

Научная статья  
УДК 575.174.015.3  
doi: 10.28983/asj.y2023i6pp46-50

### Выявление эффективных праймеров для сортов озимой ржи *Secale cereale* L.

Виктория Андреевна Печенкина<sup>1</sup>, Анастасия Ивановна Вшивкова<sup>1</sup>,  
Илья Алексеевич Тарбеев<sup>1</sup>, Римма Ивановна Вяткина<sup>2</sup>, Константин Артурович Марон<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), г. Пермь, Россия  
e-mail: p\_viktoria2@mail.ru

<sup>2</sup>Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (Пермский НИИСХ – филиал ПФИЦ УрО РАН), Пермский край, с. Лобаново, Россия, e-mail: 777vyatkina@mail.ru

<sup>3</sup>Уральский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (Уральский НИИСХ – филиал ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), г. Екатеринбург, пос. Исток, Россия, e-mail: kabyr@mail.ru

**Аннотация.** Рожь озимая (*Secale cereale* L.) является важной продовольственной культурой России. Изучение генетического разнообразия зерновых культур проводится с использованием молекулярных маркеров. Для определения полиморфизма ДНК был использован метод выявления эффективных праймеров ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). ISSR-праймеры отбирались по следующим параметрам: 1) наибольшее число полиморфных фрагментов ДНК; 2) четкая амплификация; 3) воспроизводимость при повторных ПЦР. Всего проанализировано 22 ISSR-праймера с тотальной ДНК *S. cereale*. Из них высокую эффективность продемонстрировали пять ISSR-праймеров для изученных пяти озимых сортов ржи посевной. Для молекулярно-генетического анализа *S. cereale* были отобраны следующие четыре динуклеотидных ISSR-праймера (M1 (AC)8CG, ISSR-5 (AG)8CA, CR-215 (CT)6TG, CR-218 (GA)6CC) и один тринуклеотидный ISSR-праймер X10 (AGC)6C. Выявленные ISSR-праймеры позволят определить генетическое разнообразие сортов озимой ржи, выращиваемых в условиях Среднего Урала.

**Ключевые слова:** эффективные ISSR-праймеры; межмикросателлитный анализ; маркеры; озимые сорта; *Secale cereale* L.

**Для цитирования:** Печенкина В. А., Вшивкова А. И., Тарбеев И. А., Вяткина Р. И., Марон К. А. Выявление эффективных праймеров для сортов озимой ржи *Secale cereale* L. // Аграрный научный журнал. 2023. № 6. С. 46–50. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2023i6pp46-50>.

### AGRONOMY

Original article

### Identification of effective primers for varieties of winter rye *Secale cereals* L.

Victoria A. Pechenkina<sup>1</sup>, Anastasia I. Vshivkova<sup>1</sup>, Ilya A. Tarbeev<sup>1</sup>,  
Rimma I. Vyatkina<sup>2</sup>, Konstantin A. Maron<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia, e-mail: p\_viktoria2@mail.ru

<sup>2</sup>Perm Agriculture Institute of Russian Academy of Sciences PFIC UrB RAS, Perm region, with. Lobanovoy, Russia, e-mail: 777vyatkina@mail.ru

<sup>3</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution «Ural Federal Agrarian Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences», Yekaterinburg, v. Istok, Russia, e-mail: kabyr@mail.ru

**Abstract.** Rye (*Secale cereale* L.) is important food crop in Russia. The study of the genetic diversity of crops is carried out using molecular markers. To identify effective primers, ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), a method for determining DNA polymorphism, was used. The selection of ISSR primers was carried out according to the largest number of polymorphic DNA fragments, their clear amplification and reproducibility in repeated PCR. Of the 22 analyzed ISSR primers with the total DNA of *S. cereale*, 5 ISSR primers demonstrated high ef-



iciency for the studied 5 winter rye varieties. For further molecular genetic analysis of *S. cereale*, the following four dinucleotide ISSR primers (M1 (AC)<sub>8</sub>CG, ISSR-5 (AG)<sub>8</sub>CA, CR-215 (CT)<sub>6</sub>TG, CR-218 (GA)<sub>6</sub>CC) and one trinucleotide ISSR primer X10 (AGC)<sub>6</sub>C. The identified ISSR primers will make it possible to determine the genetic diversity of winter rye varieties grown in the conditions of the Middle Urals.

**Keywords:** effective ISSR-PCR primers; intermicrosatellite analysis; markers; winter varieties; *Secale cereale* L.

**For citation:** Pechenkina V. A., Vshivkova A. I., Tarbeev I. A., Vyatkina R. I., Maron K. A. Identification of effective primers for varieties of winter rye *Secale cereale* L. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = The Agrarian Scientific Journal. 2023;(6):46–50. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2023i6pp46-50>.

**Введение.** Рожь посевная (*Secale cereale* L., сем. Poaceae) является важной продовольственной культурой России. По данным Росстата, за 2019–2021 гг. посевные площади ржи озимой выросли на 185 тыс. га и составили 1033 тыс. га [11]. В норме валовой сбор зерна ржи посевной должен быть не менее 100 кг ржи посевной на 1 человека в год [2]. Следовательно, на территории Российской Федерации для обеспечения населения необходимо производить 15 млн т зерна ржи посевной ежегодно. За 2021 г. было произведено 1,7 млн т зерна ржи посевной, что недостаточно для обеспечения населения [11].

Гибкость по ареалу распространения – одно из преимуществ ржи посевной, поэтому она рекомендована для выращивания в регионах со сложными природно-климатическими условиями [9]. Для создания новых сортов *S. cereale* необходимы дополнительные селекционные труды в составе современных программ селекции зерновых культур. К таким трудам относят новые стратегии исследований генетических ресурсов для направленного использования генетического разнообразия [5]. Для ускорения и увеличения точности селекционного отбора у зерновых культур используют последние достижения геномных технологий.

Подбор высокоэффективных для изучения генетического разнообразия праймеров – важный этап молекулярно-генетического анализа, поскольку праймеры являются неотъемлемым компонентом ПЦР и специфичность амплификации зависит именно от них. В основе ISSR-анализа (Inter Simple Sequence Repeats) лежит следующее: многие гены окружены микросателлитными последовательностями, что позволяет использовать их как якорные при подборе праймеров к этим генам [8]. В числе приоритетных направлений исследований – изучение ISSR-PCR маркеров, генетических ресурсов устойчивости зерновых культур к засухе, низкотемпературному и осмотическому стрессам, а также качества и продуктивности зерна [5].

Цель данной работы – подбор эффективных ISSR-праймеров для выявления генетического разнообразия озимых сортов *S. cereale*.

**Методика исследований.** В 2022 г. собрано 450 образцов листьев 5 озимых сортов ржи посевной (Алиса, Вятка 2, Ника, Паром, Янтарная), из которых 250 образцов листьев – на опытном поле Пермского НИИСХ и 200 образцов листьев – на опытном поле Уральского НИИСХ. Пробы ДНК *S. cereale* выделены из листьев ржи посевной, собранных во время генеративного периода. Подбор праймеров проводили с использованием выборки из 30 проб ДНК для каждого ISSR-праймера. С тотальной ДНК *S. cereale* всего было проанализировано 22 ISSR-праймера.

Выделение ДНК осуществляли в соответствии с методом СТАВ, с модификацией сорбирующего вещества [6,14]. ДНК выделяли из 20 мг растительного материала (листьев *S. cereale*) каждого образца. Концентрацию и качество ДНК определяли стандартным методом [12].

Эффективность ISSR-праймеров устанавливали с помощью межмикросателлитного анализа с использованием ПЦР [16]. Выбор эффективных ISSR-праймеров проводили в соответствии со следующими параметрами: выявление наибольшего числа четко амплифицируемых фрагментов ДНК, а также повторяемости результатов ПЦР [6]. Эффективность праймеров рассчитывали в соответствии с 5-балльной шкалой (1 – низкая, 5 – высокая) [3].

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции занимала объем 10 мкл. В состав реакционной смеси входили: стандартный 1× буфер для ПЦР, 1 ед. Tag-полимеразы, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> («Силекс М», Россия); 1 μM праймеров («Евроген», Россия); смесь дезоксинуклеотидов, 0,25 mM каждого (Fermentas, Литва); 20 нг ДНК *S. cereale*.





ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini-Cycler (Bio-Rad, USA). Для увеличения числа копий ДНК каждого образца *S. cereale* ISSR-методом использовали стандартную программу ПЦР [6]. Поскольку температура отжига подбирается в зависимости от нуклеотидного состава праймера, она варьировала от 56 до 64 °С. Стандартный отрицательный контроль (К-) использовали для проверки чистоты реагентов [12]. Обнаружение продуктов амплификации проводили методом гель-электрофореза в боратном буфере. Краситель бромистый этидий использовали для окрашивания продуктов ПЦР. Результаты электрофореза фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Определение длин фрагментов ДНК проводили с использованием программы Image Lab (Bio-Rad, USA).

**Результаты исследований.** Для выявления эффективных праймеров для *S. cereale* были отобраны 22 ISSR-праймера с ди- и тринуклеотидными повторами, в качестве якорей у которых выступают 1 или 2 нуклеотида на конце праймера. Именно эти 22 праймера наиболее часто используются для определения генетического разнообразия растений с использованием ISSR-анализа [1]. Длины анализируемых ISSR-праймеров менялись от 13 (X1) до 22 (ISSR9) нуклеотидов (см. таблицу). Каждый из отобранных ISSR-праймеров анализировали индивидуально. Для дальнейшего анализа были выбраны пять праймеров, эффективных для *S. cereale*, поскольку они удовлетворяют параметрам эффективности [12].

В результате амплификации анализируемых праймеров были получены фрагменты ДНК молекулярной массой от 200 до 1300 п.н. Из 22 праймеров пять продемонстрировали высокую эффективность, равную 5 баллам в соответствии со шкалой, предложенной С.В. Боронниковой и Р.Н. Календарем в 2007 г. [3]. Пять праймеров показали среднюю эффективность – 4 балла. Невысокую (3 балла и ниже) эффективность показали 12 ISSR-праймеров. Для дальнейшего анализа подходят только те праймеры, эффективность которых равна 5 баллам.

Эффективность ISSR-праймеров изученных озимых сортов  
*Secale cereale* L.

| Обозначение праймера | Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3') | Эффективность праймера | Обозначение праймера | Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3') | Эффективность праймера |
|----------------------|--------------------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|------------------------|
| <b>M1</b>            | <b>(AC)<sub>8</sub>CG</b>                        | <b>5</b>               | <b>ISSR-5</b>        | <b>(AG)<sub>8</sub>CA</b>                        | <b>5</b>               |
| M2                   | (AC) <sub>8</sub> CC                             | 2                      | ISSR-6               | (AG) <sub>8</sub> CG                             | 3                      |
| M3                   | (AC) <sub>8</sub> CT                             | 4                      | ISSR-7               | (CTC) <sub>6</sub> C                             | 3                      |
| M27                  | (GA) <sub>8</sub> C                              | 4                      | ISSR-8               | (GAG) <sub>6</sub> C                             | 2                      |
| X1                   | (CA) <sub>6</sub> G                              | 2                      | ISSR-9               | (ACG) <sub>7</sub> G                             | 4                      |
| X9                   | (ACC) <sub>6</sub> G                             | 3                      | ISSR-10              | (ATG) <sub>7</sub> C                             | 3                      |
| <b>X10</b>           | <b>(AGC)<sub>6</sub>C</b>                        | <b>5</b>               | CR-212               | (CT) <sub>8</sub> TG                             | 4                      |
| X11                  | (AGC) <sub>6</sub> G                             | 1                      | <b>CR-215</b>        | <b>(CA)<sub>6</sub>GT</b>                        | <b>5</b>               |
| ISSR-1               | (AC) <sub>8</sub> T                              | 3                      | CR-216               | (GA) <sub>6</sub> GG                             | 2                      |
| ISSR-3               | (TG) <sub>8</sub> AA                             | 3                      | CR-217               | (TG) <sub>6</sub> GG                             | 3                      |
| ISSR-4               | (TG) <sub>8</sub> GC                             | 4                      | <b>CR-218</b>        | <b>(GA)<sub>6</sub>CC</b>                        | <b>5</b>               |

Примечание: жирным шрифтом выделены эффективные праймеры [4].

Эффективными праймерами для изученных 5 озимых сортов *S. cereale* являются 4 динуклеотидных праймера ((AC)<sub>8</sub>CG, (AG)<sub>8</sub>CA, (CT)<sub>8</sub>TG, (CT)<sub>6</sub>TG, (GA)<sub>6</sub>CC) и 1 тринуклеотидный праймер ((AGC)<sub>6</sub>C).

Для ISSR-анализа тритикале (*×Tritico secale* Wittmack) в Институте генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси были использованы 7 ISSR-праймеров, из которых пять содержали динуклеотидный повтор ( (AC)<sub>8</sub>TC, (AC)<sub>8</sub>AG, (AG)<sub>8</sub>C, (AG)<sub>8</sub>T, (GA)<sub>8</sub>A), два – тринуклеотидный ( (CAG)<sub>5</sub>, (AGC)<sub>6</sub>G) [7].

Для обнаружения полиморфизма родительских линий *S. cereale* учеными из Варшавского аграрного университета были отобраны следующие 7 ISSR-праймеров (GA)<sub>9</sub>T, (AG)<sub>8</sub>T, (CT)<sub>8</sub>G, C(AC)<sub>4</sub>(AG)<sub>4</sub>A, G(AG)<sub>7</sub>(AT)<sub>2</sub>A, (CCT)<sub>5</sub>A, (CCT)<sub>5</sub>G [13]. Кроме того, при разработке ISSR-прай-



меров для ржи посевной динуклеотидные праймеры являются преобладающими в списке эффективных праймеров для обнаружения полиморфизма [15]. На основе данных этих исследований и проведенного нами подбора ISSR-праймеров можно сделать вывод, что динуклеотидные праймеры при амплификации с тотальной ДНК *S. cereale* дают наибольшее число полиморфных фрагментов ДНК.

Для селекции озимых сортов *S. cereale* в условиях Нечерноземной зоны России большое значение имеют высокостойкие сорта, наиболее адаптированные к почвенно-климатическим условиям региона. К ним относятся Вятка, Вятка 2 и Уральская [9]. Среди сортов, к которым были подобраны эффективные праймеры, есть один адаптированный к условиям Нечерноземья (Вятка 2).

Таким образом, для молекулярно-генетических исследований изученных озимых сортов *S. cereale* могут быть рекомендованы следующие пять эффективных ISSR-праймеров:  $(AC)_8CG$ ,  $(AG)_8CA$ ,  $(CT)_6TG$ ,  $(GA)_6CC$ ,  $(AGC)_6C$ .

**Заключение.** Для молекулярно-генетического анализа озимых сортов *S. cereale* с использованием ISSR-метода выявления полиморфизма ДНК был произведен подбор ISSR-праймеров по следующим критериям: наибольшее число полиморфных фрагментов ДНК, их четкая амплификация и воспроизводимость при повторных ПЦР.

Отобранные эффективные ISSR-праймеры  $((AC)_8CG, (AG)_8CA, (CT)_6TG, (GA)_6CC, (AGC)_6C)$  позволят выявить генетическое разнообразие озимых сортов *S. cereale* не только на опытных полях двух научно-исследовательских институтов, но и в условиях Нечерноземья.

*Исследование выполнено в рамках Программы «Приоритет – 2030», проект которой реализует Пермский государственный национальный исследовательский университет (Россия).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боронникова С. В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края: монография. Пермь, 2013. 239 с.
2. Гончаренко А. А. Состояние производства и селекция озимой ржи в Российской Федерации // Материалы Всерос. науч.-практ. конф., Екатеринбург, 28–29 июня 2012. Екатеринбург, 2012. С. 5–11.
3. Календарь Р. Н., Боронникова С. В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Материалы Четвертого Московского междунар. конгресса. М.: ЗАО «Экспо – биохим – технологии»; Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. Ч. 2. С. 121.
4. Календарь Р. Н., Боронникова С. В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы IV Московского междунар. конгресса. М., 2007. Т. 2. С. 201.
5. Корзун В. Н. Разработка и применение геномных технологий для молекулярно-генетического картирования и прикладной селекции зерновых культур: дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2021. 281 с.
6. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края / Ю. С. Нечаева [и др.] // Синтез знаний в естественных науках. Родник будущего: проекты, технологии, оборудование: материалы Междунар. конф. Пермь, 2011. С. 278–282.
7. Орловская О. А., Корень Л. В., Хотылёва Л. В. ISSR-анализ образцов озимой тритикале (*x Triticosecale* Wittmack) различного эколого-географического происхождения // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2012. Т. 56. № 2. С. 78–81.
8. Сухарева А. С., Кулуев Б. Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 069–084.
9. Сысуев В. А., Кедрова Л. И., Уткина Е. И. Рожь-стратегическая зерновая культура в развитии адаптивного растениеводства и обеспечении продовольственной безопасности России // Образование, наука и производство. 2014. № 2(7). С. 31–33.
10. Уткина Е. И., Кедрова Л. И. Зимостойкость озимой ржи: проблемы и решения // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2018. № 1(62). С. 11–18.
11. Федеральная служба государственной статистики. URL: <https://clck.ru/aoJYH> (дата обращения: 01.09.2022).
12. Шакирова А. Р. Подбор эффективных ISSR-праймеров для редких видов растений *Pulsatilla flavescens* (ZUCC.) JUZ. и *Pulsatilla patens* (L.) MILL // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгресс молодых ученых-биологов с междунар. участием, Пермь, 13–15 мая 2019 г., Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2019. 287 с.
13. The identification of QTLs associated with the in vitro response of rye (*Secale cereale* L.) / H. Bolibok et al. // Cellular & Molecular Biology Letters. 2007. Т. 12. No. 4. P. 523–535.
14. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. Vol. 1. No. 19. P. 69–76.



15. Smolik M. R-ISSR-for fingerprinting, mapping and identification of new genomic loci in rye (*Secale cereale* L.) // Russian Journal of Genetics. 2013. T. 49. No. 2. P. 187–195.

16. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification // Genomics. 1994. T. 20. No. 2. P. 176–183.

#### REFERENCES

1. Boronnikova S. V. Molecular genetic analysis and assessment of the state of the gene pools of resource plant species in the Perm region: monograph. Perm; 2013. 239 p. (In Russ.).

2. Goncharenko A. A. The state of production and selection of winter rye in the Russian Federation // Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference, June 28–29 2012. Yekaterinburg; 2012. P. 5–11. (In Russ.).

3. Kalendar R. N., Boronnikova S. V. Analysis of molecular genetic polymorphism of natural populations of rare plant species in the Urals using retrotransposons. Proceedings of the Fourth Moscow Intern. congress. M.: CJSC «Expo-biochem-technologies»; Publishing house of RKhTUim. D. I. Mendeleev; 2007. Ch. 2. P. 121. (In Russ.).

4. Kalendar R. N., Boronnikova S. V. Analysis of molecular genetic polymorphism of natural populations of rare plant species in the Urals using retrotransposons. Biotechnology: state and development prospects: materials of the IV Moscow Intern. Congr. M.; 2007. T. 2. P. 201. (In Russ.).

5. Korzun V. N. Development and application of genomic technologies for molecular genetic mapping and applied breeding of grain crops: dis. doc. biol. sci. SPb., 2021. 281 p. (In Russ.).

6. Optimization of DNA isolation technique for some coniferous plant species of the Perm region / Y. S. Nechaeva et al. Synthesis of knowledge in the natural sciences. Mine of the future: projects, technologies, equipment: Materialy Intern. conf. Perm; 2011. P. 278–282. (In Russ.).

7. Orlovskaya O. A., Koren L. V., Khotyleva L. V. ISSR-analysis of samples of winter triticale (x Triticosecale Wittmack) of different ecological and geographical origin. Reports of the National Academy of Sciences of Belarus. 2012;56(2):78–81. (In Russ.).

8. Sukhareva A. S., Kuluev B. R. DNA markers for genetic analysis of cultivated plant varieties. Biomika. 2018;10(1):069–084. (In Russ.).

9. Sysuev V. A., Kedrova L. I., Utkina E. I. Rye-strategic grain crop in the development of adaptive crop production and ensuring food security in Russia. Education, science and production. 2014;2(7):31–33. (In Russ.).

10. Utkina E. I., Kedrova L. I. Winter hardiness of winter rye: problems and solutions. Agrarian science of the Euro-North-East. 2018;1(62):11–18. (In Russ.).

11. Federal State Statistics Service. URL: <https://clck.ru/aoJYH> (date of access: 09.01.2022). (In Russ.).

12. Shakirova A. R. Selection of effective ISSR primers for rare plant species Pulsatilla flavescens (ZUCC.) JUZ. and Pulsatilla patens (L.) MILL. Symbiosis-Russia 2019: Proceedings of XI All-Russian. congress of young scientists-biologists from the international. participation, Perm, May 13–15 2019. Perm. state nat. research un-t. Perm; 2019. 287 p. (In Russ.).

13. The identification of QTLs associated with the in vitro response of rye (*Secale cereale* L.) / Bolibok H. et al. Cellular & Molecular Biology Letters. 2007;12(4):523–535.

14. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology. 1985;1(19):69–76.

15. Smolik M. R-ISSR-for fingerprinting, mapping and identification of new genomic loci in rye (*Secale cereale* L.). Russian Journal of Genetics. 2013;49(2):187–195.

16. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics. 1994;20(2):176–183.

Статья поступила в редакцию 21.09.2022; одобрена после рецензирования 27.03.2023; принята к публикации 31.03.2023.

The article was 21.09.2022; approved after reviewing 27.03.2023; accepted for publication 31.03.2023.