

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 1, Number 311 (2017), 150 – 155

UDC 575.17

A.P. Chirkin, M.A. Yessimbekova², K.B. Mukin², G.A. Ismagulova¹

¹M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry Committee of Science, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan, chirkin_a@mail.ru;

²“Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture and Plant growing”, Agriculture Ministry, Almaty, Kazakhstan, minura.esimbekova@mail.ru

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *AEGILOPS CYLINDRICA*
AND *AEGILOPS TAUSCHII* POPULATIONS INHABITING THE
TERRITORY OF SOUTHERN AND SOUTH-EASTERN KAZAKHSTAN

Abstract. Considerable decrease of biological diversity of cultivated agricultural varieties due to lost parts of the genes or their alleles are supposed to be connected with the decrease in their genetic potential. In this respect it is relevant to study and conserve wild growing cereals a valuable genetic material for modern varieties' selection. We have conducted molecular-genetic analysis of 50 representatives of *Aegilops* L. from Kazakhstan flora and 4 foreign samples. Based on the results of microsatellite analysis we have constructed phylogenetic trees for each species separately and for all studied samples of wild cereals as a whole. Genetic distances between the studied populations are calculated. Direct distribution of populations on the tree depending on the region of origin has been indicated for *Ae. tauschii* species. Direct distribution into the individual branches has been determined for Almaty and South Kazakhstan regions' populations, and transitional distribution between Zhambyl region's populations.

Keywords: *Aegilops* L., population, allelic variations, heterogeneity, phylogenetic analysis, genetic distance.

УДК 575.17

А.П. Чиркин¹, М.А. Есимбекова², К.Б. Мукин², Г.А. Исмагулова¹

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» Комитета науки Министерства образования и науки РК, Алматы, Казахстан chirkin_a@mail.ru;

²ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства» МСХ РК, Алматы, Казахстан
minura.esimbekova@mail.ru

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ
AEGILOPS CYLINDRICA И *AEGILOPS TAUSCHII* ЮЖНОГО
И ЮГО-ВОСТОЧНОГО КАЗАХСТАНА

Аннотация. Значительное сужение биологического разнообразия возделываемых видов сельскохозяйственных культур из-за утери части генов или аллелей связывают со снижением их генетического потенциала. В связи с этим возросла актуальность изучения и сохранения дикорастущих сородичей, как источников ценного генетического материала для селекции современных сортов. Род *Aegilops* L. обладает солидным потенциалом использования в улучшении пшеницы из-за его устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессам и тесной связи с возделываемой пшеницей. На основе результатов микросателлитного анализа 51 местных и зарубежных экотипов рода *Aegilops* L. построены филогенетические деревья для каждого вида в отдельности и для всех изученных образцов в целом. Просчитаны генетические дистанции между изученными популяциями. Для вида *Ae. tauschii* показано прямое распределение популяций на древе в зависимости от района происхождения. Для вида *Ae. cylindrica* установлено распределение популяций Алматинской области и ЮКО в отдельные ветви, а для популяций Жамбылской области промежуточное распределение между ними.

Ключевые слова: род *Aegilops* L. популяции, аллельные варианты, гетерогенность, филогенетический анализ, генетические дистанции.

Введение. В настоящее время, несмотря на наличие значительных по объему мировых коллекций зародышевой плазмы возделываемых видов, генетический потенциал большинства из них уже исчерпан. Эрозия генофонда культурных видов привела к тому, что в большинстве стран с высокоразвитым сельскохозяйственным производством перешли к целенаправленному сохранению, изучению и вовлечению в селекционный процесс диких видов - сородичей культурных растений. Стратегия консервации генетических ресурсов в каждом отдельном ареале требует знаний о существующих генетических источниках и их потенциальном разнообразии [1]. Более 120 видов флоры Казахстана являются дикими сородичами сельскохозяйственных растений. Представители диких и дикорастущих зерновых культур представлены во флоре Казахстана 6 основными родами [2], 3 из которых (в скобках количество видов): *Triticum L.* (6), *Aegilops L.* (5), *Avena L.* (5), *Hordeum L.* (10), входят в первичный, вторичный и третичный генетические пулы пшеницы, ячменя и овса, являясь, тем самым, ценным генетическим материалом, способным расширить неизбежно ограниченную генетическую базу современных сортов, переживших модернизацию сельского хозяйства. Так, известно, что виды рода *Aegilops L.* - доноры *B* и *D* геномов гексаплоидной пшеницы [3]. Виды популяций рода стали источниками устойчивости к болезням засухе, редких и новых генов, контролирующих показатели качества зерна: содержание белка, биосинтез основных белков клейковины и аминокислот [4-7]. Однако, как уникальный генетический ресурс, произрастающий в условиях Центральной Азии, недостаточно изучены с точки зрения генетического разнообразия и селекционной полезности, ограниченно представлены в национальных коллекциях сельскохозяйственных культур [8].

Целью исследования было проведение филогенетического анализа местных и зарубежных экотипов 36 образцов вида *Ae. cylindrica* и 15 образцов вида *Ae. tauschii*.

Материалы и методы исследования. Объектами исследований служили 51 образец рода *Aegilops L.*: 36 образцов вида *Ae. cylindrica* (34 местных и 2 зарубежных экотипов) и 15 образцов вида *Ae. tauschii* (13 местных и 2 зарубежных экотипов).

Выделение геномной ДНК проводили набором Genomic DNA Purification Kit по протоколу производителя Thermo Scientific. ПЦР с EST-STS праймерами проводили в смеси, содержащей 1 ед. HotTaq-полимеразы (Силекс), 4 пмоль прямого и обратного праймеров, 200 мкМ каждого из дНТР и 100 нг ДНК. Условия ПЦР были следующие: 95°C - 5 мин, 94°C - 1 мин, 50-53°C (в зависимости от используемого праймера) - 1 мин, 72°C - 1 мин, с повтором 35 циклов, последняя элонгация - 5 мин при 72°C. В работе использовались 6 пар праймеров: PK1, PK3, PK5, PK8, PK29 и PK31 [9]. Продукты ПЦР разделяли в 10% ПААГ в 1xTBE буфере (50мМ Трис-Н₃ВО₃, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0) с последующей окраской гелей нитратом серебра. Филогенетический анализ осуществляли при помощи программы TFGA (tools for population genetic analysis).

Результаты исследований. Для проведения исследования использовали микросателлитные маркеры, относящиеся к EST-SSRs микросателлитным повторам, характеризующимся локализацией только в кодирующей части генома изучаемых организмов. Из 64-х EST-SSR маркеров для нашей работы были отобраны шесть: PK1, PK3, PK5, PK8, PK29 и PK31. Выбор этих маркеров объясняется тем, что они, как установлено ранее [9], были высоко консервативны для *Triticeae* и могут применяться при изучении генетического разнообразия как внутривидовых, так и межродовых связей некоторых видов одной Трибы, в частности, удобны для изучения геномов видов *Ae. tauschii* и *Ae. cylindrica*. Анализ информативности и, следовательно, обоснование использования того или иного маркера в дальнейшем определяли статистической обработкой полученных результатов как для всех изученных образцов в целом, так и для каждого вида в отдельности.

Не все из изученных маркеров были информативными. Среднее количество аллелей для изученной группы составило 2,75 на локус. Наибольшую информативность показал маркер PK5. Для этого маркера в общей исследованной группе было выявлено 4 аллельных варианта. Менее информативными оказались маркеры PK1, PK29 и PK31. Для маркера PK31 было установлено 3 аллеля, а для маркеров PK1 и PK29 - два аллельных варианта. Два из шести взятых в работу - PK3 и PK8 - не давали искомого фрагмента, поэтому результаты оказались сложными для интерпретации.

Представители каждого вида были кластеризованы в группы в зависимости от места сбора. Образцы вида *Ae. tauschii* были разделены на 10 популяций: районы – г.Талдыкорган, Саркандский, Карасайский, Ескельдинский (Алматинская обл., РК); Сайрамский, Махтааральский, Отрарский, Ордабасинский (Южно-Казахстанской область, РК); Крым, Афганистан. На рисунке 1 представлены результаты филогенетического исследования, построенного для изученных популяций экотипов вида *Ae. tauschii*.

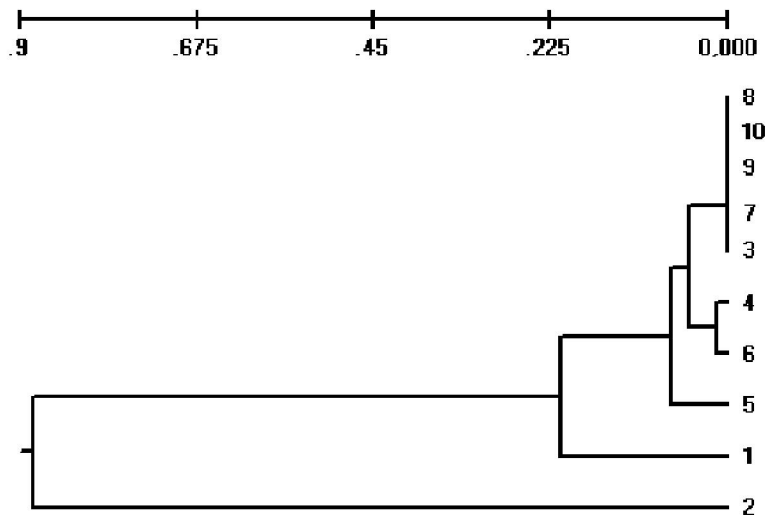


Рисунок 1 - Филогенетическое древо 10-ти изученных популяций вида *Ae. tauschii*, где 1 – Крым, 2 – Афганистан, 3 – г. Талдыкорган, 4 – Саркандский р-он, 5 – Карасайский р-он, 6 – Ескельдинский р-он, 7 – Сайрамский р-он, 8 – Махтааральский р-он, 9 – Отрарский р-он, 10 – Ордабасинский р-он.

Для вида *Ae. tauschii* на филогенетическом древе выделено 3 ветви с подгруппами внутри одной. Две обособленные ветви древа составили образцы из Крыма и Афганистана, генетически наиболее отдаленные от местных экотипов (от 0,9535 до 0,75 для образца из Афганистана). У маркеров РК1 и РК31 образца *Ae. tauschii* из Афганистана было установлено наличие двух аллелей, у остальных представителей *Ae. tauschii* эти аллели отсутствовали.

Местные экотипы составили кластер с тремя отдельными группами. Образцы из Южно-Казахстанской и Алматинской областей кластеризовались в отдельные ветви. В первую группу вошли образцы из Сайрамского, Махтааральского, Отрарского, Ордабасинского районов Южно-Казахстанской области и образец из г.Талдыкорган (Алматинская обл.). Вторую группу образовали две популяции, первая из Саркандского и вторая из Ескельдинского района Алматинской области. Обособленно от этих двух групп кластеризовались представители *Ae. tauschii*, собранные в Карасайском районе Алматинской области. Распределение образцов *Ae. tauschii* на древе по кластерам логично с точки зрения их географических ареалов.

Образцы *Ae. cylindrica* были распределены на 24-х популяций: Армения; Турция; 8 популяций из районов Жамбылской области: Жамбылский, Жуалинский, Байзакский, Таласский, Кордайский, Шуйский и Меркенский, Т. Рыскулова; 6 популяций из районов Южно-Казахстанской области Казыгуртского, Ордабасинского, г. Сарыагаш, Сайрамского, Тюлькубаского и Отрарского; 8 популяций Алматинской области из Раимбекского, Саркандского, Енбекшиказахского, Ескельдинского, Илийского районов, п. Бурундай, п. Чемолган и г. Талдыкорган.

Филогенетическое древо 24-х популяций местных и зарубежных экотипов вида *Ae. cylindrica* приведено на рисунке 2.

Изученные популяции *Ae. cylindrica* распределялись на три клады (группы) с подгруппами внутри каждой. Первую подгруппу первой клады составили образцы из Армении, Енбекшиказахского, Ескельдинского, Раимбекского районов Алматинской области, г. Талдыкорган и 3-х районов Жамбылской области - Жамбылского, Байзакского и Жуалинского. При этом образцы из пос. Бурундай и пос. Чемолган, которые образовали вторую группу этой клады, оказались

генетически однородными. Третью подгруппу в данной кладе образовывали образцы *Ae. cylindrica* из Отрарского района ЮКО и Саркандского района Алматинской области.

Стоит отметить, что практически все пробы, собранные в Алматинской области, кластеризовались в данной ветви древа. Исключение составили образцы из Илийского района. Они, в свою очередь, оказались генетически близки с популяциями из ЮКО (Тюлькубаский р-н, Ордабасинский р-н, г. Сарыагаш) и образовывали вместе третью кладу. В эту же ветвь вошли представители *Ae. cylindrica* из Таласского, Кордайского, Т. Рыскулова районов Жамбыльской области и образец из Турции.

Наименьшую ветвь (кладу) древа составляли популяции из Жамбылской обл. (Шуйский и Меркенский р-ны) и ЮКО (Казыгуртский и Сайрамский р-ны). При этом экотипы каждой из областей образовывали отдельные ветви.

В целом, на основании филогенетического анализа образцов вида *Ae. cylindrica*, можно сделать вывод о высокой межпопуляционной гетерогенности популяций Алматинской и ЮКО областей. Промежуточное расположение популяций Жамбылской области укладывается в географическое распределение образцов по регионам. Изменение географического ареала растений *Ae. cylindrica* со временем приводило к изменению их генома.

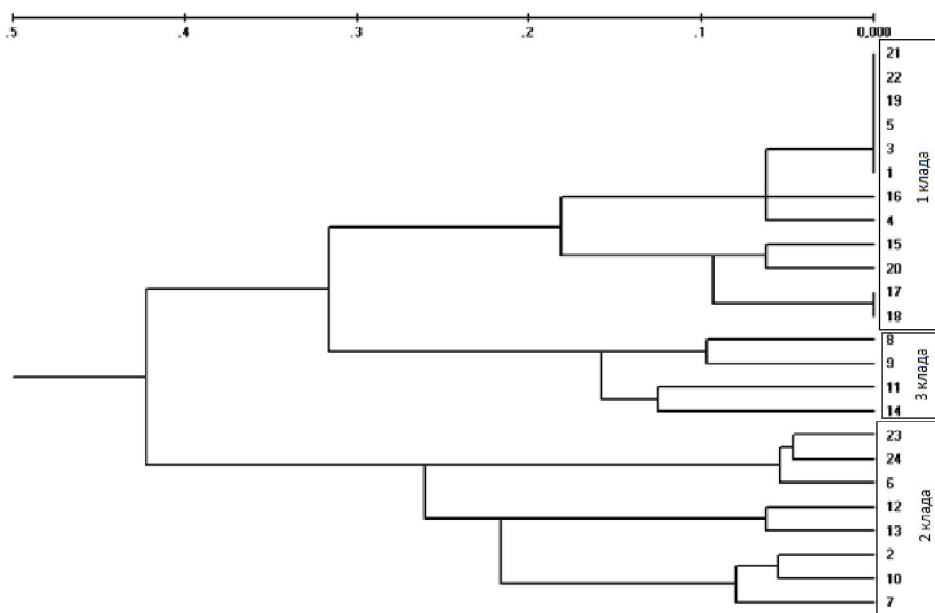


Рисунок 2 - Филогенетическое древо 24-х популяций местных и зарубежных экотипов вида *Ae. cylindrica*, где 1 - Армения, 2- Турция, 3 - Жамбылский р-н, 4 - Жуалинский р-н, 5 - Байзакский р-н, 6 - Таласский р-н, 7 - Кордайский р-н, 8 - Шуйский р-н, 9 - Меркенский р-н, 10 - р-н Т. Рыскулова (Жамбылская обл.); 11 - Казыгуртский р-н, 12 - Ордабасинский р-н, 13 - г. Сарыагаш, 14 - Сайрамский р-н, 15 - Отрарский р-н (ЮКО); 16 - Раимбекский р-н, 17 - пос. Бурундай, 18 - пос. Чемолган, 19 - г. Талдыкурган, 20 - Саркандский р-н, 21 - Енбекшиказахский р-н, 22 - Ескельдинский р-н, 23 - Илийский р-н (Алматинская обл.), 24 - Тюлькубаский р-н (ЮКО)

Выводы. Таким образом, в результате проведенных молекулярно-генетических исследований, были отработаны протоколы ПЦР для 6-ти EST–SSR маркеров (PK1, PK3, PK5, PK8, PK29 и PK31). Для каждого маркера были выявлены аллельные варианты в изученной группе рода *Aegilops L.* Установлено, что из 6 проанализированных маркеров 4 оказались информативными и полиморфными и они могут быть использованы в дальнейшем при сравнительных исследованиях других казахстанских популяций рода *Aegilops L.* Определено среднее число аллелей, которое составило 2,75. Наиболее информативными оказались маркеры PK5 и PK31, для них было показано наличие 4-х и 3-х аллельных вариантов в изученной группе, соответственно.

На основе результатов микросателлитного анализа были построены филогенетические древа для каждого вида в отдельности и для всех изученных образцов в целом так же, были просчитаны генетические дистанции между изученными популяциями.

Для вида *Ae. tauschii* показано прямое распределение популяций на древе в зависимости от района их происхождения.

Для вида *Ae. cylindrica* установлено распределение популяций Алматинской области и ЮКО в отдельные ветви, а для популяций Жамбылской области промежуточное распределение между ними.

Результаты молекулярно-генетического анализа будут использованы для создания банка геномной ДНК видов рода *Aegilops L.*, в целях долгосрочного *ex situ* хранения. Результаты филогенетического анализа могут быть использованы при разработке стратегий сбора и хранения гермоплазмы видов рода *Aegilops L.*

Источник финансирования исследований – Исследования выполнены в рамках проекта № 0792/ГФ-4 МОН РК.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Гочаров Н.П., Кодратенко Е.А., Храброва М.А., Коновалов А.А., Лайкова Л.И., Блинов А.Г., Головнина К.А., Глушков С.А. (2008) Рукотворные виды – источник расширения биоразнообразия пшениц. *Agromeridian*. №3 (4). С.86-91.
- [2] Абдулина С.А. Список сосудистых растений Казахстана. Алма-Ата.: 1998. 186с.
- [3] Dvorak J., Zhang HB. (1990) Variation in repeated nucleotide sequences shed light on the phylogeny on the wheat B and G genomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* N87. P.9644-9649.
- [4] Peng J.H., Fahima T., Roder M.S., Huang Q.Y., Dahan A. *et al.* (2000) High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance gene *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum diccooides*. *Genetica*. V.109. P. 199-210.
- [5] Волкова Г.В., Анпилогова Л.К., Алексеева Г.П., Андропова А.Е., Кремнева О.Ю. и др. (2009) Поиск сортообразцов пшеницы с групповой устойчивостью и их практическое использование. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. СПб.: ВИР. Т.166. С.33-40.
- [6] Mansur L.M., Konzak C.F., Grama A., Gerechter-Amitai Z., Blum A. (1986) Quantitative variation in the kernel proteins among 841 accessions of *Triticum diccooides* estimated by SDS-PAGE. *Theor. Appl. Genet.* V.72. P. 296-301.
- [7] Авсенин В.И., Мощный И.И., Рыбалка А.И., ФайтВ.И. (2003) Гибриды *Aegilops cylindrica* Host с *Triticum durum* Desf. и *T. aestivum* L. Цитология и генетика. Т. 37. № 1. С. 11-17.
- [8] Есимбекова М.А., Ситпаева Г.Т., Кожахметов К.К., Моргунов А.И., Карабаев М.К. (2004) Агробиоразнообразие сельскохозяйственных культур Казахстана: дикие виды и дикорастущие сородичи. Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и семеноводству. СИММИТ, ГТЦ. № 3 (9). С. 38-41.
- [9] Bhandopadhyay R., Sharma Sh., Rustgi S., Singh R, Kumar A., Balyan H. S., Gupta P. K. (2004) DNA polymorphism among 18 species of *Triticum-Aegilops* complex using wheat EST-SSRs. *Plant Science*. N. 166. P. 349-356.

REFERENCES

- [1] Gocharov NP., Kondratenco EA., Khrabrova MA., Konovalov AA., Laikova LI., Blinov AG., Golovina KA., Glushkov SA. (2008) Man-made types - source extension wheat biodiversity. *Agromeridian*.-2008.- №3,4.-P.86-91.
- [2] Abdullina SA. List of vascular plants in Kazakhstan. Alma-Ata.: 1998. 186p.Abdullina S.A. Spisok sosudistyh rastenij Kazakhstana. Alma – Ata.: 1998. 186p.
- [3] Dvorak J., Zhang HB. (1990) Variation in repeated nucleotide sequences shed light on the phylogeny on the wheat B and G genomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* N87. P.9644-9649.
- [4] Peng JH., Fahima T., Roder MS., Huang QY., Dahan A. *et al.* (2000) High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance gene *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum diccooides*. *Genetica*. 2000. V.109. P. 199-210.
- [5] Volkova GV., Antilogova LK., Alekseeva GP., Andronova AE., Kremneva OY. *et al.* (2009) Screening wheat varieties with group sustainability and their practical use. Proceedings of applied botany, genetics and breeding. St. Petersburg.: VIR. Vol. 166. P.33-40.
- [6] Mansur L.M., Konzak C.F., Grama A., Gerechter-Amitai Z., Blum A. Quantitative variation in the kernel proteins among 841 accessions of *Triticum diccooides* estimated by SDS-PAGE *Theor. Appl. Genet.* - 1986.-V.72.-P. 296-301.
- [7] Avsenin VI., Motsny II., Rybalka AI., Fait VI. (2003) *Aegilops cylindrica* Host. hybrids with *Triticum durum* Desf. and *T.aestivum* L. Vol. 37. No.1. P.11-17
- [8] Esimbekova MA., Sitpaeva GT., Kozhahmetov KK., Morgunov AI., Karabayev MK. (2004) Agrobiodiversity crops Kazakhstan: wild species and wild relatives. Bulletin of the regional network for the implementation of wheat seed. SIMMIT. № 3 (9). P. 38-41.
- [9] BhandopadhyayR., Sharma Sh., Rustgi S., Singh R, Kumar A., Balyan H. S., Gupta P. K. (2004) DNA polymorphism among 18 species of *Triticum-Aegilops* complex using wheat EST-SSRs. *Plant Science*. N. 166. P. 349-356.

А.П. Чиркин¹, М.А. Есимбекова², К.Б. Мукин², Г.А. Исмағұлова¹

¹Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігінің ғылым комитетінің РМК «М.А. Айтхожин атындағы молекулярлы биология және биохимия институты», Алматы қ., Қазақстан, chirkin_a@mail.ru

²ҚР Ауыл шаруашылығы министрлігі, ЖШС «Егін және өсімдік шаруашылығы Қазақ институты», Алмалыбақ, Қазақстан, minura.esimbekova@mail.ru

**ОҢТҮСТІК ЖӘНЕ ОҢТҮСТІК-ШЫҒЫС ҚАЗАҚСТАНДЫҚ
AEGILOPS CYLINDRICA ЖӘНЕ *AEGILOPS TAUSCHII* ПОПУЛЯЦИЯЛАРЫНЫҢ
ФИЛОГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУЫ**

Аннотация. Ауыл шаруашылық дақылдарының биологиялық алуантүрлілігінің елеулі тарылуы олардың генетикалық әлеуетінің қысқаруына байланысты (гендер немесе аллелдерінің жоғалуы). Осыған байланысты қазіргі заманғы сорттарын бұдандастыру үшін бағалы генетикалық материал ретінде жабайы түрлердің зерттеу мен сақтау өзектілігі өсіп жатыр. *Aegilops L.* түрінің 51 жергілікті және шетелдік экотиптерінің молекулярлық-генетикалық талдау жүргізілді. Микросателлитті талдау нәтижелері бойынша жеке-жеке және тұтастай алғанда барлық үлгілері үшін және әрбір түрі үшін филогенетикалық шежірелері құрастырылған. Зерттелген популяциялар арасында генетикалық қашықтықтары саналды. *Ae. tauschii.* түрі үшін шыққан аймағына байланысты шежіреде популяцияның тікелей таратылуы көрсетілген. *Ae. cylindrica* түрі үшін Алматы облысы және СҚО популяцияларының жеке тармақтарына тікелей таралуы және Жамбыл облысы популяциялары арасында аралық таралуы анықталған.

Түйін сөздер: *Aegilops L.* туысы, популяция, аллелді нұсқасы, гетерогенділік, филогенетикалық талдау, генетикалық ара-қашықтық.

Сведения об авторах

Чиркин Александр Петрович - РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» старший научный сотрудник, раб. тел. 293 71 74, chirkin_a@mail.ru;

Есимбекова Минура Ахметовна - ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства» заведующий отделом, minura.esimbekova@mail.ru;

Мукин Кадыржан Бакитжанович - ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства» заведующий отделом, mukin2010@mail.ru;

Исмағұлова Гульнара Акимжановна - РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», заведующий лабораторией, i_gulnara@mail.ru