo* L., тыква крупноплодная *Cucurbita maxima* Duch., тыква твердокорая *C. pepo* L., тыква мускатная *C. moschata* Duch., тыква фиголистная *C. ficifolia* Bouche.,

лагенария (тыква горлянка) *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl., бенинказа *Benincasa hispida* (Tunb.) Cogn., момордика харанция *Momordica charantia* L. и трихозант змеевидный *Trichosanthes cucumerina* L.

Выращивание семян проводили в микропарниках при 16-часовом световом периоде. Геномную ДНК выделяли из листьев двухнедельных проростков СТАВ-методом. Использовали 100 мг растительной ткани. Для нивелирования внутривидового полиморфизма каждый образец представлял собой смесь ДНК 3 индивидуальных генотипов. Молекулярно-генетический анализ осуществляли с использованием 5 ISSR-праймеров (ООО «Евроген Лаб», Россия) (таблица 1).

Таблица 1 Характеристика использованных ISSR-праймеров

Праймер	Последовательность	T _{отжига}	Источник
I-1	(CA) ₈ T	48,5	Payel D. et al., 2015
I-4	(AC) ₈ G	52,8	
I-11	(GTG) ₅ AG	57,6	
I-15	(CT) ₈ AC	53,6	
UBC808	(AG) ₈ C	52,0	Behera T.K. et al., 2008

Амплификацию проводили на термоциклере «Терцик» (Россия) в объеме 25 мкл. Для приготовления ПЦР-образцов использовали смесь ScreenMix-HS (5x) (ООО «Евроген Лаб», Россия). К каждой пробирке добавляли каплю минерального масла. Условия проведения реакции: предварительная денатурация 94 °C, 2 мин; первые пять циклов 94 °C, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72 °C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94 °C, 5 сек.; t° отжига, 5 сек.; 72 °C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72 °C [7]. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7 %-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Для определения длины амплифицированных фрагментов ДНК использовали маркер молекулярных масс (100 + bp DNA Ladder) (ООО «Евроген Лаб», Россия). Все ПЦР были проведены трижды для верификации воспроизводимости результатов.

Для количественной оценки степени полиморфизма и определения уровня дивергенции между изучаемыми объектами полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие воспроизводимых полос на геле рассматривалось, как состояние 1 или 0 соответственно. Дендрограмма, отражающая степень родства исследуемых видов по ISSR-спектрам, была построена невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA – unweighed pair-group method using arithmetic average) при помощи компьютерной программы Treecon 1.3b.

Для анализа полиморфизма были использованы статистические параметры: величина информационного полиморфизма (PIC) и разрешающая способность (Rp), которые вычисляли отдельно для каждого праймера согласно формулам [14]:

$$PIC = 1 - 1/L \sum p_i^2, \quad (1)$$

где L – общее количество аллелей, p_i – частота i -го аллеля;

$$Rp = \sum Ib_i, \quad (2)$$

где $Ib_i = 1 - [2 \times |0,5 - p_i|]$ – информативность ампликона, p_i – доля особей, у которых выявлен i -й аллель.

Результаты и обсуждение. Для сравнительного анализа полиморфизма растений, принадлежащих различным систематическим группам, были подобраны ISSR-маркеры, высокополиморфные по результатам предварительных исследований [12, 14].

Каждый из 5 праймеров анализировали отдельно в ISSR-ПЦР с геномной ДНК растений семейства тыквенные. Для всех видов определены индивидуальные ISSR-спектры, различающиеся числом ампликонов, их размерами и степенью выраженности на электрофореграммах (рисунок 1).

В общей сложности был получен 61 аллель (амплифицируемый фрагмент). Число аллелей на маркер варьировало от 4 до 20, а диапазон длин полученных фрагментов равнялся 140–3000 п. н. Максимальное количество амплико-

нов было детектировано для праймера UBC808, а минимальное – для праймера I-15. В целом среди 5 рассмотренных ISSR-праймеров наиболее информативными оказались динуклеотидные праймеры I-4 и UBC808. Они инициировали в среднем по 5,5 и 6,7 фрагментов ДНК на образец соответственно. Пул получаемых аллелей при использовании этих маркеров был различен между всеми видами и практически не перекрывался по размеру амплифицируемых фрагментов (100 %-й уровень полиморфизма).

В отношении этих праймеров применены некоторые статистические подходы для анализа информационного полиморфизма (таблица 2). Маркерные системы различают по мере их информативности, что, в свою очередь, зависит от степени их полиморфизма [8]. Одним из основных параметров, определяющих меру информативности маркеров, является величина информационного полиморфизма. Число PIC для этих маркеров было сопоставимо и характеризовалось высокими значениями.

Рисунок 1

ISSR-спектр растений семейства *Cucurbitaceae*, полученный при использовании праймера UBC808:

1 – *C. lanatus*, 2 – *C. melo*, 3 – *C. maxima*, 4 – *C. pepo*, 5 – *C. moschata*, 6 – *C. ficifolia*, 7 – *L. siceraria*, 8 – *B. hispida*, 9 – *M. charantia*, 10 – *T. cucumerina*; М – маркер молекулярных масс

Таблица 2 Информативность ISSR-праймеров

Праймер	КАФ	КПФ	Полиморфизм, %	PIC	Rp
I-4	17	17	100	0,93	6,4
UBC808	20	20	100	0,95	8,0

Примечание: КАФ – количество амплифицированных фрагментов, КПФ – количество полиморфных фрагментов.

Важной особенностью маркерной системы является способность устанавливать различия между большим числом генотипов. Показатель R_p применяется для оценки дискриминационной способности молекулярных систем большинства видов растений. В результате нашего исследования оказалось, что оба праймера обладают высокой разрешающей способностью, но значение R_p для праймера UBC808 было выше, чем для праймера I-4. Аналогичным параметру R_p является индекс разнообразия Симпсона D [13]:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1), \quad (3)$$

где N – общая выборка, s – количество геномогрупп, x_j – количество таксонов, отнесенных к j -й геномогруппе.

Этот показатель в основном применяется для оценки дискриминирующей способности методов типирования микроорганизмов [5]. Приемлемыми считаются методы типирования,

имеющие значение индекса Симпсона D 0,9 и более. В случае генотипирования растений семейства *Cucurbitaceae* для праймеров I-4 и UBC808 величина D оказалась равной 0,87 и 0,91 соответственно, что подтверждает более высокую дискриминирующую способность праймера UBC808. Таким образом, индекс Симпсона можно использовать как еще один статистический параметр для оценки информативности ISSR-праймеров.

Коэффициенты генетического подобия Nei & Li, рассчитанные для 10 исследованных генотипов *Cucurbitaceae* на основе ISSR-локусов, были использованы для создания дистанционных матриц и далее для построения дендрограмм по методу UPGMA (рисунок 2).

На дендрограмме генетического сходства видно, что все исследуемые генотипы разделились на два больших кластера с относительно высокой степенью надежности порядка ветвления (индексы бутстрепа обоих кластеров соста-

вили 57 %). В первом кластере оказались группы I–III, а во втором – тыква фиголистная и трихозант змеевидный (IV группа). Группы II и III были представлены единственным таксоном. Тыква мускатная и арбуз шерстистый объединились в подгруппу внутри кластера с бут-

стреп-поддержкой в 60 %. В остальных группах она составила 11–42 %. По мнению Н.В. Маркина и соавторов [6], низкие значения бутстрепа в узлах кластеров и значительные генетические различия указывают на высокий молекулярно-генетический полиморфизм растений.

Рисунок 2

Дендрограмма генетического сходства растений семейства *Cucurbitaceae*, основанная на результатах ISSR-анализа. Шкала сверху – генетические дистанции по Nei & Li. На дендрограмме цифрами указаны значения бутстрепа (в %)

Выводы. В результате изучения генетического разнообразия тыквенных выявлены два динуклеотидных праймера (I-4 и UBC808), которые характеризуются высокой дискриминационной способностью. Показана возможность использования индекса Симпсона как еще од-

ного статистического параметра для оценки информативности ISSR-праймеров. В целом нами была показана высокая эффективность использования ISSR-маркеров для изучения межвидового полиморфизма у представителей *Cucurbitaceae*.

Библиографический список

1. Долгих, С.Г. Молекулярно-генетическая оценка клонов яблони сорта Апорт в привойно-подвойных комбинациях [Текст] / С.Г. Долгих, М.М. Исин, А.М. Сарбасова // Садоводство и виноградарство. 2013. № 5. С. 23–25.
2. Дорошенко, Т.Н. Биологические основы размножения плодовых растений [Текст]: учеб. пособие / Т.Н. Дорошенко, Л.Г. Рязанова. Краснодар: КубГАУ, 2015. 136 с.
3. Жуковский, П.М. Культурные растения и их сородичи [Текст] / П.М. Жуковский. Л.: Колос, 1971. 751 с.
4. Коровин, В.А. Совместимость привоя и подвоя яблони [Текст] / В.А. Коровин. М.: Колос, 1979. 127 с.
5. Кузнецова, М.В. Опыт использования REP- и RAPD-ПЦР для эпидемиологической характеристики нозокомиальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* [Текст] / М.В. Кузнецова, А.В. Максимова, Т.И. Карпунина // Кли-

- ническая лабораторная диагностика. 2015. № 3. С.44–50.
6. Маркин, Н.В. Полиморфизм геномной ДНК однолетних видов подсолнечника [Текст] / Н.В. Маркин, В.Е. Тихобаева, М.А. Тихонова, В.А. Гаврилова, Т.Т. Трифонова, А.В. Усатов // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2010. Вып. 2 (144–145). С. 3–7.
7. Молекулярная генетика [Текст]: учеб.-метод. пособие / Под ред. С.В. Боронниковой. Пермь: Перм. ун-т, 2007. 150 с.
8. Алиева, А.А. Оценка генетического разнообразия местных сортов и форм яблони Азербайджана с использованием ISSR-маркеров [Текст] / А.А. Алиева, Р.Т. Алиев, С.М. Бабаева, М.А. Аббасов, Г.С. Гурбанова, З.С. Сеферзаде // Аграрный научный журнал. 2017. Т. 10. С. 9–14.

9. Трусевич, Г.В. Подвой плодовых пород [Текст] / Г.В. Трусевич. М.: Колос, 1964. 495 с.

10. Федоров, А.В. Биологические и технологические основы применения прививки при выращивании тыквенных культур в сооружениях защищенного грунта [Текст] / А.В. Федоров, О.А. Ардашева. Ижевск: Шелест, 2017. 260 с.

11. Aran M., Fatahi R., Zamani Z. Molecular and morphological discrimination of selected plum seedlings for rootstock breeding. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2012. V. 20 (1). P. 5–19.

12. Behera T.K., Singh A.K., Staub J.E. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter melon (*Momordica charantia* L.) using RAPD

and ISSR markers for developing crop improvement strategies. *Scientia Horticulturae*. 2008. V. 115. P. 209–217.

13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of index of diversity typing systems: an application of Simpson's. *J. Clin. Microbiol.* 1988. V. 26 (11): 2465.

14. Payel D., Mala P., Sunita S. Inter-genus variation analysis in few members of *Cucurbitaceae* based on ISSR markers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2015. V. 29. № 5. P. 882–886.

15. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. V. 20. P. 176–183.

Сведения об авторах

1. **Худякова Анна Валерьевна**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела интродукции и акклиматизации растений, Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Ижевск, ул. Т. Барамзиной, 34, тел.: +7 (3412) 50-82-00, e-mail: khudyakova.ana@yandex.ru.

2. **Федоров Александр Владимирович**, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий отделом интродукции и акклиматизации растений, Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Ижевск, ул. Т. Барамзиной, 34, тел.: +7 (3412) 50-82-00, e-mail: udmgarden@mail.ru.

В статье представлены результаты молекулярно-генетического анализа 10 видов семейства *Cucurbitaceae*. С использованием 5 ISSR-праймеров был выявлен 61 маркер. На основании полученных данных и некоторых параметров (PIC, Rp), определяющих меру информа-

тивности маркера, только 2 праймера оказались эффективными для генотипирования тыквенных – I-4 и UBC808. Показана возможность использования индекса Симпсона как еще одного статистического параметра для оценки информативности ISSR-праймеров.

A. Khudyakova, A. Fedorov

SELECTION OF EFFECTIVE ISSR-PRIMERS FOR GENOTYPING OF CUCURBITACEAE PLANTS

Key words: *Cucurbitaceae*; *ISSR-primers*; *polymorphic information content*; *resolving power*; *dendrogram of genetic similarity*.

Authors' personal details

1. **Khudyakova Anna**, Candidate of biological sciences, Junior scientist researcher of the department of Introduction and Acclimatization of Plants, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, T. Baramzinoj St., 34, phone: +7 (3412) 50-82-00, e-mail: khudyakova.ana@yandex.ru.

2. **Fedorov Aleksandr**, Doctor of agricultural sciences, head of the department of Introduction and Acclimatization of Plants, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, T. Baramzinoj St., 34, phone: +7 (3412) 50-82-00, e-mail: udmgarden@mail.ru.

The paper presents the results of molecular genetic analysis of 10 species of the *Cucurbitaceae*. 61 markers were identified with using of 5 ISSR primers. Based on the obtained data and some parameters (PIC, Rp) determining the informative-

ness of the marker, only 2 primers proved to be effective for *Cucurbitaceae* genotyping – I-4 and UBC808. The possibility of using the Simpson's index as another statistical parameter for estimating the informativeness of ISSR primers is shown.

© Худякова А.В., Федоров А.В.