

УДК 577.21:631.52:633.12

АНАЛИЗ ГЕНОТИПОВ ГРЕЧИХИ, ПОЛУЧЕННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С ЦИНКОМ *in vitro*, С ПОМОЩЬЮ ISSR-МАРКЕРОВ

© 2024 г. С. А. Боровая¹, * А. Г. Клыков¹, Н. Г. Богинская¹

¹Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока
им. А.К. Чайки, Приморский край, пос. Тимирязевский, 692539 Россия

*e-mail: borovayasveta@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 14.11.2023 г.

Показана эффективность использования четырех ISSR-маркеров (M1, M2, M7 и M11) для исследования генетической изменчивости регенерантов *Fagopyrum esculentum*, полученных на селективных средах с высокими дозами $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ (808–1313 мг/л) *in vitro*. Обнаружен высокий уровень полиморфизма в объединенной выборке – 74.4%. Полученные образцы могут быть использованы в селекции для создания сортов с хозяйственно-ценными признаками.

Ключевые слова: гречиха посевная, селективные среды, цинк, ISSR-маркеры, полиморфизм, генетические дистанции, биометрические показатели.

DOI: 10.31857/S0016675824030126 EDN: DOBSZM

Гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum* Moench) – традиционная крупяная культура во многих странах мира. Она обладает высокой пластичностью и большим потенциалом генетического улучшения [1]. Применение современных биотехнологических методов значительно расширяет возможности селекции *F. esculentum*. Маркеры межмикросателлитной последовательности (ISSR) успешно используются для исследования генетического разнообразия растений вследствие высокой информативности и получения воспроизводимых результатов [2–7]. ISSR-анализ внутривидового генетического полиморфизма видов и сортов гречихи проведен ранее Г.Д. Кадыровой с соавт. [8] с помощью 13 ISSR-праймеров. В результате было отобрано четыре наиболее информативных – M1 ((AC)₈GC), M2 ((AC)₈CTG), M7 ((CAG)₅) и M11 ((CA)₆AG), приводящих к формированию воспроизводимых, четких полиморфных спектров, состоящих не менее чем из 20 фрагментов. С использованием маркеров M1, M2, M7 и M11 нами были изучены генетическая изменчивость и хозяйственно ценные признаки *F. esculentum*, что позволило повысить результативность отбора перспективных линий и показало эффективность применяемой маркерной системы [9].

В настоящей работе с использованием четырех ISSR-маркеров (M1, M2, M7 и M11) проведено исследование пробирочных образцов гречихи сорта Изумруд регенерантного происхождения, полученных *in vitro* на средах Мурасиге и Скуга (MC) с высокой концентрацией тяжелого металла цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$ в дозах 808, 909, 1010, 1111, 1212 и 1313 мг/л). Асептические черенки гречихи культивировали с токсикантом в течение 21 сут, а затем выжившие генотипы субкультивировали и микроклонально размножали на средах MC. Для исследования морфобиологических признаков полученных генотипов пробирочные растения высаживали на вегетационной площадке с почвенным субстратом и проводили исследование биометрических показателей и продуктивности.

В результате проведенных исследований было выявлено, что четыре ISSR-маркера продуцировали 61 полиморфных ампликона. Полиморфизм в объединенной выборке составил 74.4%. На базе бинарных матриц проведен подсчет индекса генетических дистанций Нея (D_N). Анализ полученных данных показал, что при сравнении с исходной формой (контролем *in vitro*) генотипы были распределены по двум группам. Первая группа (1) имела наименьшие D_N – 0.0796–0.1176.

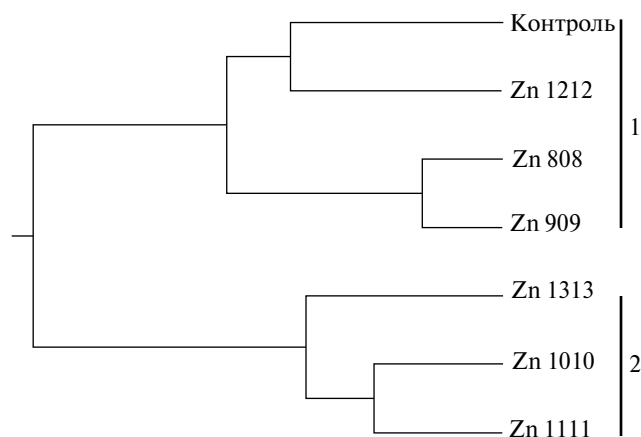


Рис. 1. UPGMA-дендрограмма, основанная на значениях генетических дистанций Нея для регенерантов гречихи. 1 – группа вариантов, характеризующаяся наименьшими D_N по сравнению с исходной формой; 2 – группа вариантов, характеризующаяся наибольшим D_N по сравнению с исходной формой.

В эту группу, помимо контрольных растений, вошли образцы, полученные на среде с более низкими концентрациями $ZnSO_4 \times 7H_2O$, равными 808 и 909 мг/л, и вариант Zn 1212. Наибольшие генетические различия с исходной формой продемонстрировали растения из второй группы (2), полученные с помощью соли цинка в концентрациях 1010, 1111 и 1313 мг/л, показавшие максимальные значения D_N , равные 0.1793–0.2348 и образовавшие на древе отдельный кластер на UPGMA-дендрограмме (рис. 1).

Результаты исследования биометрических показателей пробирочных растений-регенерантов гречихи, высаженных в почву на вегетационной площадке, представлены в табл. 1. Растения, подвергшиеся воздействию соли цинка в дозе 1010, 1111 и 1313 мг/л (вторая группа с наиболь-

шими D_N), характеризуются рядом преимуществ по сравнению с остальными образцами. Они превзошли контроль, а также группу растений вариантов Zn 808, Zn 909 и Zn 1212 по толщине первого междоузлия в 1.2–1.4 раза, варьируя в пределах 0.54–0.58 см. Число боковых ветвей второго порядка у второй группы больше, чем у первой, в среднем в 2.9 раза. Отмечено также наличие боковых ветвей третьего порядка у растений второй группы, в то время как у первой группы они отсутствуют. Соответственно, семенная продуктивность одного растения из второй группы составила 2.96–5.78 г, что в среднем на 38.1% выше, чем у первой.

По мнению ряда исследователей, ISSR-маркеры в высокой степени полиморфны у гречихи [8, 10, 11]. Полученные с их помощью паттерны ПЦР-продуктов видоспецифичны, а сам метод весьма успешен при идентификации генотипов.

Таким образом, используемая маркерная система, включающая ISSR-маркеры M1, M2, M7 и M11, пригодна для идентификации генетических различий и выявляет высокий уровень полиморфизма у регенерантов *F. esculentum*. Данные молекулярно-генетических исследований подтверждают, что применение селективных сред с высокими концентрациями ионов цинка приводит к появлению хозяйственно ценных признаков у исследуемых образцов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Таблица 1. Биометрические показатели регенерантов гречихи, полученных на селективных средах с цинком

Содержание цинка в МС, мг/л	Высота растения, см	Толщина первого междоузлия, см	Длина первого междоузлия, см	Число боковых ветвей			Семенная продуктивность одного растения, г
				1-го порядка	2-го порядка	3-го порядка	
Контроль <i>in vitro</i>	151.2 ± 15.0a	0.46 ± 0.06a	2.0 ± 0.5b	3.3 ± 1.5a	0a	0a	3.09a
Zn 808	159.8 ± 3.8a	0.42 ± 0.02a	2.9 ± 0.5a	2.3 ± 0.6b	1.0 ± 1.0b	0a	2.97a
Zn 909	140.9 ± 7.2b	0.42 ± 0.02a	2.4 ± 0.4ab	4.3 ± 0.6ac	1.0 ± 1.0b	0a	2.53a
Zn 1010	127.8 ± 8.7c	0.56 ± 0.06b	2.7 ± 0.3a	2.3 ± 0.6b	2.0 ± 1.0c	1.0 ± 1.0b	2.96a
Zn 1111	142.3 ± 48.5b	0.58 ± 0.04b	2.7 ± 0.6a	2.3 ± 0.6b	2.0 ± 1.7c	0.3 ± 0.6b	4.88b
Zn 1212	133.5 ± 2.1c	0.41 ± 0.01a	3.1 ± 0.2a	4.7 ± 0.6c	1.0 ± 1.0b	0a	2.65a
Zn 1313	136.2 ± 8.2c	0.54 ± 0.06b	1.8 ± 0.3b	4.7 ± 2.5c	3.0 ± 1.0cd	1.0 ± 0.0b	5.78d

Примечание. Разные строчные буквы в одном и том же столбце указывают на существенные различия между вариантами при $p < 0.05$.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chrungoo N.K., Dohtdong L., Chetry U.* Phenotypic plasticity in buckwheat // *Mol. Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. London: Elsevier, Academic Press, 2016. P. 137–149.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803692-1.00010-9>
2. *Blair M., Panaud O., McCouch S.* Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) // *Theor. Appl. Genetics*. 1999. V. 98. P. 780–792.
<https://doi.org/10.1007/s001220051135>
3. *Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S.* Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections // *Theor. Appl. Genetics*. 1999. V. 98. № 6–7. P. 1125–1131.
<https://doi.org/10.1007/s001220051176>
4. *Sica M., Gamba G., Montieri S., Gaudio L., Aceto S.* ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* // *BMC Genetics*. 2005. V. 6. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-17>
5. *Meloni M., Perini D., Filigheddu R., Binelli G.* Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers // *Ann. Bot.* 2006. V. 97. № 2. P. 299–304.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcj024>
6. *Alhasnawi A.N., Kadhimi A.A., Isahak A. et al.* Application of inter simple sequence repeat (ISSR) for detecting genetic analysis in rice (*Oryza sativa* L.) // *J. Pure Appl. Microbiology*. 2015. V. 9. № 2. P. 1091–11016.
7. *Aldaej M.I., Rezk A.A., El-Malky M., Shalaby T.A.* Comparative genetic diversity assessment and Marker-Trait Association using two DNA marker systems in rice (*Oryza sativa* L.) // *Agronomy*. 2023. V. 13. № 2.
<https://doi.org/10.3390/agronomy13020329>
8. *Кадырова Г.Д., Кадырова Ф.З., Мартиросян Е.В., Рыжова Н.Н.* Анализ геномного разнообразия образцов и сортов гречихи посевной и татарской ISSR-методом // *С.-хоз. биология*. 2010. Т. 5. С. 42–48.
9. *Клыков А.Г., Барсукова Е.Н.* Биотехнология и селекция гречихи на Дальнем Востоке России. Владивосток: ООО “ПСП95”, 2021. 352 с.
10. *Sabreena N. M., Mahajan R., Hashim M.J. et al.* Deciphering allelic variability and population structure in buckwheat: An analogy between the efficiency of ISSR and SSR markers // *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. V. 28. P. 6050–6056.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.061>
11. *Shukla A., Srivastava N., Suneja P. et al.* Genetic diversity analysis in Buckwheat germplasm for nutritional traits // *Indian J. Experim. Biology*. 2018. V. 56. № 11. P. 827–837.

ANALYZING BUCKWHEAT GENOTYPES OBTAINED ON SELECTIVE MEDIA WITH ZINC *in vitro* USING ISSR MARKERS

S. A. Borovaya^{1, *}, A. G. Klykov¹, N. G. Boginskaya¹

¹*Chaika Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East
Primorsky Krai, Timiriasevsky, 692539 Russia*

*e-mail: borovayasveta@mail.ru

The paper evaluates four ISSR-markers (M1, M2, M7, and M11) for their effectiveness in research on the genetic distances of regenerated *Fagopyrum esculentum* plants, which were obtained *in vitro* on selective media with high doses of ZnSO₄ × 7 H₂O (808–1313 mg/L). The level of polymorphism was determined to be high in the combined sample (74.4%). The obtained specimens might be used in the breeding of new varieties with economically important traits.

Keywords: common buckwheat, selective media, zinc, ISSR-markers, polymorphism, genetic distances, biometric parameters.