



Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
Experimental and Theoretical articles

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4 (60), 2008

ԴՆԹ ՄԱՐԿԵՐՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ՄՇԱԿԱԲՈՒՑՄԵՐԻ ՎԱՅՐԻ
ՑԵՂԱԿԻՑՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԲԱԶՄԱԶԱՆՈՒԹՅԱՆ ԵՎ
ՍԵԼԵԿՑԻՈՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԻ ԳՆԱՀԱՏՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ն.Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ¹, Է. Մ. ԴՈՒԼՈՒ², Ա.Հ. ԵՍԱՅԱՆ¹, Կ.Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ¹,
Ս. ՌՈԶԵՐ³, Հ. ԿՆՈՌՈՒՊՅԵՐ³, Ա. ԱՄՐԻ⁴, Ա.Մ. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ⁵

¹Երևանի պետական համալսարան, կենսաբանության ֆակուլտետ, Էկոլոգիայի և
բնության պահպանության ամբիոն, E-mail: bionellibiotech@yahoo.com,
ayesayan@ysu.am,

²Bioversity International, Italy,

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Germany,

⁴International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Syrian Arab Republic,

⁵UNEP/GEF մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների պահպանության ծրագիր, ՀՀ:

Օպտիմացվել է ցորենի ծիլերից գենոմային ԴՆԹ-ի անջատման CTAB
մեթոդը: Ամպլիֆիկացվել են երկու STS ԴՆԹ մարկերներին համապատասխա-
նող հատվածներ՝ ցորենի տարբեր պոպուլյացիաների գենոմային ԴՆԹ-ից:
Ամպլիֆիկացված մարկերային հատվածների չափերն են՝ *Pm 1* – 420 գ.ն.,
Pm 2 – 600 գ.ն.:

Այրացողի նկատմամբ կայունության *Pm 1* գենի մարկերը հայտնաբերվել
է վայրի ցորենների բոլոր ուսումնասիրված պոպուլյացիաներում: *Pm 2* գենի
մարկերն հայտնաբերվել է *Triticum urartu* – ի երեք և *T. boeoticum*–ի չորս
պոպուլյացիաներում: *Pm 1* և *Pm 2* գենների մարկերների առկայությունը
հաստատվել է ցորենի “Բեզոստայա 1” հեքսապլոիդ սորտով: Ցորենի D տիպի
գենոմին բնորոշ *Pm 2* գենի STS մարկերը հայտնաբերվել է նաև A տիպի
գենոմային ցորենների պոպուլյացիաներում: Ստացված արդյունքները
հաստատում են, որ հետազոտված *Pm 2* գենի մարկերը օժտված չէ
բրոմոսոմային սպեցիֆիկությամբ:

ԴՆԹ մարկերներ- *Triticum boeoticum* - *Triticum urartu*
– պոլիմերազային շղթայական ռեակցիա - այրացող

Оптимизированы протоколы для выделения общей геномной ДНК из
проростков пшеницы. Продукты, соответствующие двум STS маркерам генов
болезнеустойчивости успешно амплифицированы с ДНК исследуемых
популяций. Размеры маркерных фрагментов: *Pm 1* - 420 н.п., *Pm 2* – 600 н.п.

Маркер гена болезнеустойчивости к мучнистой росе *Pm 1* обнаружен во
всех исследуемых популяциях. Маркер гена *Pm 2* идентифицирован в трех
популяциях *Triticum urartu* и четырех популяциях *T. boeoticum*. Наличие
маркеров генов *Pm 1* и *Pm 2* подтверждены сортом гексаплоидной пшеницы
"Безостая 1". STS маркеры гена *Pm 2*, характерные для пшениц с геномом типа
D идентифицированы и в A геномных популяциях дикой пшеницы.
Полученные результаты доказывают, что маркеры гена *Pm 2* не обладают
хромосомной специфичностью.

ДНК маркеры – *Triticum boeoticum*- *Triticum urartu* – полимеразная
цепная реакция – мучнистая роса

The protocols for total DNA extraction from wheat young seedlings were optimized. Products corresponding to two STS markers of resistance gene were amplified successfully from DNA of accessions studied. The sizes of marker fragments were: Pm 1 -420 bp, Pm 2-600 bp.

A marker of resistance gene *Pm 1* to powdery mildew was found in all studied accessions, was confirmed in “Bezostaya 1”. Markers for gene *Pm 2* was identified in three accessions of *Triticum urartu* and *T. boeoticum*. STS marker for gene *Pm 2* which is specific for D genomes have been identified in populations of wild wheat with A genomes. The results obtained have proved that markers for gene *Pm2* aren't tightly linked with chromosomes.

DNA markers – Triticum boeoticum- Triticum urartu – polymerase chain reaction - powdery mildew

Հայաստանի տարածքը հանդիսանում է մշակաբույսերի ծագման Առաջավորասիական կենտրոնի մի մասը: Համաձայն Մ.Պ. Ժուկովսկու [2] Առաջավորասիական գենկենտրոնը հանդիսանում է խաղողի, խնձորի, ծիրանի, տանձի, թզի և այլ լայնորեն տարածված մշակաբույսերի հայրենիքը: Այստեղ է կենտրոնացված եվրոպական պտղաբուծության համաշխարհային պոտենցիալը: Բացի այդ այս գենկենտրոնը հանդիսանում է հացազգիների ծագման կենտրոն, որտեղ աճում են միահատիկ և հեքսապլոիդ ցորենները, կենտրոնացված են ցորենների էնդեմիկ տեսակները: Դրանք օժտված են ժանգասնկի, ալրացողի և այլ լայնորեն տարածված հիվանդությունների նկատմամբ կայունությամբ և ունեն բացառիկ նշանակություն սելեկցիոն աշխատանքների համար:

Հայաստանում, մասնավորապես “Էրեբունի” արգելոցի տարածքում կենտրոնացված են աշխարհում գոյություն ունեցող ցորենների չորս վայրի տեսակներից երեքը, որոնք բնորոշվում են բարձր ներտեսակային գենետիկական բազմազանությամբ [1] և մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում սելեկցիոն աշխատանքների համար:

Ցորենի վայրի ցեղակիցներից շատերն չորադիմացկուն են, ինչը խիստ կարևոր սելեկցիոն հատկանիշ է Հայաստանի չորային և կիսաանապատային կլիմային հարմարվելու համար: Մյուսներն օժտված են հիվանդությունների նկատմամբ կայունությամբ և կարող են նյութ ծառայել սելեկցիոն ծրագրերի համար՝ եղած սորտերի կատարելագործման կամ նորերի ստացման նպատակով:

Տարբեր մշակաբույսերի, այդ թվում նաև ցորենի վայրի ցեղակիցների կիրառումը նոր կատարելագործված սորտերի ստացման նպատակով հանդիսանում է կարևորագույն ուղղություններից մեկը այն զիտական կենտրոնների համար, որտեղ իրականացվում են սելեկցիոն աշխատանքներ:

Չափազանց կարևոր է նաև մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների պահպանությունը վերջիններիս ծագման և տեսակային բազմազանության կենտրոններում: Նշված տարածքներում կենսաբազմազանության պահպանության ռազմավարության ծրագրերի մշակման ժամանակ պետք է անպայման հաշվի առնվի այնտեղ աճող մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների սելեկցիոն պոտենցիալը և պահպանության ավանդական ձևերի հետ մեկտեղ կիրառվեն նոր մեթոդներ, ինչպիսին են սերմերի, սաղմերի ԴՆԹ, կալուսային հյուսվածքների և մեկուսացված օրգանների կրիոպահպանումը և այլն:

Ալրացողը հանդիսանում է աշխարհում ցորենի ամենատարածված սնկային հիվանդություններից մեկը և բերում է բերքատվության կտրուկ նվազեցման [17]: Այս հիվանդության նկատմամբ կայուն սորտերի ստացումը հանդիսանում է ալրացողի տարածումը կանխարգելող տնտեսապես արդյունավետ և շրջակա միջավայրի համար անվտանգ եղանակ: Հայտնի է, որ *Triticum* և *Aegilops* ցեղի տեսակները և մշակովի ցորենը (*Triticum aestivum* L.)

ունեն հոմոլոգ գենոմներ: Այրացողի նկատմամբ կայունության գեները հայտնաբերված են կարգաբանորեն մոտ կանգնած բազմաթիվ տեսակների մոտ: Այդ գեներից որոշներն արդեն հաջողությամբ կիրառվել են ցորենի նոր կայուն սորտերի ստացման համար [5]: Ցորենի սելեկցիայի նշված ուղղությունը մեծ նշանակություն ունի գյուղատնտեսության համակարգում սննդի անվտանգության ապահովման համար:

Triticum boeoticum Boiss. ունի AbAb տիպի գենոմ և հայտնի է որպես հիվանդությունների նկատմամբ կայունության գեների պոտենցիալ աղբյուր [3,4,6]: *Triticum urartu* տեսակը ևս հանդիսանում է A տիպի գենոմի կրող, սակայն մինչ օրս չկան բավարար տվյալներ նրա սելեկցոն պոտենցիալի մասին:

Ներկայումս RAPDs (random amplified polymorphic DNAs), SSRs (simple sequence repeats), և STSs (sequence-tagged sites) ԴՆԹ մարկերները լայն տարածում են գտել ինչպես մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների սելեկցոն պոտենցիալի, այնպես էլ գենետիկական բազմազանության, պոպուլյացիաների գենետիկական էրոզիայի մակարդակի ուսումնասիրման և վերջիններիս պահպանության ռազմավարության մշակման ծրագրերում:

Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է այրացողի՝ *Erysiphe graminis*-ի նկատմամբ կայունության գեների հայտնաբերումը ԴՆԹ STS մարկերների կիրառմամբ *T. boeoticum* և *T. urartu* մշակովի ցորենների վայրի ցեղակիցների պոպուլյացիաներում:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրվել է *T. boeoticum* և *T. urartu* վայրի ցորենների 10 պոպուլյացիա: Հետազոտության համար սերմերը ստացվել են "Էրեբունի" արգելոցի տարածքից, Երևանի պետական ագրարային համալսարանի, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (Aleppo, Syria) և Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (Gatersleben, Germany) գենետիկական բանկերից (աղյուսակ 1):

Աղյուսակ 1. Ուսումնասիրված *Triticum boeoticum* և *Triticum urartu* պոպուլյացիաները

NN	Տեսակ-սորտ	Սերմերի հավաքման վայր	Պոպուլյացիաների կոդեր և համարներ՝ IPK (TRI), ICARDA (IG)
1	Սորտ "Bezostaya 1" (ստուգիչ)	Երևանի պետական ագրարային համալսարան	-
2	<i>Triticum boeoticum</i>	Հայաստան (Էրեբունի արգելոց)	-
3	<i>T. boeoticum</i>	Հայաստան (Երևան)	IG126246
4	<i>T. boeoticum</i>	Հայաստան (Եղեգնաձոր)	-
5	<i>T. boeoticum</i>	Հայաստան (Կոտայք)	IG 44938
6	<i>T. boeoticum</i>	Հայաստան (Արարատ)	IG126286
7	<i>T. boeoticum</i>	Հայաստան (Վայոց Ձոր)	IG 137411
8	<i>Triticum urartu</i>	Իրաք (Նեյնևա)	IG 109084
9	<i>T. urartu</i>	Իրան (Արևմտյան Ադրբեջան)	IG 45777
10	<i>T. urartu</i>	Թուրքիա (Ղազիանթեպ)	IG 116203
11	<i>T. urartu</i>	Հայաստան	TRI6735

ԴՆԹ-ի անջատումը: Ուսումնասիրվող ցորենների սերմերը ծլեցվել են 5 օրվա ընթացքում: Երիտասարդ ծիլերից ԴՆԹ-ն անջատվել է մեր կողմից ձևափոխված CTAB մեթոդով [7]. CTAB բուֆերի կազմի մեջ ավելացվել է 0,1 գ/մլ ակտիվացված ածուխ: Անջատված ԴՆԹ պահվել է սառնարանում – 20 ° պայմաններում:

Պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի և հել էլեկտրոֆորեզի անցկանումը: ՊՇՈ-ի յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ ավելացվել է 0,1 մլլ Taq պոլիմերազ (Gatersleben, Genomzentrum կամ Evrogen, Russia), 2,5 մլլ ՊՇՈ բուֆեր, 8 պիկոմոլ աջ և ձախ պրայմերներ (Gatersleben, Genomzentrum կամ Evrogen, Russia) (աղյուսակ 2), 2,5 մմոլ նուկլեոտիդներ և մոտավորապես 50 նգ հետազոտվող ԴՆԹ: Պոլիմերազային շղթայական ռեակցիան անցկացվել է Biokom PCR ամպլիֆիկատորում: Յուրաքանչյուր պրայմերի համար օպտիմիզացվել է ամպլիֆիկացման ծրագիր, որը ներկայացված է աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 2. *Triticum boeoticum* և *Triticum urartu* պոպուլյացիաների ուսումնասիրման համար կիրառված մարկերները

Գեն	Գենի STS մարկեր	Մարկերների նուկլեոտիդային հաջորդականությունը 5'-3'	Գրականության աղբյուր
<i>Pm 1</i>	C320-1 C320-2	fwd: CCG GCA TAG ATC GAG AAT AG rev: CCG GCA TAG AAC TTT AAG CG	Hu et al. 1997
<i>Pm 2</i>	Whs 350-1 Whs 350-2	fwd: AGC TGT TTG GGT ACA AGG TG rev: TCC CCT GTG CTA CTA CTT CTC	Mohler, Jahoor. 1996

Աղյուսակ 3. ՊՇՈ-ի ծրագրերը երկու պրայմերների համար

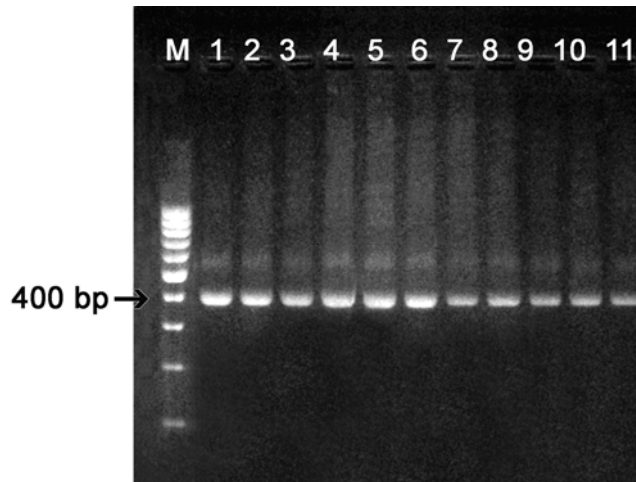
Գեն	ՊՇՈ ծրագրերը
<i>Pm 1</i>	94 ° - 4ր, (94 ° - 1ր, 60 ° - 1ր.30վ, 72 ° - 2ր) 35 ցիկլ, 72° - 5ր
<i>Pm 2</i>	94 ° - 4ր, (94 ° -1ր, 60 ° - 2ր, 72 ° - 1ր) 35 ցիկլ, 72° - 5ր

ՊՇՈ-ի արդյունքները բաժանվել են հորիզոնական ժել էլեկտրաֆորեզի եղանակով: ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզը կատարվել է 2%-ոց ագարոզային ժելում TBE-բուֆերում (Տրիս 89 մՄ; 89 մՄ բորաթթու; 2 մՄ EDTA, pH ≈ 8,3; 0,5 մկգ/մլ ֆլուորեսցենտային ներկ էթիդիում բրոմիդ), 200 Վ էլեկտրական դաշտի լարվածության պայմաններում 1 ժ ընթացքում: Էլեկտրաֆորեզը անցկացնելուց հետո ժելի թվային լուսանկարը մշակվել և ուսումնասիրվել է համակարգչային E-Editor (Invitrogen) ծրագրով:

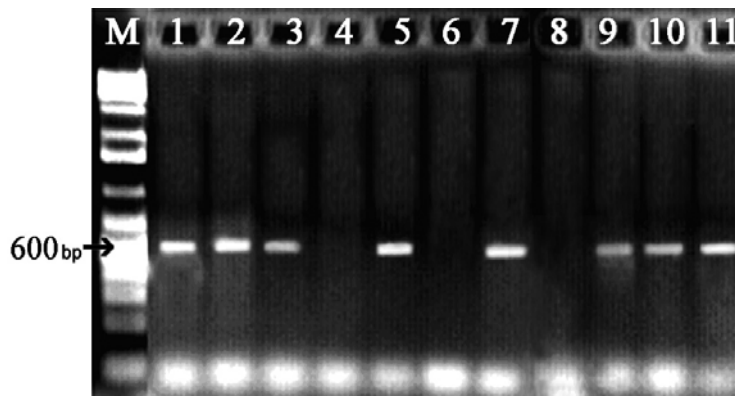
Արդյունքներ և քննարկում: Օպտիմացվել են ցորենների ծիլերից ԴՆԹ-ի արդյունավետ անջատման եղանակը: CTAB բուֆերի մեջ ակտիվացված ածխի ավելացումը նվազեցրել է ԴՆԹ – ի օքսիդացիոն քայքայումը, ինչի արդյունքում ավելացել է չվնասված գենոմային ԴՆԹ-ի ելքը:

Ամպլիֆիկացվել են այրացողի նկատմամբ կայունության գեներին համապատասխանող երկու STS մարկերներ՝ հետազոտվող *T. boeoticum* և *T. urartu* պոպուլյացիաների ԴՆԹ-ներից: Ստացված մարկերային հատվածների չափերն են՝ *Pm1* - 400 գ.ն., *Pm2* – 598 գ.ն.:

Pm1 գենի մարկերը, որը պայմանավորում է այրացողի նկատմամբ կայունությունը, հայտնաբերվել է ուսումնասիրված բոլոր պոպուլյացիաներում և հաստատվել է հեքսապլոիդ "Բեզոստայա 1" սորտով, որն օգտագործվել է որպես դրական ստուգիչ (նկ.1): *Pm2* գենի մարկերը հայտնաբերվել է *T. urartu* – ի երեք և *T. boeoticum* – ի չորս պոպուլյացիաներում (նկ. 2): *Pm2* մարկերի առկայությունը ևս հաստատվել է հեքսապլոիդ "Բեզոստայա 1" սորտով:



Նկ.1. *T. boeoticum* և *T.urartu* պոպուլյացիաներում (աղյուսակ 1) *Pm 1* գենի STS մարկերները,
M - լադեր՝ 100 ն.գ.– (Fermentas)



Նկ. 2. *T. boeoticum* և *T.urartu* պոպուլյացիաներում (աղյուսակ 1) *Pm 2* գենի STS մարկերները,
M - լադեր՝ 100 ն.գ.– (Fermentas)

Գրականության տվյալներից հայտնի է, որ այն պոպուլյացիաները, որոնք կրում են միայն *Pm1* գենը ալրացողի նկատմամբ օժտված չեն բարձր կայունությամբ, իսկ այն պոպուլյացիաները, որոնք կրում են և *Pm1*, և՛ *Pm2* գենները ալրացողի նկատմամբ օժտված են բարձր կայունությամբ [18,19]: Այս արդյունքները հիմք են տալիս եզրակացնելու, որ *Pm1* գենը ալրացողի նկատմամբ կայունության ապահովման համար խիստ սպեցիֆիկ չէ:

Pm1 գենը տեղակայված է 7A քրոմոսոմի վրա, իսկ *Pm2* գենը՝ 5D քրոմոսոմի վրա [15, 10, 13]: Մեր հետազոտություններում ցորենի D տիպի գենոմին բնորոշ *Pm2* գենի STS մարկերը հայտնաբերվել է նաև A տիպի գենոմային ցորենների պոպուլյացիաներում: Նմանատիպ արդյունքներ նկարագրված են գրականության մեջ [11,19]: Ստացված արդյունքները հաստատում են, որ հետազոտված *Pm 2* գենի մարկերը օժտված չէ քրոմոսոմային սպեցիֆիկությամբ:

Հետաքրքրական է, որ այս երկու գենների մարկերները հայտնաբերված են ուրարտական ցորենի պոպուլյացիաներում: Այս փաստը հաստատում է ուրարտական ցորենի պոպուլյացիաների հետագա մոլեկուլային գենետիկական ուսումնասիրությունների անհրաժեշտությունը:

ԴՆԹ մարկերների կիրառումը լայն հնարավորություններ է տալիս մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների պոպուլյացիաներում հայտնաբերել հիվանդությունների նկատմամբ կայունության և քրոմոսոմային սպեցիֆիկությամբ նկարագրվող R գեներ: ԴՆԹ մարկերների արդյունավետ կիրառման համար անհրաժեշտ է տարբեր գենետիկական մակարդակներում հաստատել դրանց գենոմային սպեցիֆիկությունը և հիվանդության նկատմամբ կայունության ապահովման մեջ դրանց դերը՝ մասնավորապես հեքսապլոիդ բարդ գենոմներով ցորենների դեպքում: Այս հետազոտությունները մեծ կարևորություն ունեն նաև մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների սելեկցիոն պոտենցիալի գնահատման, կայուն պահպանության և կառավարման ճիշտ ռազմավարությունների մշակման համար [9,8,14]: Կատարված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս ԴՆԹ STS մարկերների կիրառելիությունը վայրի ցորենների պոպուլյացիաների մոլեկուլային գենետիկական ուսումնասիրությունների համար:

Հետազոտությունները կատարվել են “IFAR fellowship program” և UNEP/GEF “Մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների պահպանության” ծրագրերի ֆինանսական աջակցությամբ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Гандилян П.А., Авакян В.А., “Эребунийский заповедник”, Ереван, 2001.
2. Жуковский П.М., “Культурные растения и их сородичи”, Л. “Колос”, 1971.
3. Anker C.C., Niks. Euphytica. 117: 3–12. 2001.
4. Bahrai S., Jaradat A.A., Jaradat A. A.1998. III. In: Proc. 3rd Int. Triticeae Symp., Aleppo, Syria, 4–8 May. 237–243. 1997.
5. Bennet F.G. Plant Pathol., 33: 279–300. 1984.
6. Cenci A., D’ovidio R., Tanzarella O.A., Ceoloni C., Porceddu E. Theor. Appl. Genet. 98: 448–454. 1999.
7. Doyle J., Doyle J. Focus 12 : 13– 15. 1990.
8. Eujayl, I., Sorrells, M.E., Baum, M., Wolters, P. and Powell, W. Theor. Appl. Genet. 104:399–407. 2002.
9. Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. 1996. Euphytica 91: 59–87.
10. Gao, L.F., Jing, R.L., Huo, N.X., Li, Y., Li, X.P., Zhou, R.H., Chang, X.P., Tang, J.F., Ma, Z.Y., Jia, J.Z. Theor. Appl. Genet. 108:1392–1400. 2004.
11. Gupta, P.K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N. and Balyan, H.S. Mol. Gen. Genomics. 270:315–323. 2003.
12. Hovhanisyan N.A., Yesayan A.G. Application of STS markers to detect disease resistance genes in wild accessions of *Triticum boeoticum* in Armenia, XXXVIII ESNA Annual meeting, Krakow, Poland, p.161, 2008.
13. Hu X.Y., Ohm H.W., Dweikat. Theor. Appl. Genet. 94:832–840. 1997.
14. Leigh, F., Lea, V., Law, J., Wolters, P., Powell, W. and Donini, P. Euphytica 133:359–366. 2003.
15. McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. Proc. 9th Intern. Wheat Genet. Symp., Saskatchewan, Canada:5: 235. 1998.
16. Mohler V., Jahoor A. Theor. Appl. Genet. 93:1078–1082. 1996.
17. Priestley R.H., Bayles R. A. Oxford: 53–65. 1998.
18. Sourdille, P., Tavaud, M., Charmet, G., Bernard, M. Theor. Appl. Genet. 103:346–352. 2001.
19. Stpeien L. J. et al. Appl. Genet. 40: 317–334. 2001.

Ստացվել է 28.12.2008