

УДК 577.21:631.526.32:635.657

## **КЛАСИФІКАЦІЯ КОЛЕКЦІЇ СОРТІВ НУТУ З РІЗНИХ КРАЇН ЗА ISSR-МАРКЕРАМИ**

© 2013 р. Г. Є. Акініна<sup>1</sup>, В. М. Попов<sup>1</sup>, Г. П. Зайцева<sup>1</sup>,  
Ю. М. Дугарь<sup>2</sup>, В. Д. Єремєєва<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва  
Національної академії аграрних наук України  
(Харків, Україна)*

<sup>2</sup>*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
(Харків, Україна)*

Вивчено поліморфізм 118 сортів нуту з різних країн за шістьма ISSR-маркерами. Ідентифіковано 97 локусів, 92 з яких є поліморфними у досліджених сортів нуту. Сорти нуту з США, Італії, Угорщини, Чехії характеризуються найбільшою кількістю ампліфікованих фрагментів. Максимальний відсоток поліморфних локусів виявлений в сортозразках з Узбекистану та Канади. За допомогою програми Structure 2.3.4 сорти нуту класифіковані у два чітких кластери. В одному кластері групувались сорти з України та Росії, Молдови, у другому – сорти з Іспанії, Італії, Угорщини, Чехії, Індії, Ірану, Узбекистану, Канади і США. Обговорюються особливості групування сортів нуту. Показана можливість ефективного використання ISSR – маркерів для кластеризації генетичних колекцій нуту та паспортизації окремих зразків.

**Ключові слова:** *Cicer arietinum L.*, ISSR-маркери, поліморфізм, кластерний аналіз

Нут культурний (*Cicer arietinum L.*) є однією зі стратегічних бобових культур у світі. Він характеризується цінним біохімічним складом насіння та високою, порівняно з іншими бобовими, стійкістю до абіотичних та біотичних стресорів (Jukanti1 et al., 2012). Разом з тим нут досі залишається в переліку маловивчених культур (Rajeev et al., 2009; Varshney et al., 2010). Тому у світі реалізуються міжнародні наукові проекти з молекулярної генетики та маркерної селекції нуту (Varshney et al., 2010).

Використання молекулярних маркерів для диференціації зразків нуту лімітоване незначним поліморфізмом сортів цієї культури (Varshney et al., 2013; Sharma et al., 2013). Це пов'язується з походженням нуту від одного дикого виду, самозапиленням та малоактивним залученням до селекції зразків генетичних колекцій (Upadhyaya et al., 2011). Так, низький рі-

вень різноманіття у сортів нуту виявлений за багатьма типами молекулярних маркерів (Singh et al., 2008). Разом з тим, встановлено, що ефективними диференціаторами сортів нуту можуть бути мікросателітні (SSR) (Sethy et al., 2006; Singh et al., 2008; Upadhyaya et al., 2008), між-мікросателітні (ISSR) маркери (Iruela et al., 2002; Bhagyawant et al., 2008; Choudhary et al., 2013) і функціональні мінісателітні (DAMD), старт-кодони (SCoT) маркери (Pakseresht et al., 2013), однонуклеотидні заміни (SNP) (Upadhyaya et al., 2011). ISSR-маркери є дешевими, добре відтворюваними та універсальними маркерними системами, що можуть використовуватися для оцінки різноманіття різних видів рослин (Choudhary et al., 2013). Останнє робить їх дуже привабливим інструментом для диференціації генетичних колекцій та паспортизації сортозразків. Показане ефективне використання ISSR для вивчення поліморфізму та дивергенції генетичної колекції нуту (Iruela et al., 2002; Choudhary et al., 2013). ISSR використовували для створення генетичних карт *Cicer arietinum* (Winter et al., 2000). Ratnaparkhe et al.

---

*Адреса для кореспонденції:* Акініна Галина Євгенівна,  
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,  
Московський проспект, 142, Харків, 6112, Україна;  
e-mail: gakinina@gmail.com

## КЛАСИФІКАЦІЯ КОЛЕКЦІЇ СОРТІВ НУТУ

**Таблиця 1. Праймери, що використовувалися для класифікації сортів нуту**

Найменування праймера	Послідовність праймера	Температура відпалу (T <sub>a</sub> ), °C
ISSR 810	(GA)8T	54
ISSR 812	(GA)8A	54
ISSR 825	(AC)8T	54
ISSR 834	(AG)8YT	54
ISSR 842	(AG)8YG	57
ISSR 857	(AC)8YG	55

**Таблиця 2. Різноманіття ISSR-маркерів в сортах нуту**

Праймер	Загальна кількість фрагментів, шт	Відсоток поліморфних фрагментів, %	Розмір фрагментів, пн
ISSR 810	10	100	1398-285
ISSR 812	8	75	701-259
ISSR 825	14	100	964-262
ISSR 834	17	82	1785-347
ISSR 842	22	100	849-145
ISSR 857	26	100	1300-137
Всього	97	95	1785-137

(1998) повідомляли про можливість використання ISSR для пошуку маркерів стійкості до хвороб у нуту (Ratnaparkhe et al., 1998).

Проте зразки нуту української генетичної колекції за ISSR маркерами досі не вивчалися. Метою роботи була оцінка поліморфізму та класифікація сортів нуту різних країн з Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ, м. Харків) за ISSR-маркерами.

### МЕТОДИКА

Об'єктами дослідження були сорти нуту з Європи (Україна, Росія, Молдова, Іспанія, Італія, Угорщина, Чехія), Азії (Індія, Іран, Узбекистан) та Америки (США, Канада), отримані в НЦГРРУ (м. Харків). Всього 118 зразків. Репрезентативні вибірки сортів нуту з кожної країни склали 9-12 зразків. Сорти нуту з Італії, Угорщини, Чехії через їх малочисельність, в колекції були об'єднані в групу сортів з інших європейських країн (ІЄК).

Оцінку поліморфізму та класифікацію сортів нуту здійснювали за допомогою шести ISSR-маркерів (табл. 1) ([http://download.bion.com.cn/upload/month\\_0812/20081213\\_3e0a387c764331d0978dRРKoJqSzhDvl.attach.pdf](http://download.bion.com.cn/upload/month_0812/20081213_3e0a387c764331d0978dRРKoJqSzhDvl.attach.pdf)). Використовували динуклеотидні праймери, які, за літературними даними, виявляли найбільший поліморфізм у сортів нуту (Choudhary et al., 2013).

Методика виділення ДНК та проведення ПЛР описана в попередніх роботах (Акинина, 2011; Акинина, Попов, 2012). Ампліфікацію ISSR локусів здійснювали за наступною програмою: початкова денатурація – 4 хв при 94°C, наступні 40 циклів з такими параметрами: денатурація – 30 с при 94°C, гібридизація праймера – 45 с при 52°C, елонгація – 45 с при 72°C, кінцева елонгація – 45 с при 72 °C. Розділення продуктів ампліфікації проводили в 1,5% агарозному гелі з бромистим етидієм та буфері з низькою іонною силою (Brody et al., 2004) при 100 В протягом 3,5 годин. Отримані гелі документували шляхом фотографування. Розмір продуктів ампліфікації визначали за допомогою демо-версії програми Totallab 120 (<http://www.totallab.com>).

Кластеризацію сортів нуту проводили за допомогою кількісного кластерного аналізу в програмі Structure 2.3.4 ([http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/html/structure.html](http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html)). Достовірну кількість кластерів визначали за допомогою математичного алгоритму, запропонованого Evanno et al. (2005).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У результаті ампліфікації міжмікросателітних ділянок геному у досліджених сортів нуту за допомогою шести ISSR праймерів було ідентифіковано 97 фрагментів ДНК, 92 з яких були поліморфними. Кількість продуктів ампліфікації

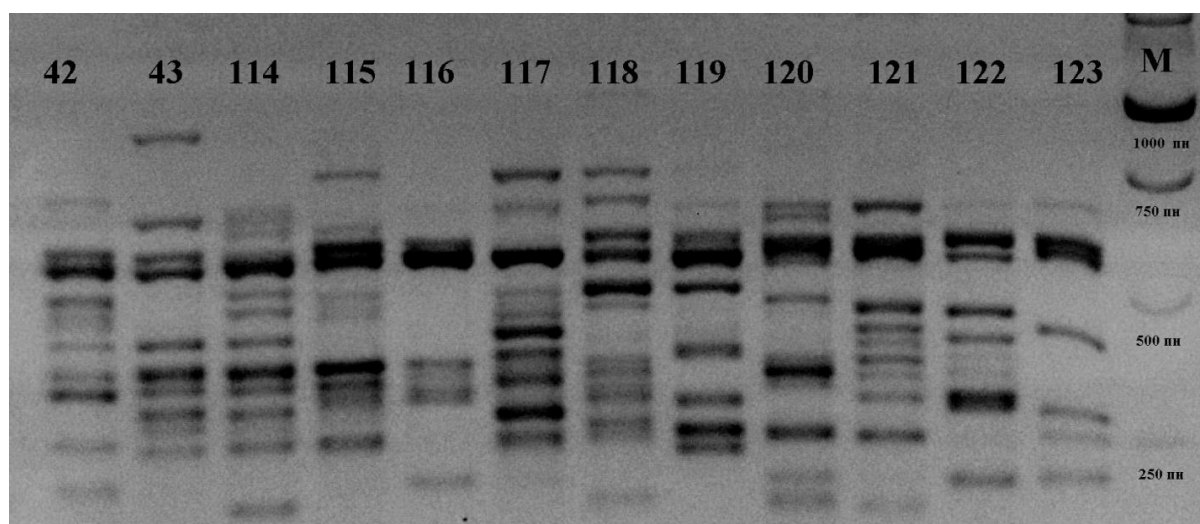


Рис 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням праймера ISSR 842 в сортах нуту з США.

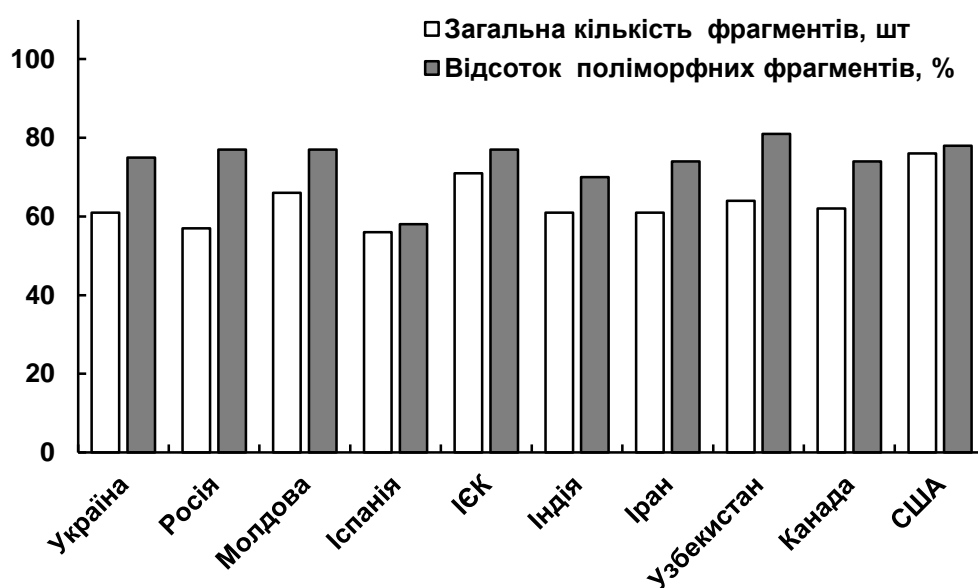


Рис. 2. Загальна кількість фрагментів та відсоток поліморфних фрагментів в сортах нуту, отриманих з використанням ISSR-маркерів.

ліфікації варіювала від 8 до 26 фрагментів, в середньому 16,2 на один локус. Максимальна кількість фрагментів ампліфікувалася з використанням праймерів ISSR 842 та ISSR 857 – відповідно 22 та 26 продуктів; мінімальна – з використанням праймера ISSR 812 – 8 продуктів (табл. 2). Всі локуси, виявлені за допомогою праймерів ISSR 810, 825, 842, 857, були поліморфними у досліджених сортів нуту. Цей показник склав 100%.

Рівень поліморфізму для локусів, які виявлено з використанням праймерів ISSR 834 та ISSR 812, склав 82 та 75 % відповідно.

Розміри виявлених продуктів ампліфікації варіювали від 1785 до 137 п.н. (табл. 2). Подібний діапазон розмірів продуктів ампліфікації з використанням цих же ISSR маркерів визначений іншими авторами у сортів нуту (Iguela M. et al., 2002) та інших культурних рослин (Твердохліб та ін., 2011; Дугарь, 2012).

Електрофоретичні спектри, отримані з праймерами ISSR 810, 834 та 812, були подібними між собою за основним набором мажорних продуктів ампліфікації і відрізнялися лише за незначною кількістю мінорних фрагментів.

### КЛАСИФІКАЦІЯ КОЛЕКЦІЇ СОРТІВ НУТУ

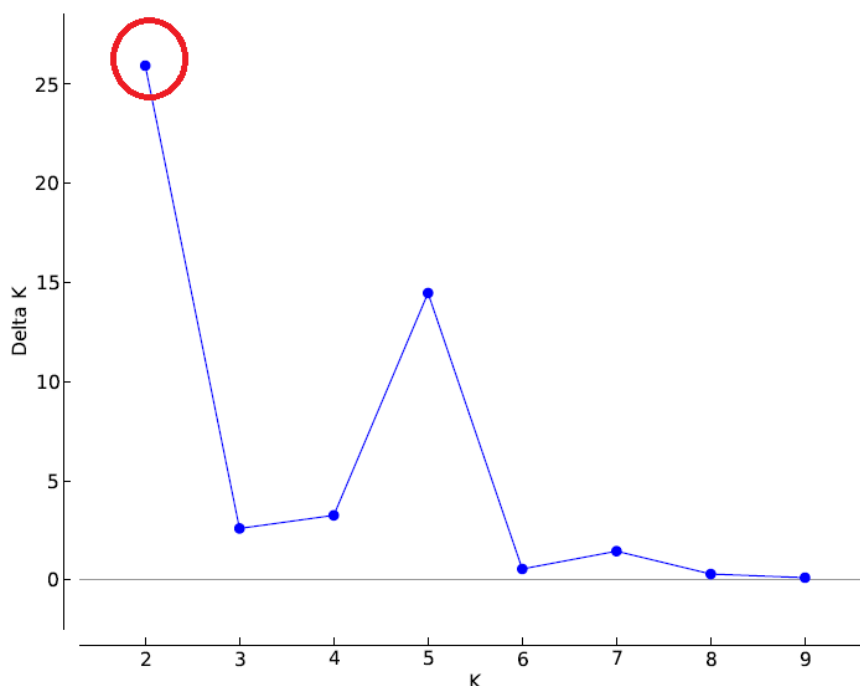


Рис. 3. Розрахунок кількості достовірних кластерів за алгоритмом, запропонованим Evanno et al. (2005).

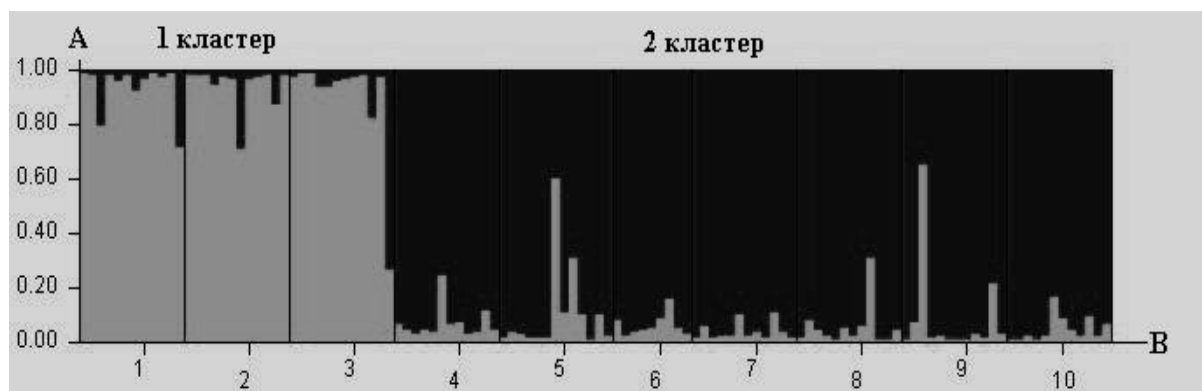


Рис. 4. Результати кластеризації сортів пшениці з різних країн за поліморфізмом ISSR маркерів в програмі Structure.

**А** – кількісна оцінка відповідності зразків певному кластеру. **В** – зразки (сорта пшениці): 1 – Україна, 2 – Росія, 3 – Молдова, 4 – Іспанія, 5 – Італія, Угорщина, Чехія (разом), 6 – Індія, 7 – Іран, 8 – Узбекистан, 9 – Канада, 10 – США.

Саме ці мінорні фрагменти і були диференціюючими у сортів пшениці за цими ISSR-маркерами.

Разом з тим, електрофореграми, отримані з використанням праймерів ISSR 825, 842, 857, відрізнялися значною кількістю поліморфних мажорних продуктів ампліфікації (рис. 1). Отже, їх можна використовувати для паспортизації окремих сортозразків пшениці.

Найбільша кількість фрагментів ампліфікувалась у сортів пшениці з США та ІЄК, наймен-

ша – у сортів з Іспанії та Молдови (рис. 2). Разом з тим, відсоток поліморфних фрагментів переважав у сортів пшениці з Узбекистану та ІЄК.

Значною кількістю поліморфних локусів відрізнялись також сорти пшениці з України, Росії, Молдови.

Для систематизації колекції сортів пшениці за ISSR-маркерами проводили кількісний кластерний аналіз в програмі Structure 2.3.4. Для

дослідженої вибірки сортів нуту достовірна кількість кластерів склала два (рис. 3).

До першого кластеру увійшли сорти нуту з України, Росії, Молдови, до другого – сорти з Іспанії, ІЄК, Індії, Ірану, Узбекистану, Канади, США (рис. 4).

Подібні закономірності групування азіатських та американських сортів, а також українських і російських сортів відзначалися при кластеризації сортів нуту за поліморфізмом мікросателітних локусів (Акініна, Попов, 2011). Сорти з Молдови та Іспанії за різноманіттям мікросателітних локусів об'єднувалися в окремий кластер, а сорти з ІЄК групувалися разом із зразками з України та Росії.

Кількісна відповідність сортів нуту з Росії, України, Молдови першому кластеру, оцінена в програмі Structure 2.3.4., склала 92,8 %. Всі представники другого кластеру за поліморфізмом ISSR локусів на 93,1 % відповідали ознакам цієї групи сортів. В обох кластерах виявлені окремі зразки, що тяжіли до представників іншого кластеру (рис. 4). Серед сортів з відомим походженням в першому кластері ідентифіковано два сорти – Наум та Краснокутський 123, що тяжіли до другого кластеру. Наум є місцевим сортом, а Краснокутський 123, отриманий гібридизацією сорту Совхозный 14 із зразком № 1417 ВІР (Акініна і др., 2011). Можна припустити, що під час створення цих сортів був залучений зарубіжний генетичний матеріал.

Таким чином, в результаті досліджень оцінений поліморфізм та здійснена класифікація 118 сортів нуту за шістьма ISSR-маркерами. Показано, що ISSR-маркери є ефективним інструментом для систематизації генетичних колекцій та паспортизації окремих сортів. Основні закономірності групування сортів нуту за ISSR-маркерами подібні до результатів групування цих же сортозразків за різноманіттям мікросателітних локусів.

## ЛІТЕРАТУРА

Акініна Г.Е. Изучение изменчивости микросателитных локусов сортов нута из разных стран методами молекулярного дисперсионного (АМОВА) и Q-факторного анализом // Вестник Харьков. нац. ун-та им. В.Н. Каразина – 2011. – Вып. 13 (947). – С. 63-69.

Акініна Г.Е., Попов В.Н. Дивергенция сортов нута селекции разных стран мира по морфологическим признакам и молекулярным маркерам // Фактори експериментальної еволюції організмів:

зб. наук. праць – К.: Логос, 2011. – Т. 10. – С. 168-172.

Акініна Г.Е., Безуглая О.Н., Попов В.Н. Классификация сортов нута по морфологическим и молекулярным маркерам // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2011. – Вип. 1 (22). – С. 61-75.

Акініна Г.Е., Попов В.Н. Полиморфизм микросателитных локусов в сортах нута европейского происхождения // Цитология и генетика. – 2012. – Т. 46, №1. – С. 27-36.

Дугарь Ю.Н. ISSR-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2012. – Вип. 2 (26). – С. 98-103.

Твердохліб О.В., Козуб Н.А., Созинов І.А., Богуславський Р.Л. Особливості успадкування генетичного матеріалу *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. та *T. miguschovae* Zhiron в лініях від схрещування з м'якою пшеницею. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 267-275.

Bhagyaawant S.S., Srivastava N. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships. // Afr. J. Biotechnol. – 2008. – V. 7. – P. 4428-4431.

Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E., Creavalle T.D., Kern S.E. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // Biotechniques. – 2004. – V. 37, № 4. – P. 598-602.

Choudhary P., Khanna S. M., Jain P. K., Bharadwaj C., Kumar J., Lakhera P.C., Srinivasan R. Molecular characterization of primary gene pool of chickpea based on ISSR markers // Biochem. Genet. – 2013. – V. 51. – P. 306-322.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // Mol. Ecol. – 2005. – V. 14, №8. – P. 2611-2620.

Iruela M., Rubio J., Cubero J.I., Gil J., Millan T. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers // Theor. Appl. Genet. – 2002. – V. 104. – P. 643-651.

Jukanti A.K., Gaur P.M., Gowda C.L.L., Chibbar R.N. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review // British. J. Nutrition. – 2012. – V. 108. – P. 11-26.

Pakseresht F., Talebi R., Karami E. Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran // Physiol. Mol. Biol. Plants. Published online 27 June 2013/ doi: 10.1007/s12298-013-0181-7.

## КЛАСИФІКАЦІЯ КОЛЕКЦІЇ СОРТІВ НУТУ

- Rajeev K.V., Close T. J., Singh N. K., Hoisingtonand D.A., Cook D. R. Orphan legume crops enter the genomics era! // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2009. – V. 12. – P. 202-210.
- Ratnaparkhe, M.B., Tekeoglu M., Muehlbauer F.J. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters// *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – V. 97. – P. 515-519.
- Sethy N., Edwards B., Bhatia S. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – V. 112. – P.1416-1428.
- Sharma S., Upadhyaya H.D., Varshney R.K., Gowda C.L. Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes // *Front Plant Sci.* – 2013. – V. 4. – Article 309 / doi: 10.3389/fpls.2013.00309.
- Singh R., Sharma P., Varshney R.K., Sharma S.K., Singh N.K. Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. // *Biotechnol. Genet Eng.* – 2008. – V. 25. – P. 267-313.
- Upadhyaya H., Dwivedi S., Baum M., Varshney R., Udupa S., Varshney R.K., Udupa S.M., Gowda C.L.L., Hoisington D., Singh S. Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *BMC Plant Biology.* – 2008. – V.8:106. doi:10.1186/1471-2229-8-106.
- Varshney R.K., Song C., Saxena R.K., Azam S., Yu S., Sharpe A.G., Cannon S., Baek J., Rosen B.D., Tar'an B., Millan T., Zhang X., Ramsay L.D., Iwata A., Wang Y., Nelson W., Farmer A.D., Gaur P.M., Soderlund C., Penmetsa R.V., Xu C., Bharti A.K., He W., Winter P., Zhao S., Hane J.K., Carrasquilla-Garcia N., Condie J.A., Upadhyaya H.D., Luo M.C., Thudi M., Gowda C.L., Singh N.P., Lichtenzweig J., Gali K.K., Rubio J., Nadarajan N., Dolezel J., Bansal K.C., Xu X., Edwards D., Zhang G., Kahl G., Gil J., Singh K.B., Datta S.K., Jackson S.A., Wang J., Cook D.R. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – V. 31. – P. 240–246.
- Varshney R. K., Glaszmann J.C., Leung H., Ribaut J. M. More genomic resources for less-studied crops // *Trends Biotechnol.* – 2010. – V. 28, № 9. – P. 452-460.
- Winter P., Benko-Iseppon A.-M., Hüttl B., Ratnaparkhe M., Tullu A., Sonnante G., Pfaff T., Tekeoglu M., Santra D., Sant V.J., Rajesh P.N., Kahl G., Muehlbauer F.J. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum*×*C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5 // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 101. – P. 1155-1163.

Надійшла до редакції  
20.09.2013 р.

## CLASSIFICATION OF COLLECTION OF VARIETIES OF CHICKPEA FROM DIFFERENT COUNTRIES BASED ON ISSR-MARKERS

G. Ye. Akinina<sup>1</sup>, V. M. Popov<sup>1</sup>, G. P. Zaytseva<sup>1</sup>, J. M. Dugar<sup>2</sup>, V. D. Eremeeva<sup>2</sup>

*V. Ya. Yuryev Plant Production Institute  
of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
(Kharkiv, Ukraine)*

*V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)*

Polymorphism of 118 of chickpea varieties from different countries on 6 ISSR-markers is studied. 97 loci are identified, 92 from which are polymorphic in the investigational varieties of chickpea. The chickpea varieties from the USA and also from Italy, Hungary, Czech Republic are characterized most of the amplified fragments. The maximal percent of polymorphic loci in samples from Uzbekistan and Canada is detected. By the program Structure 2.3.4 varieties of chickpea classify in two clear clusters. In one cluster are group varieties from Ukraine and Russia, Moldova, in other – are varieties from Spain, Italy, Hungary, Czech Republic, India, Iran, Uzbekistan, Canada and USA. The peculiarities of grouping of varieties of chickpea are discussed. Possibility of the effective use of ISSR– markers for clusterization of genetic collections of chickpea and passportization of single samples is shown.

**Key words:** *Cicer arietinum* L., ISSR-markers, polymorphism, cluster analysis

**КЛАССИФИКАЦИЯ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ НУТА  
ИЗ РАЗНЫХ СТРАН ПО ISSR-МАРКЕРАМ**

Г. Е. Акнинна<sup>1</sup>, В. Н. Попов<sup>1</sup>, Г. П. Зайцева<sup>1</sup>, Ю. Н. Дугарь<sup>2</sup>, В. Д. Еремеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева  
(Харьков, Украина)*

<sup>2</sup>*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
(Харьков, Украина)*

Изучен полиморфизм 118 сортов нута из разных стран по шести ISSR-маркерам. Идентифицировано 97 локусов, 92 из которых являются полиморфными у исследованных сортов нута. Сорта нута из США, Италии, Венгрии, Чехии характеризуются наибольшим количеством амплифицированных фрагментов. Максимальный процент полиморфных локусов обнаружен в сортообразцах из Узбекистана и Канады. С помощью программы Structure 2.3.4 сорта нута классифицированы в два четких кластера. В одном кластере группируются сорта из Украины и России, Молдовы, в другом – сорта из Испании, Италии, Венгрии, Чехии, Индии, Ирана, Узбекистана, Канады и США. Обсуждаются особенности группирования сортов нута. Показана возможность эффективного использования ISSR-маркеров для кластеризации генетических коллекций нута и паспортизации отдельных образцов.

**Ключевые слова:** *Cicer arietinum L.*, ISSR-маркеры, полиморфизм, кластерный анализ