

Генетический анализ разнообразия линий нута методом случайной амплификации полиморфной днк (RAPD)

¹ Иранская научно-исследовательская организация науки и технологий, г. Тегеран, Иран

² Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), г. Москва, Российская Федерация

³ Исламский университет Азад, г. Дамган, Иран

⁴ Дамганский филиал, Исламский университет Азад, г. Дамган, Иран

М. Масумиан¹, М. Гаравири², З. Годжаванд³, М. Ахангаран²,
Н. Г. Машенцева², Д. М. Синаки⁴

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Машенцева Наталья Геннадьевна
E-mail: natali-mng@yandex.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Масумиан, М., Гаравири, М., Годжаванд, З., Ахангаран, М., Ахангаран, М., Машенцева, Н.Г., & Синаки, Д. (2024). Генетический анализ разнообразия линий нута методом случайной амплификации полиморфной днк (RAPD). *Хранение и переработка сельхозсырья*, 32(1), 95-107.
<https://doi.org/10.36107/spfp.2024.1.458>

ПОСТУПИЛА: 13.09.2023

ПРИНЯТА: 15.03.2024

ОПУБЛИКОВАНА: 30.03.2024

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.



АННОТАЦИЯ

Введение: Для селекции новых сортов нута используют разнообразные генетические ресурсы растений. Например, с помощью RAPD-праймеров и ПЦР-реакции можно амплифицировать случайно повторяющиеся последовательности на геномной ДНК нута для оценки его генетического разнообразия. Настоящее исследование направлено на изучение генетического разнообразия новых сортов нута линии FLIP.

Цель: анализ генетического разнообразия новых линий нута типа кабули селекции FLIP, полученных в Международном центре сельскохозяйственных исследований засушливых регионов (ICARDA, ИКАРДА), с помощью RAPD-маркеров и выбора линий с широкой генетической вариацией для дальнейшей селекции уникальных и перспективных генотипов.

Материалы и методы: молекулярные RAPD-маркеры, полученные в результате ПЦР-амплификации случайных участков геномной ДНК с одним праймером произвольной нуклеотидной последовательности, были использованы для изучения генетического разнообразия 18 линий нута кабули, произрастающего на территории Ирана. Выделение ДНК из сортов нута осуществляли методом Деллапорта, амплификацию участков генома проводили с использованием 8 праймеров. После электрофореза агарозный гель окрашивали бромистым этидием и анализировали амплифицированные фрагменты генома.

Результаты: Линии нута были ранжированы на основе присутствия и отсутствия фрагментов ДНК, полученных с помощью RAPD-маркеров. Результаты показывают, что наибольшее количество ПЦР-продуктов нарабатывается с праймера UB763 (90 фрагментов ДНК), а наименьшее количество фрагментов ДНК ПЦР-продуктов нарабатывается с праймера T9 (10 фрагментов ДНК). При использовании праймера T9 у большинства линий амплифицируется продукт размером 700 п.н. При анализе полученных данных процент полиморфизма составил 75 %, а коэффициент подобия Жаккара — 96 %.

Выводы: Исследование подтвердило, что RAPD-маркеры являются эффективными методами обнаружения генетической изменчивости нута. Установлено, что линии FLIP03-26C/3/98TH70/4/(FLIP93-210C/ FLIP87-8C)/S96086 и FLIP06-93C/4/2002TH 119/5/[(FLIP98-64C/FLIP98-47C)/Sel99ter85488] /3/ FLIP98-022C имеют наибольшую генетическую удаленность друг от друга, и их можно использовать в качестве родительских линий для получения новых сортов нута с высоким генетическим разнообразием. Полученные результаты могут быть применены для разработки эффективных планов долгосрочного управления генетическими ресурсами урожая нута.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

нут, генетическое разнообразие, агрономические признаки, молекулярный RAPD-маркер

Investigation of genetic diversity of some chickpea lines using molecular marker (RAPD)

¹ Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

² Russian Biotechnological University, Moscow, Russian Federation

³ Islamic Azad University, Damghan, Iran

⁴ Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Majid Masomian¹, Mahmood Gharaviri², Zahra Ghojavand³, Mahboobeh Ahangaran², Natalya G. Mashentseva², Jafar M. Sinaki⁴

CORRESPONDENCE:

Mashentseva Natalya Gennadievna
E-mail: natali-mng@yandex.ru

DATA AVAILABILITY:

Data from the current study are available upon request from the corresponding author.

FOR CITATIONS:

Masomian, M., Gharaviri, M., Ghojavand, Z., Ahangaran, M., Mashentseva, N., & Sinaki, J. (2024). Investigation of genetic diversity of some chickpea lines using molecular marker (RAPD). *Storage and Processing of Farm Products*, 32(1), 95-107. <https://doi.org/10.36107/spfp.2024.1.458>

RECEIVED: 13.09.2023

ACCEPTED: 15.03.2024

PUBLISHED: 30.03.2024

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Introduction: A variety of plant genetic resources are used to select new chickpea varieties. For example, using RAPD primers and PCR reactions, randomly repeated sequences on chickpea genomic DNA can be amplified to assess its genetic diversity. The present study is aimed at studying the genetic diversity of new chickpea varieties of the FLIP line.

Purpose: analysis of the genetic diversity of new lines of chickpea of the Kabuli type of FLIP selection, obtained at the International Center for Agricultural Research of the Arid Regions (ICARDA), using RAPD markers and selection of lines with wide genetic variation for further selection of unique and promising genotypes.

Materials and Methods: molecular RAPD markers, obtained as a result of PCR amplification of random sections of genomic DNA with a single primer of an arbitrary nucleotide sequence, were used to study the genetic diversity of 18 lines of Kabuli chickpea growing in Iran. DNA extraction from chickpea varieties was carried out using the Dellaporta method; amplification of genome regions was carried out using 8 primers. After electrophoresis, the agarose gel was stained with ethidium bromide and the amplified genome fragments were analyzed.

Results: Chickpea lines were ranked based on the presence and absence of DNA fragments obtained using RAPD markers. The results show that the largest number of PCR products is generated from the UB763 primer (90 DNA fragments), and the smallest number of DNA PCR product fragments is generated from the T9 primer (10 DNA fragments). When using the T9 primer, a 700 bp product is amplified in most lines. When analyzing the data obtained, the percentage of polymorphism was 75 %, and the Jaccard similarity coefficient was 96 %.

Conclusion: The study confirmed that RAPD markers are effective methods for detecting genetic variation in chickpea. It was established that lines FLIP03-26C/3/98TH70/4/ (FLIP93-210C/ FLIP87-8C)//S96086 and FLIP06-93C/4/2002TH 119/5/[(FLIP98-64C/ FLIP98-47C)]/ Sel99ter85488] /3/ FLIP98-022C have the greatest genetic distance from each other, and they can be used as parent lines to develop new chickpea varieties with high genetic diversity. The findings can be applied to develop effective long-term genetic resource management plans for the chickpea crop.

KEYWORDS

chickpea; genetic diversity; agronomic traits; molecular RAPD marker

ВВЕДЕНИЕ

Зернобобовые — это популярные во всем мире сельскохозяйственные культуры, принадлежащие семейству *Fabaceae*, которые употребляются в пищу на протяжении многих столетий, являются одними из наиболее широко потребляемых продуктов в мире и ценятся за их питательные и полезные свойства. Они являются важными источниками белков, углеводов и пищевых волокон (López-Martínez et al., 2017). Среди бобовых культур нут (*Cicer arietinum* L.), также называемый фасолью Гарбанзо, используется в качестве пищевого продукта, особенно популярного на Ближнем Востоке как основа для приготовления традиционных блюд (Gupta et al., 2017). Это однолетняя культура, которая хорошо адаптируется к умеренному и сухому климату и обладает высокой жароустойчивостью, если почва достаточно влажная, но в целом предпочитает регионы с умеренным климатом.

Нут в основном выращивают в Европе, Азии и Австралии, а также в качестве озимой культуры в Северной Америке. Индия является основным его производителем, а на Юго-Восточную Азию приходится 80 % мирового производства (Juárez-Chairez et al., 2022). К преимуществам нута относят высокое содержание белка, богатого биологически активными пептидами, а также содержание различных метаболитов с фармакологической активностью. Некоторые биологически активные вещества, идентифицированные в различных соединениях нута, являются антиоксидантными, антигипертензивными, гипохолестеринемическими и противоопухолевыми (Faridy et al., 2020).

Знание генетического разнообразия помогает маркировать зародышевую плазму, идентифицировать генный фонд и создавать основные коллекции (Upadhyaya et al., 2007). Если родители, выбранные для гибридизации, имеют различное (далекое) происхождение, тем больше шансов улучшить рассматриваемые признаки (Malik et al., 2014). Оценка генетического разнообразия зародышевой плазмы растения важна в качестве общего ориентира при выборе родителей для выведения новых сортов с целью модификации и сохранения генетических ресурсов. Сохранение и использование разнообразных генетических ресурсов растений является важной частью программ селекции, поэтому для получения уникальных и перспективных

генотипов отбирается именно генетически разнообразный материал (Hajibarat Z et al., 2015).

Одной из основных задач селекции является подбор сортов нута с высокой урожайностью и создание на их основе новых сортов, более пригодных для механизированной уборки — высокорослых, с высоким прикреплением нижних бобов, дружно созревающих и неосыпающихся, а также устойчивых к грибным, бактериальным и вирусным болезням. Эти сорта представляет ценность для включения в рабочие коллекции различных селекционных учреждений для использования в селекции нута (Шихалиева, 2016). Однако ввиду постоянной работы селекционеров по выведению новых сортов нута, необходимо изучать их характеристики и находить наиболее генетически отдаленные линии для дальнейших работ по выведению наиболее генетически разнообразных сортов.

Целью текущего исследования является анализ генетического разнообразия новых линий нута типа кабули селекции FLIP, полученных в Международном центре сельскохозяйственных исследований засушливых регионов (ICARDA, ИКАРДА), с помощью RAPD-маркеров и выбор линий с широкой генетической вариацией для дальнейшей селекции уникальных и перспективных генотипов. Исследовательский вопрос: использование каких ценных родительских генотипов перспективно для создания гибридного материала.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Агротехнические особенности нута

Известны два основных вида нута: дези и кабули: семена первого более мелкие, угловатые, с темной и грубой зерновой оболочкой, а семена второго крупнее по размеру, с гладкой и кремовой семенной оболочкой. Тип дези представляет собой предковую форму, в то время как тип кабули возник в результате мутации и отбора (Gupta et al., 2019). Разница во внешнем виде и химическом составе сортов нута зависит от района произрастания и условий, которые влияют на продолжительность вегетационного периода или устойчивость к различным заболеваниям. Сравнивая химический состав нута, можно увидеть, что морфотипы принципиально отлича-

ются по содержанию клетчатки, белков, углеводов и полифенолов. Энергетическая ценность семян деши составляет 327 ккал на 100 г, кабули — 365 ккал на 100 г (Rachwa-Rosiak et al., 2015). Нут содержит моносахариды (глюкозу, галактозу, фруктозу и рибозу), дисахариды (сахарозу и мальтозу) и олигосахариды (рафинозу, стахиозу, цицеритол и вербаскозу). Нут — доступный источник белка, углеводов, минералов и витаминов, пищевых волокон, фолиевой кислоты, β-каротина и полезных для здоровья жирных кислот (Jukanti et al., 2012).

Изменение климата, истощение природных ресурсов, сокращение пахотных земель и перенаселение ряда районов представляют собой основные препятствия на пути достижения глобальной продовольственной безопасности. Таким образом, чтобы совершить значительный прорыв в производстве продуктов питания, необходима устойчивая интенсификация сельскохозяйственного производства за счет малозатратного сельского хозяйства и выведения сортов с улучшенной урожайностью и адаптируемостью. Традиционными и современными методами селекции растений можно добиться выведения бобовых, зерновых и других важных продовольственных культур, особенно нута, используя доступное генетическое разнообразие (Raina et al., 2019).

Методы оценки генетического разнообразия сортов нута

Молекулярные маркеры неопределимы в генетических исследованиях из-за их способности различать генотипы. Наиболее широко используемым методом ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD) является модифицированный метод ПЦР, основанный на использовании праймера случайной последовательности из 10 оснований, GC состав которого 60% и более. ПЦР-амплификацию можно ожидать только в том случае, если сайт праймирования встречается дважды в противоположном направлении примерно на 2000 оснований. Следовательно, сопоставление амплифицированных фрагментов разных видов возможно с использованием RAPD-праймеров. Полиморфизм RAPD является результатом изменений последовательности в сайтах праймера и/или изменений в последовательности-мишени между сайтами связывания праймера (Grover et al., 2016).

В последние годы для отбора наиболее перспективных сортов растений по целевым признакам активно используются генетические методы исследования, позволяющие установить их свойства. Так, были изучены количественные и качественные показатели интродуцированных из генбанка ICARDA (Международный центр сельскохозяйственных исследований засушливых регионов, Сирия) 76 генотипов нута (*Cicer arietinum* L.). Каждый из исследованных признаков показал высокую генетическую вариацию. Самую высокую вариацию среди признаков показала высота растения, а самая незначительная вариация была у ширины боба. Кластерный анализ был построен на основании индекса генетического евклидова расстояния методом UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean). Исследованные генотипы были сгруппированы в 3 основных кластера. Генотипы, близкие друг к другу по различным признакам, были отобраны в соответствующие кластеры. Из всех исследуемых образцов Flip13–70c, Flip13–364c, Flip 13–258c, Flip10–345c, Flip11–08c, Flip11–198c, Flip11–45c были оценены как наиболее урожайные, перспективные образцы (Салманова, 2021).

В природе растения могут подвергаться быстрому обезвоживанию, что приводит к значительным потерям годового мирового производства нута. Получение дополнительных знаний о механизмах устойчивости нута к быстрому обезвоживанию имеет решающее значение для создания высокоурожайных сортов, обеспечивающих стабильное производство нута в условиях внезапного дефицита воды. В работе ученых генетические исследования были сосредоточены на обусловленных генотипом изменениях относительного содержания воды в листьях и связанных с ними различиях в физиологических и биохимических показателях, зависящих от быстрого обезвоживания, в корнях и листьях двух сортов нута, FLIP00–21C и FLIP02–89C. Эти признаки могут быть полезны для оценки засухоустойчивости сортов нута и дальнейших подходов к селекции с использованием маркеров для повышения продуктивности нута. Линия FLIP00–21C показала более высокую устойчивость к быстрому обезвоживанию, чем линия FLIP02–89C (Salahvarzi et al., 2021).

С использованием методов генетического исследования были изучены 837 образцов культурного

вида нута *Cicer arietinum* L. 21 Международного центр ИКАРДА — CICTN (холодостойкие — 110); CIEN-W (озимые — 77); CIEN-S (яровые — 180); CIABN, CIFWN (устойчивые к аскохитозу и фузариозу — 228); CIDTN (засухоустойчивые — 134); CIEN-LS (крупносемянные — 72); CATN (адаптивные — 36) и стародавние сорта Таджикской селекции — 8 образцов, для идентификации продуктивных и устойчивых к грибу *Ascochyta rabiell* Pass., возбудителю аскохитоза. В результате были выделены образцы с ценными селекционными признаками. Эти образцы являются перспективным исходным материалом для практической селекции нута и включения их в селекционные программы для создания новых сортов для условий юго-востока Казахстана (Таскинбаева и др., 2022).

Для поиска высокоурожайных и устойчивых к условиям богарного земледелия генотипов нута с использованием генетических методов исследования были оценены 14 перспективных генотипов нута с двумя контрольными сортами, выращенных в четырех регионах Ирана в вегетационные периоды 2017–2020 гг. Результаты АММИ1-биplot-анализа позволили идентифицировать ряд генотипов как стабильные и высокоурожайные, которые могут быть кандидатами для интродукции новых сортов (Каримизаде и др., 2023).

Комбинированный дисперсионный анализ урожайности семян выявил значительные различия у генотипов в зависимости от местности произрастания, выполненного на основе АММИ1-биplot-анализа, два генотипа — V4 (FLIP 00–39C) и V6 (FLIP 99–26C) были рекомендованы фермерам, выращивающим нут, в качестве новых сортов для осеннего посева в западных районах Ирана (Kanouni, 2015).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Введение

Международный центр сельскохозяйственных исследований засушливых регионов (ICARDA, ИКАРДА), Сирия, основанный в 1977 году, занимается исследовательской деятельностью в рамках четырех программ: Программа сельскохозяйственных систем (FSP), Программа улучшения зерновых (CIP), Программа улучшения пищевых бобовых

(FLIP) и Программа улучшения пастбищ и кормов (PFLP) (Somel, 1983).

Одна из исследовательской деятельности Международного центра ICARDA включает в себя работы по скрещиванию линий нута с наиболее желаемыми признаками, такими как: ранняя спелость, оптимальная высота для механизированной уборки, масса зерна, цвет семян с высокой товарностью и устойчивостью к болезням.

На ранних стадиях селекционных работ происходит сегрегирование генетического материала растений, а после 5 поколений полученные линии проходят предварительные испытания, которые проводятся в разных странах, таких как Иран, в виде проектов Lattice (Lattice — волонтерский вычислительный проект, который объединил вычислительные ресурсы, Grid-промежуточное программное обеспечение, специализированное научное прикладное программное обеспечение и веб-сервисы в комплексную грид-вычислительную систему для научного анализа. Он запустил Генетический алгоритм для программного обеспечения быстрого вероятностного вывода для определения взаимосвязей между различными генетическими образцами (Cummings, 2014).

Материалы

В текущем исследовании было изучено 18 линий нута FLIP (FLIP — Food Legume Improvement Program) типа кабули, которые были отобраны в ходе предварительного тестирования для сравнения производительности сельскохозяйственной исследовательской станции Гачсаран, Иран. Некоторые агрономические характеристики экспериментальных генотипов 18 линий нута FLIP представлены в Таблице 1.

По агрономическим характеристикам опытных генотипов нута линия FLIP04–30C//00TH40/3/FLIP98–129C/S99003 имеет самую высокую урожайность — 2617 кг/га с самым коротким периодом цветения и коротким периодом созревания, поэтому была отмечена как лучшая линия по агрономическим характеристикам.

Таблица 1

Некоторые агрономические характеристики экспериментальных генотипов нута

№	Название линии	Число семян в бобе	Дней до 50 % цветения	Дней до созре- вания	Высота растения, см	Масса 100 семян, г	Урожай- ность зер- на, кг/га	Холодо- устойчи- вость, %*
1	FLIP03–26C/3/98TH70/4/(FLIP93–210C/ FLIP87–8C)/S96086	1	80	110	45	31.0	2387	130
2	FLIP04–30C//00TH 40/3/FLIP98–129C/ S99003	2	79	110	51	31.9	2617	143
3	FLIP05–88C//2000TH 31/3/FLIP98–29C/S99093	2	80	109	55	28.8	2457	134
4	FLIP05–109C/3/2000TH 77/4/(FLIP84–145C/ILC2398)//FLIP98–29C	1	80	111	50	25.5	2173	119
5	FLIP05–110C/3/2000TH 77/4/(FLIP84–145C/ILC2398)//FLIP98–29C	1	80	111	48	28.8	2333	127
6	FLIP06–17C//2002TH 18/3/FLIP98–130C/FLIP98–120C	1	81	109	51	29.4	2327	127
7	FLIP06–33C//2002TH 24/3/S99439/FLIP98–130C	1	78	110	52	29.9	1957	107
8	FLIP06–39C//2002TH 37/3/S99520/FLIP98–048C	1	77	112	58	30.8	1987	108
9	FLIP06–43C//2002TH 40/3/FLIP98–28C/FLIP98–079C	2	81	115	56	28.6	2130	116
10	FLIP06–47C//2002TH 41/3/FLIP98–38C/FLIP98–175C	2	84	115	55	30.3	1650	90
11	FLIP06–55C//2002TH 71/3/S00815/FLIP98–079C	1	84	114	67	31.3	1673	91
12	FLIP06–59C//2002TH 76/3/S99858/FLIP97–026C	2	83	115	53	30.9	1847	101
13	FLIP06–67C//2002TH 86/3/S00815 / S00835	2	80	112	54	31.2	1727	94
14	FLIP06–93C/4/2002TH 119/5/[(FLIP98–64C/FLIP98–47C)//Sel99ter85488]/3/FLIP98–022C	1	76	114	58	31.8	1497	82
15	FLIP06–97C/4/2002TH 119/5/[(FLIP98–64C/FLIP98–47C)//Sel99ter85488] /3/FLIP98–022C	1	80	116	56	32.9	1223	67
16	FLIP06–101C/4/2002TH 121/5/[(FLIP98–132C/S99093)//FLIP98–9C]/3/FLIP98–121C	2	83	113	52	32.9	1597	87
17	FLIP06–104C/4/2002TH 123/5/[(FLIP98–29C/S99442)//S15042]/3/ FLIP98–210C	2	83	112	50	34.2	1907	104
18	FLIP06–105C/4/2002TH 123/5/[(FLIP98–29C/S99442)//S15042]/3/ FLIP98–210C	1	82	113	53	32.6	2273	124

Примечание.

а Отношение количества проросших семян до холодообработки к количеству выживших растений после холодообработки, %
 б Составлено по Fazeli & Cheghamirza (2011), Kamel & Moradi (2008), Rezaeinia (2017)

Методы и процедура исследования

Выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов растений проводили по методу Деллапорта (Dellaporta et al., 1983). Для определения количества и качества ДНК использовали спектрофотометр. Величина поглощения света при длине волны 260 нм и 280 нм для образца геномной ДНК была равна 1,8 и 2, соответственно.

RAPD-ПЦР

Для проведения ПЦР использовали восемь RAPD-праймеров (таблица 1). Реакционная смесь состояла из 10-кратного ПЦР-буфера (2,5 мкл), $MgCl_2$ (5 мкл), dNTP (2,5 мкл), праймера (1,5 мкл), Taq-полимеразы (0,2 ед.). Общий объем реакционной смеси доводился mQ водой до объема 25 мкл. В качестве матрицы была использована геномная ДНК в количестве 5 нг на реакцию. Электрофоретический анализ полученных продуктов проводили в 1,5 % агарозном геле (ТАЕ буфер). На «дорожку» наносили 10 мкл образца ПЦР-продуктов. Электрофорез проводился при напряжении электрического тока 70 В в течение 80 мин. Был использован маркер AMPIGENE® DNA Ladder 250–10,000 bp. (Sapphire Bioscience Pty. Ltd., Австралия).

После электрофореза гель окрашивали раствором 10 мкг/мл бромистого этидия в течение 10 минут при комнатной температуре, затем гель промывали проточной водой и проводили визуализацию с использованием гель-документирующей системы «Compact pro» («Gel documentation system», Иран).

Инструменты

Изучаемые признаки генетического разнообразия линий нута, получаемые в результате использования маркерной системы RAPD, представляют собой ПЦР-продукты, генерируемые праймерами, и RAPD-маркер является одним из доминирующих маркеров. Наличие или отсутствие ПЦР-продукта является критерием для подсчета баллов, поэтому для анализа данных необходимо сформировать матрицу подобия из нуля и единицы. Поскольку изучаемые свойства представляют собой полосы ДНК-фрагментов, расположенные на разных расстояниях от общего и фиксированного источника — лунки геля, поэтому расстояние каждой полосы является количественным признаком (расстояние в миллиметрах) и должно быть преобразовано в качественные показатели для анализа. Это преобразование выполняется при наличии или отсутствии полосы на определенном расстоянии от лунки геля.

Была сформирована матрица из нуля и единицы, и данные были проанализированы с использованием программного обеспечения SPSS 9 и PopGen32. Для этого исследования было использовано 8 праймеров, которые давали специфические полосы ДНК-фрагментов. GC-состав используемых нуклеотидных последовательностей праймеров варьировался от 60 до 80 %. Характеристики 8 праймеров приведены в Таблице 2.

Таблица 2

Праймеры, их последовательность, количество обнаруженных локусов, количество полиморфных локусов и диапазон размеров амплифицированных продуктов, полученных с RAPD-праймеров

№	Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (50–30)	Обнаруженные локусы	Полиморфные локусы	Общее количество фрагментов ДНК	Диапазон размеров фрагментов ДНК (п.н)
1	Opp6	5' GTGGGCTGAC 3'	5	1	34	200–2000
2	Opp15	5' AAGCCAACAC 3'	6	5	55	500–3500
3	Ops2	5' CCTCTGACTG 3'	5	-	39	500–1500
4	Opu18	5' GAGGTCCACA 3'	3	1	30	500–1500
5	T9	5' CACCCCTGAG 3'	1	-	10	750–1000
6	UB709	5' CCTCTCCCT 3'	5	1	40	250–1500
7	UB763	5' CACACCACCC 3'	6	5	90	250–2000
8	UB790	5' GGAAGTCGCC 3'	5	4	44	200–2000

Примечание. Составлено по Chowdhury et al. (2002), Datta (2011).

Анализ и валидация результатов

В работе применяли статистический метод обработки экспериментальных данных, в ходе которого определяли среднее значение искомой величины при 3-кратной повторности, а также среднеквадратическое отклонение и доверительный интервал при помощи программного пакета «Statistica 10.0» (Statsoft inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках настоящего исследования на первом этапе проводился ПЦР-анализ 18 линий нута с использованием 8 праймеров. Далее проводили оценку общего количества фрагментов ДНК, полученных в каждом генотипе для всех использованных праймеров. Дендрограмма, основанная на методе UPGMA, разделила сорта на 6 различных групп по степени родства.

ПЦР-анализ линий нута

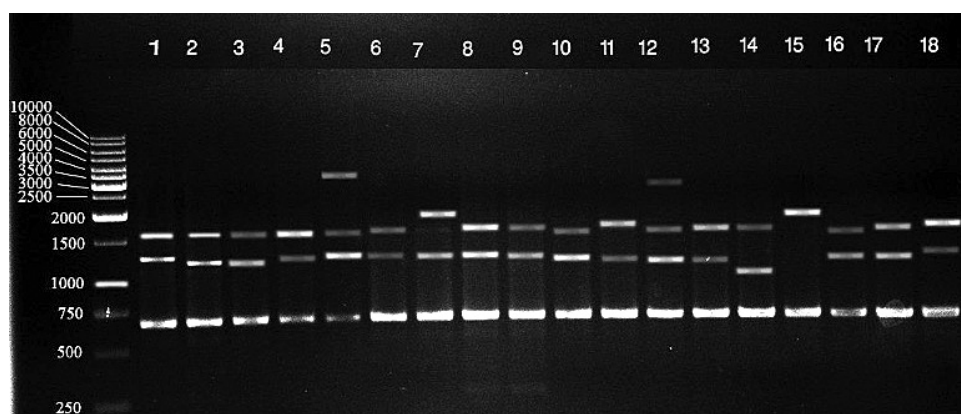
Незначительное генетическое разнообразие заключается в медленном развитии новых сортов нута с требуемыми агрономическими характеристиками. Одним из способов увеличения генетического разнообразия является сбор зародышевой плазмы и получение гибрида. RAPD — это успешный и эффективный метод дифференциации сортов нута. RAPD-маркеры использовали для исследования генетического разнообразия сортов нута на молекулярном уровне. В этом исследовании оценивали 18 линий нута, входящих в Международный центр

ICARDA. Были проанализированы ПЦР-продукты, которые хорошо визуализировались. В общей сложности с помощью 8 праймеров было получено 342 фрагмента ДНК. Размер полученных ПЦР продуктов варьировался в диапазоне от 200 до 5000 пар нуклеотидов.

Среди них наибольшее сходство наблюдается для линий 17 (FLIP06–104C/4/2002TH123/5/[(FLIP98–29C/S99442)]/3/FLIP98–210C) и 18 (FLIP06–105C/4/2002TH123/5/[(FLIP98–29C/S99442)]/3/FLIP98–210C) со значением 0,947, а наименьшее — для линий 15 (FLIP06–97C/4/2002TH119/5/[(FLIP98–64C/FLIP98–47C)]/3/FLIP98–022C) и 1 (FLIP03–26C/3/98TH70/4/[(FLIP93–210C/FLIP87–8C)]/3/S96086) со значением 0,407. Кроме того, большое количество ПЦР продуктов образуется при амплификации с праймера UB763. Таким образом, этот праймер смог определить генетическое расстояние между линиями лучше, чем другие праймеры, и может быть использован для анализа комплекса зародышевой плазмы в будущих исследованиях. Линии 15 и 1 показали большую генетическую дистанцию, чем другие линии. Линии 5 (FLIP05–110C/3/2000TH77/4/[(FLIP84–145C/ILC2398)]/3/FLIP98–29C), 15 (FLIP06–97C/4/2002TH119/5/[(FLIP98–64C/FLIP98–47C)]/3/Sel99ter85488]/3/FLIP98–022C), 9 (FLIP06–43C//2002TH 40/3/FLIP98–28C/FLIP98–079C) и 8 (FLIP06–39C//2002TH37/3/S99520/FLIP98–048C) были выделены в отдельные группы по сравнению с другими линиями. Наименьшее количество ДНК-локусов относится к праймеру T9 (10 фрагментов ДНК). В этом эксперименте большинство мономорфных ДНК-локусов принадлежало праймеру UB763 с 5 фрагментами-ДНК, а прай-

Рисунок 1

Электрофореграмма ПЦР анализа 18 клеточных линий нута с праймером Opp15.



мер T9 был единственным праймером, у которого не было мономорфного ДНК-локуса. Праймер UB763 в ДНК-фрагменте 700 п.н. увеличил количество четких фрагментов ДНК для всех линий (Рисунки 1, 2). При анализе полученных данных процент полиморфизма составил 75 %, а коэффициент сходства Жаккара — 96 % (Рисунки 3, 4, Таблица 3).

С помощью праймера Orp15 идентифицировано 6 локусов генов в диапазоне от 700 до 3500 кДа для линий ДНК, один из которых был общим для всех линий (мономорф — 700 кДа), а остальные 5 локусов были разными (полиморфы).

С помощью праймера UB790 идентифицировано 5 локусов генов в диапазоне от 250 до 2000 кДа для

линий ДНК, один из которых был общим для всех линий (мономорф — 1000 кДа), а остальные 4 локусов были разными (полиморфы).

Дендрограмма фрагментов ДНК исследуемых линий нута

Линии нута были сгруппированы на основе матриц 1 и 0, полученных при использовании RAPD-маркеров, коэффициента сходства Жаккара и метода UPGMA (метод невзвешенных парных групп со средним арифметическим). С помощью построенной дендрограммы (Рисунок 4) генотипы были сгруппированы в 6 групп (Таблица 3).

Рисунок 2

Электрофореграмма ПЦР анализа 18 клеточных линий нута с праймером UB790

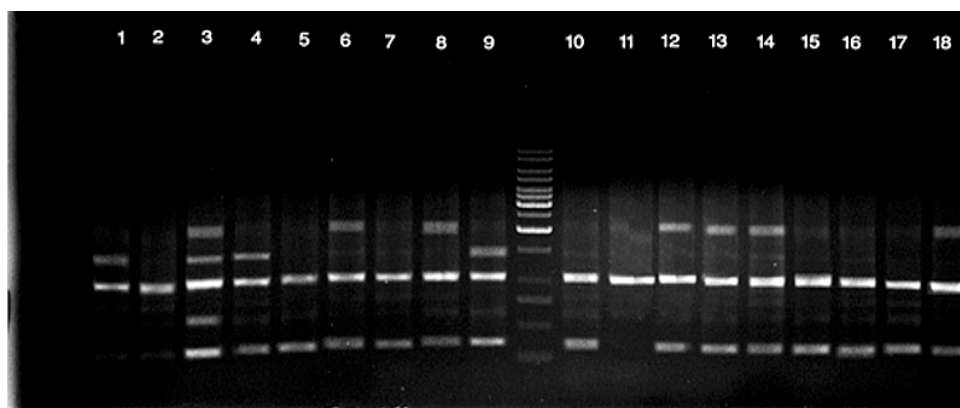


Рисунок 3

Диаграмма общего количества фрагментов ДНК, полученных в каждом генотипе для всех использованных праймеров. Каждый столбец представляет общее количество полос ДНК, образованных каждой линией для всех праймеров, использованных в этом эксперименте.

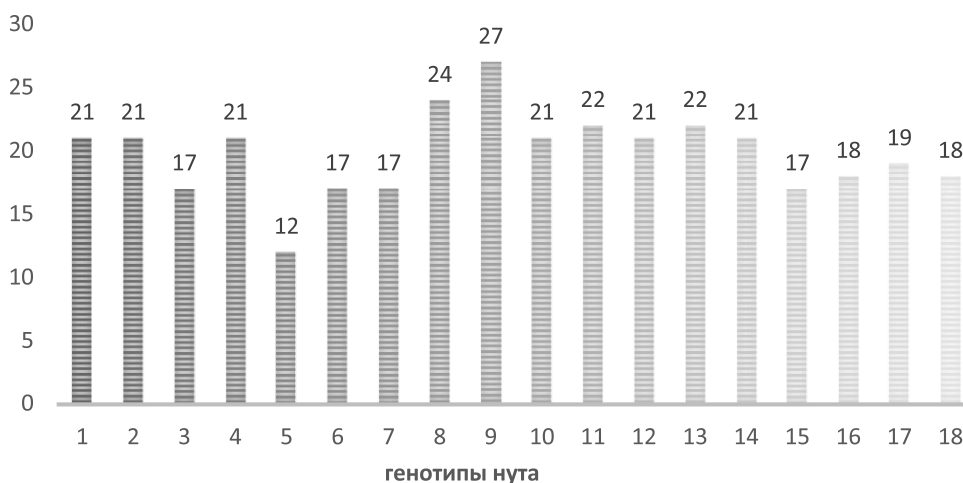


Рисунок 4
Дендрограмма для определения генетических связей между 18 линиями нута

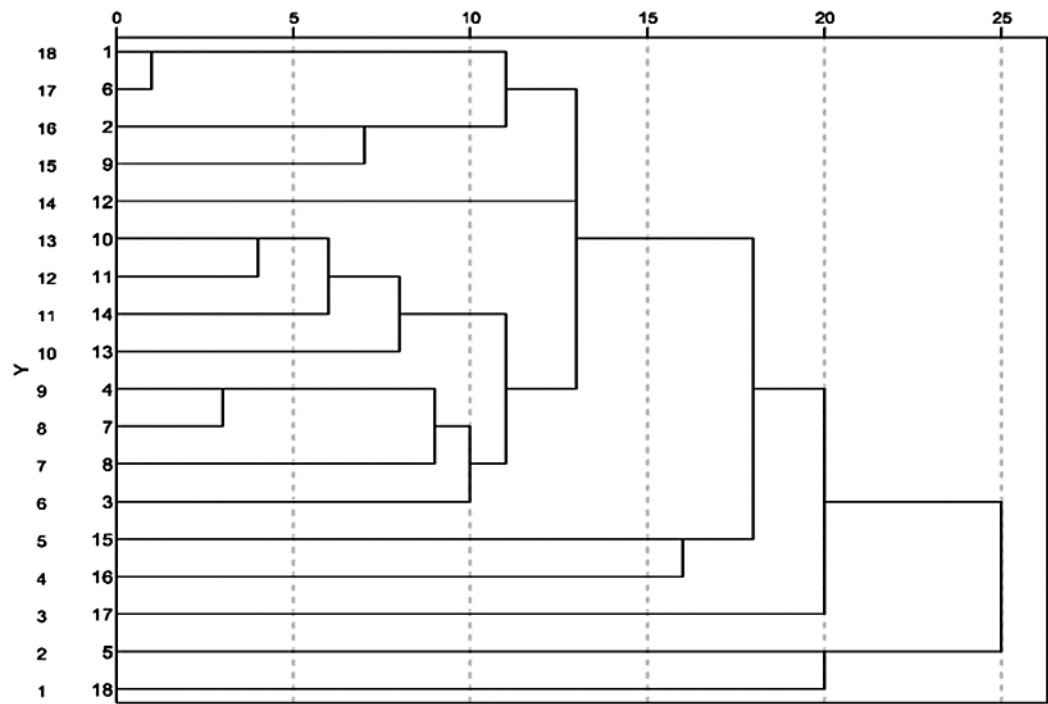


Таблица 3
Группировка линий нута по степени родства/6 групп генотипов 18 линий нута

Ряд/группа	Группа/линии
1	17-18-16-13-11-12-14-3-10
2	2-4-1-7-6
3	8
4	9
5	15
6	5

Дендрограмма, основанная на методе UPGMA, разделила сорта на 6 различных групп. Линии 15 и 1 показали бóльшую генетическую дистанцию, чем другие линии. Линии 5, 15, 9 и 8 были выделены в отдельные группы по сравнению с другими линиями. По результатам дендограммы (рис. 4) и таблицы 3 генотипических характеристик линий нута в 1-ю группу вошли 9 линий, сходных по срокам цветения, времени роста и размеру стебля, а в 2-ю группу — 5 линий, сходных по срокам цветения, времени роста и размерам стебля. Урожайность с гектара, масса ста семян и продолжительность цветения также были сходны внутри групп.

Наиболее важными критериями при выборе маркера являются объем получаемой информации, простота в эксплуатации, более низкая себестоимость и более высокая скорость работы. RAPD-маркер соответствует большинству вышеперечисленных критериев, не требует использования радиоактивных материалов и имеет шаблонную последовательность ДНК, а также показывает непосредственную разницу между геномами растений. Также возможно использовать общие праймеры, которые могут быть использованы для исследования генома любого вида растений, что делает RAPD подходящим маркером для изучения генетического разнообразия и степени родства в семействах, а также позволяет оценить наследственные резервы растений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании экспериментально-аналитических данных была проведена оценка генетического разнообразия 18 линий нута типа кабули с использованием RAPD-маркеров. Данный метод по прежнему остается актуальным и служит основой для построения дендрограмм на основе полученных фрагментов ДНК и выявления сортов с наибольшей генетической дистанцией.

Дендрограмма продуктов ПЦР, полученных с помощью RAPD-праймеров, разделила сорта на 6 различных групп. Линии FLIP03–26C/3/98TH70/4/(FLIP93–210C/ FLIP87–8C)//S96086 и FLIP06–93C/4/2002TH 119/5/[(FLIP98–64C/FLIP98–47C)//Sel99ter85488] /3/ FLIP98–022C показали большую генетическую дистанцию, чем другие линии. Линии FLIP05–110C/3/2000TH 77/4/(FLIP84–145C/ILC2398)//FLIP98–29C, FLIP06–97C/4/2002TH 119/5/[(FLIP98–64C/FLIP98–47C)//Sel99ter85488] /3/ FLIP98–022C, FLIP06–43C//2002TH 40/3/FLIP98–28C/FLIP98–079C, FLIP06–39C//2002TH 37/3/S99520/ FLIP98–048C были выделены в отдельные группы по сравнению с другими линиями. В 1-ю группу вошли 9 линий, сходных по срокам цветения, времени роста и размеру стебля, а в 2-ю группу — 5 линий, сходных по срокам цветения, времени роста и размерам стебля. Урожайность с гектара, масса ста семян и продолжительность цветения также были сходны внутри групп. Линия FLIP04–30C//00TH40/3/FLIP98–129C/S99003 имеет самую высокую урожайность — 2617 кг/га с самым коротким периодом цветения и коротким периодом созревания, поэтому была отмечена как самая перспективная. Такие линии с широкой генетической вариацией можно использовать в качестве родительских линий для получения новых сортов нута с высоким генетическим разнообразием и перспективными агрономическими характеристиками.

Многие исследователи также изучали генетическое разнообразие сортов нута, в т.ч. определяли генетическое разнообразие и взаимосвязь с агрономическими признаками 15 генотипов нута кабули. Результаты показали, что оптимальные агрономические признаки играют важную роль в урожайности семян нута, и они должны учитываться при селекционной работе (Yucel et al., 2006).

Полиморфизмы ДНК в 20 генотипах нута, полученных из 10 различных географических регионов мира, были обнаружены с помощью 42 RAPD-маркеров и 41 ISSR-маркера. Маркеры RAPD идентифицировали 51 % генетического полиморфизма, в то время как маркеры ISSR идентифицировали 54 %. Полученные результаты позволяют планировать больше программ селекции и интегрировать их в сельскохозяйственные системы для селекции растений и выведения новых сортов нута (Yadav et al., 2015).

Промышленные сорта и улучшенные линии 30 генотипов нута были подвергнуты RAPD-анализу для оценки генетического разнообразия. Были использованы 16 праймеров RAPD. Амплификация геномной ДНК 30 генотипов позволила получить 62 фрагмента. Количество продуктов амплификации, полученных с одного праймера, варьировалось от двух до четырех со средним значением 3. Общее количество ДНК-локусов, амплифицированных 16 праймерами, варьировалось от 16 до 34. Праймер GLK-15 позволил получить 4 фрагмента, тогда как праймеры GLK-19 и GLD-19 только по одному фрагменту. ДНК-фрагмент, образуемый с праймера GTGTGCCCCA в генотипах PB-2000 и 07005, может быть отнесен к фенотипам устойчивости к резким перепадам температуры окружающей среды (Ahmad, 2010).

В исследовании 75 образцов, принадлежащих к 14 видам рода *Cicer*, были проанализированы с помощью ДНК-маркеров для определения их филогенетических связей. Было использовано 12 праймеров и получено 234 полиморфных фрагмента. Дендрограмма, основанная на коэффициенте подобия Жаккара, показала, что особенности роста и географическое происхождение растений связаны с характером распределения ДНК разнообразия между видами (Iruela et al., 2002).

ISSR, RAPD, M4 маркеры и морфо-агрономические признаки были использованы для исследования поколения M3 94 мутантных линий нута. В общей сложности картины фрагментов ДНК 6 праймеров ISSR и 8 праймеров RAPD позволили получить 21 (50 %) и 24 (42,25 %) полиморфных ДНК-локуса соответственно (Rostami-Ahmadvand et al., 2016).

RAPD и SSR маркеры были использованы в исследовании для выявления генетических взаимосвязей между 19 сортами нута и 5 дикорастущими сортами. Результаты этого исследования подтвердили способность двух маркеров, RAPD и SSR, обнаруживать полиморфизм между сортами нута и его дикорастущими родственниками (Rao et al., 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

RAPD является эффективным инструментом для оценки и выявления генетического разнообразия сортов нута. Использование молекулярных марке-

ров позволяет осуществлять отбор и внесение новых образцов в генетические коллекции. Выбранные линии, имеющие наибольшую генетическую удаленность друг от друга, можно использовать в качестве родительских линий для получения новых перспективных по агрономическим характеристикам сортов.

При этом в качестве ограничений выступает набор праймеров для проведения RAPD-ПЦР, который отличается у разных исследователей, поэтому необходимо стремиться использовать праймеры, которые наиболее часто используются для оценки генетического разнообразия.

Дальнейшие исследования будут направлены на выведение новых генотипов нута с помощью традиционных методов селекции, что позволит получать разнообразный гибридный материал.

ЛИТЕРАТУРА

- Каримизаде, Р., Пезешкпур, П., Мирзаи, А., Барзали, М., Шарифи, П., Сафари Мотлах, М.Р. (2023). Анализ стабильности урожайности семян генотипов нута (*Cicer arietinum* L.) с помощью экспериментальных и биологических подходов. Вавиловский журнал генетики и селекции, 162, 135–145. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-19>
- Karimizadeh, R., Pezeshkpour, P., Mirzaei, A., Barzali, M., Sharifi, P., Safari Motlah, M.R. (2023). Analysis of seed yield stability of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes using experimental and biological approaches. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 162, 135-145. (In Russ.) <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-19>
- Салманова, М.Р. (2021). Статистический анализ качественных признаков, урожайности и некоторых технологических показателей генотипов нута (*Cicer arietinum* L.). Успехи современного естествознания, 12, 76-82. <https://doi.org/10.17513/use.37739>
- Salmanova, M.R. (2021). Statistical analysis of qualitative traits, yield and some technological indicators of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Advances in Modern Natural Science*, 12, 76-82. (In Russ.) <https://doi.org/10.17513/use.37739>
- Таскинбаева, Р.Ж., Есимбекова, М.А., Ыдырыс, А.А., Байтаракова, К.Ж. (2022). Формирование активной коллекции нута (*Cicer* L.) для селекции на адаптивность и устойчивость в условиях юго-востока Казахстана. Зернобобовые и крупные культуры, 2(42), 74-81. <https://doi.org/10.24412/2309-348X-2022-2-74-81>
- Taskinbaeva, R.Zh., Yesimbekova, M.A., Ydyrys, A.A., Baytarakova, K.Zh. (2022). Formation of an active collection of chickpeas (*Cicer* L.) for selection for adaptability and resistance in the conditions of south-east Kazakhstan. *Leguminous and Cereal Crops*, 2(42), 74-81. (In Russ.) <https://doi.org/10.24412/2309-348X-2022-2-74-81>
- Шихалиева, К. Б., Акперов, З. И., Амиров, Л. А., Гасанова, С. К., & Бабаева, С. М. (2016). Роль генофонда нута (*Cicer arietinum* L.) из коллекции зернобобовых культур в решении задач селекции в азербайджане. Успехи современного естествознания, (7), 101-105.
- Shikhalieva, K. B., Akperov, Z. I., Amirov, L. A., Gasanova, S. K., & Babaeva, S. M. (2016). The role of the gene pool of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from the collection of leguminous crops in solving breeding problems in Azerbaijan. *Advances in Modern Natural Science*, (7), 101-105. (In Russ.)
- Ahmad, F., Khan, A. I., Awan, F. S., Sadia, B., Sadaqat, H. A., & Bahadur, S. (2010). Genetic diversity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm in Pakistan as revealed by RAPD analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9(3), 1414-1420. <https://doi.org/10.4238/vol9-3gmr862>
- Chowdhury, M. A., Vandenberg, B., & Warkentin, T. (2002). Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, 127, 317-325. <https://doi.org/10.1023/A:1020366819075>
- Cummings M. (June 16, 2014). *UMD-led public computational biology web service gains popularity*. University of Maryland.
- Datta, J., & Lal, N. (2011). Characterization of genetic diversity in *Cicer arietinum* L. and *Cajanus cajan* L. Millspaugh using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Genomics and Quantitative Genetics*, 3, 30-41.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Маджид Масумиан: концептуализация; руководство исследованием.

Махмуд Гаравири: курирование данных; верификация данных.

Захра Годжаванд: проведение исследования.

Махбубех Ахангаран: создание черновика рукописи.

Машенцева Наталья Геннадьевна: разработка методологии исследования; написание, рецензирование и редактирование рукописи.

Джафар Масуд Синаки: консультант по исследованиям.

- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Faridy, J. C. M., Stephanie, C. G. M., Gabriela, M. M. O., & Cristian, J. M. (2020). Biological activities of chickpea in human health (*Cicer arietinum* L.). A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 142-153. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00814-2>
- Fazeli, F., & Cheghamirza, K. (2011). Genetic variation in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L. kabuli type) based on agronomic traits and RAPD marker. *Seed and Plant Journal*, 27(4), 555-579.
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>
- Gupta, R. K., Gupta, K., Sharma, A., Das, M., Ansari, I. A., & Dwivedi, P. D. (2017). Health risks and benefits of chickpea (*Cicer arietinum*) consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(1), 6-22. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02629>
- Gupta, S., Liu, C., & Sathe, S. K. (2019). Quality of a chickpea-based high protein snack. *Journal of Food Science*, 84(6), 1621-1630. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14636>
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Hajibarat, Z., & Talebi, R. (2015). Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21, 365-373. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0306-2>
- Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J. I., Gil, J., & Millan, T. (2002). Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4), 643-651. <https://doi.org/10.1007/s001220100751>
- Juárez-Chairez, M. F., Cid-Gallegos, M. S., Meza-Márquez, O. G., & Jiménez-Martínez, C. (2022). Biological functions of peptides from legumes in gastrointestinal health. A review of legume peptides with gastrointestinal protection. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14308. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14308>
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S11-S26. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512000797>
- Kanouni, H., Farayed, Y., Saeid, A., & Sabaghpour, S. H. (2015). Stability analyses for seed yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in the western cold zone of Iran. *Journal of Agricultural Science*, 7(5), 219. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n5p219>
- Kamel, M., and Moradi, P. 2008. Determination of traits effective on seed yield of 36 lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in northwest provinces of Iran in dry land conditions. *Seed and Plant Journal*, 24(2), 347-257. <https://doi.org/10.22092/SPIJ.2017.110809>
- Malik, S. R., Ghulam, S., Muhammad, Z., Iqbal, S. M., & Asghar, A. (2014). Genetic diversity analysis of morpho-genetic traits in Desi chickpea (*Cicer arietinum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(5), 956-960.
- López-Martínez, L. X., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2017). Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. *Journal of Functional Foods*, 38, 624-634. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.002/>
- Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E., & Budryn, G. (2015). Chickpeas—composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(8), 1137-1145. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.687418>
- Rao, L. S., Usha Rani, P., Deshmukh, P. S., Kumar, P. A., & Panguluri, S. K. (2007). RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1235-1244. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9104-6>
- Rostami-Ahmadvandi, H., Kahrizi, D., Cheghamirza, K., Nosratti, I., & Zargooshi, J. (2016). Molecular and agro-morphological genetic diversity assessment of Chickpea mutants induced via ethyl methane sulfonate. *Cellular and Molecular Biology*, 62(11), 8-12. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.11.2>
- Raina, A., Khan, S., Wani, M. R., Laskar, R. A., & Mushtaq, W. (2019). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) cytogenetics, genetic diversity and breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes: Volume 7*, 53-112. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23400-3-3>
- Rezaeinia, M., Bihamta, M. R., Peyghambari, S. A., Abbasi, A., & Gharajedaghi, F. (2017). Genetic diversity and relationships between some agronomic traits of chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under non-stress and terminal drought stress conditions. *Iranian Journal Pulses Research*, 8(1), 83-96. <https://doi.org/10.22067/ijpr.v8i1.48717>
- Salahvarzi, M., Nasr Esfahani, M., Shirzadi, N., Burritt, D. J., & Tran, L. S. P. (2021). Genotype- and tissue-specific physiological and biochemical changes of two chickpea (*Cicer arietinum*) varieties following a rapid dehydration. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1822-1834. <https://doi.org/10.1111/pp1.13452>
- Somel K. (1983). Nutrition-Related Dimensions of Agricultural Research at ICARDA. *International Center for Agricultural Research in the Dry Areas*.
- Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Gowda, C. L. L., & Singh, S. (2007). Identification of diverse germplasm lines for agronomic traits in a chickpea (*Cicer arietinum* L.) core collection for use in crop improvement. *Field Crops Research*, 100(2-3), 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.08.008>
- Yadav, P., Koul, K. K., Shrivastava, N., Mendaki, M. J., & Bhagyawant, S. S. (2015). DNA polymorphisms in chickpea accessions as revealed by PCR-based markers. *Cellular and Molecular Biology*, 61(5), 84-90.
- Yücel, D. Ö., Anlarsal, A. E., & Yücel, C. (2006). Genetic variability, correlation and path analysis of yield, and yield components in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 30(3), 183-188.