

УДК 577.21.582.542

Г. Ю. Шевчук, інженер**Н. Е. Кожухова**, д-р біол. наук**Ю. М. Сиволап**, академік НААНУ, д-р біол. наук

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААНУ,

Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна,

тел.: +38 (0482) 39-52-74, e-mail: anni2901@mail.ru

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНОМУ СОРГО

Сучасні біотехнології, що базуються на дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму, підвищують ефективність традиційної селекції рослин. Аналіз між- та внутрішньовидової різноманітності за допомогою молекулярних маркерів дозволив встановити високий рівень поліморфізму як серед видів сорго та сорізу (96,2%), так і в межах всієї вибірки (99%), що свідчить про широку мінливість досліджуваних видів. Кластеризація генотипів відповідає їх видовій належності. Для кожного генотипу отримано індивідуальний набір алелів, що дозволило скласти генетичні формули ліній.

Ключові слова: біотехнологія, між- та внутрішньовидовий поліморфізм, ПЛР-аналіз, *Sorghum oryzoidum*, *Sorghum bicolor*, мікросателітні локуси.

Підвищення продуктивності та поліпшення якості продукції, що синтезується, є однією з найважливіших задач генетико-селекційних досліджень. В останні роки провідним фактором виведення рослинництва на новий рівень стали сучасні біотехнології і, зокрема, ДНК-типування. У селекції круп'яних культур значною подією є створення рисовидної форми сорго — сорізу (*Sorghum oryzoidum*). Існує припущення, що соріз, рослина гібридного походження, одержана шляхом складних схрещувань хлібного сорго з дикими рисовидними формами [1]. Походження та класифікація сорізу на даний час є недостатньо вивченою та не зовсім зрозумілою, оскільки ідентифікація рослин здійснюється на основі опису морфологічних та агрономічних ознак. Вирощування круп'яних культур в зоні ризикованого землеробства України ще не досягло необхідного рівня, тому селекція сорізу на півдні України є важливим завданням.

Використання молекулярних маркерів для оцінки варіабельності видів і сортів рослин дозволяє виявити генетичні взаємовідносини між ними і уточнити систематику родів рослин, що включають види найважливіших сільськогосподарських культур [4, 5, 7]. У цьому плані ДНК-технології і маркери, що генеруються в результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), можуть виявитися важливим допоміжним інструментом при класифікації сорго.

Для оцінки генетичних взаємовідносин між видами та встановлення внутрішньовидової варіабельності використовують моно- та полілокусні варіанти ПЛР-аналізу: ПЛР-аналіз довільно праймованої ДНК (ДП-ПЛР) є полілокусним, біалельним, домінантним та дозволяє одночасно тестувати різні ділянки геному. Мікросателітні послідовності (монолокусні, поліалельні, кодомінантні) використовуються в якості генетичних маркерів для аналізу алельного стану локусів у близьких видів рослин, в тому числі й сорго [11]. За допомогою молекулярних маркерів можна уточнити походження сорту [6].

Мета даної роботи полягає у розробці системи ДНК-маркерів для молекулярно-генетичної характеристики генотипів *Sorghum bicolor* (сорго) та *Sorghum oryzoidum* (соріз).

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували 15 ліній чотирьох видів сорго: зернового (НК-180; К35-Є5; НК-5418; НК-2517; НК-1486), цукрового (Одеська 1820; 1969 Буджак; Одеська 2111; Одеська 2113; 2179 Буджак), віничного (2645 Буджак; 2806 Буджак; 2778 Буджак), суданки (2810 Буджак; Суданка 1); п'ять ліній сорізу (4005 Буджак; 2265 Буджак; 721/І; 1/ІІ; Одеська 302), по одному представнику кукурудзи (*Zea mays* L., лінія ГК 26) та рису (*Oryza sativa* L., сорт Україна). ДНК виділяли згідно протоколу з використанням протеїнази К [2].

ПЛР проводили в ампліфікаторі «Герцик» («ДНК-технологія», Росія). Реакційна суміш обсягом 20 мкл містила буфер (0,05 М КСІ; 0,02 М Трис-НСІ рН 8,4; 0,002 М MgCl₂; 0,01% Твін-20); по 0,2 ммоль кожного dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,25 мкмоль праймеру; 20 нг ДНК; 1 од. ДНК-полімерази Taq. Поверх реакційного розчину нашаровували 20 мкл мінеральної олії.

ДП-ПЛР виконували в такому режимі: початкова денатурація: 93 °С, 2 хв; далі 30 циклів: 93 °С, 30 с; 55 °С, 30 с; 72 °С, 1 хв; заключна елонгація: 72 °С, 2 хв.

SSR-ПЛР здійснювали за таких умов: денатурація — 96 °С, 2 хв; далі 30 циклів: 94 °С, 1 хв; 55 °С, 30 с; 72 °С, 1 хв; заключна елонгація: 72 °С, 2 хв. Послідовності праймерів наведені у працях [9, 10].

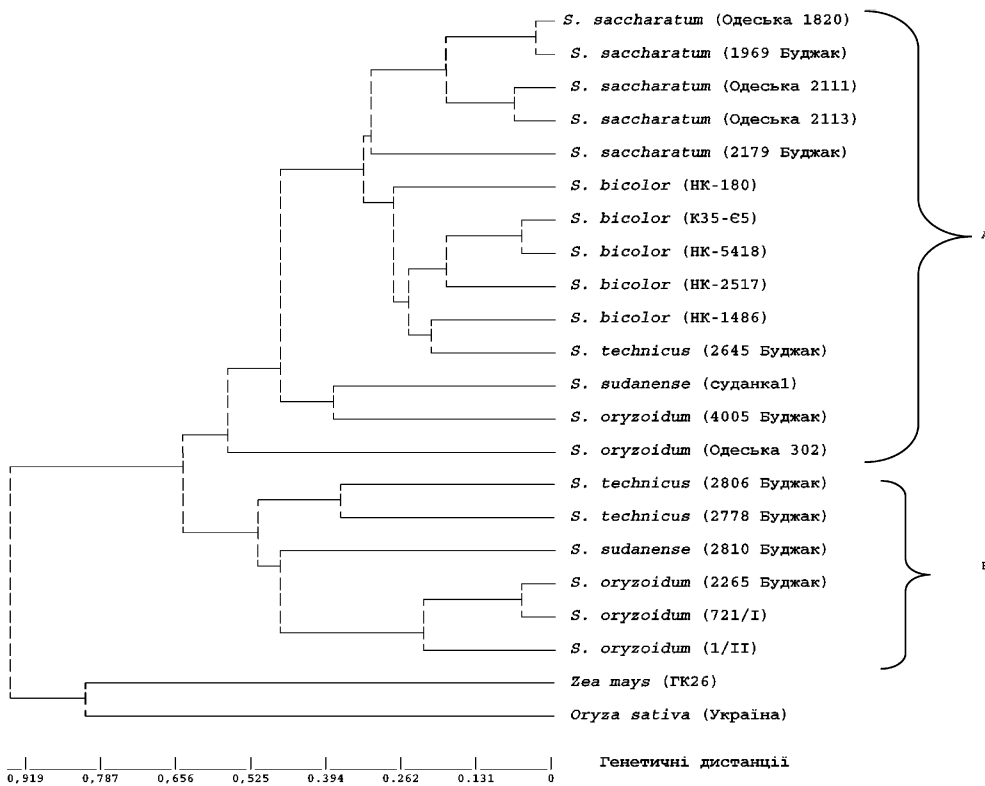
Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації та кластерний аналіз проводили згідно [8].

Результати та їх аналіз

ДП-ПЛР-аналіз для диференціації та ідентифікації ліній сорго та сорізу. Аналіз ДНК 22 зразків сорго та його найближчих сородичів з використанням ПЛР із 10 довільними праймерами дозволив диференціювати досліджений матеріал і оцінити внутрішньовидовий поліморфізм. Спектри ампліфікації ДНК досліджуваної вибірки містили від 14 до 23 компонентів. Проаналізовано 188 ампліконів. Рівень поліморфізму між зразками вибірки, що належить до різних родів та видів, склав 99%.

За сумарними даними ПЛР-аналізу проведено розрахунок генетичних дистанцій та кластеризацію досліджуваних видів. Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,111 до 0,993. Дендрограма об'єднує зразки, що належать до трьох родів: *Sorghum* M., *Zea* L., *Oryza* L. (див. рис.). Генетична дистанція між вибіркою із зразків роду *Sorghum* та кластером, який включає представників роду *Zea* і *Oryza*, складає 0,989. Між тим *Zea* і *Oryza* віддалені один від одного з коефіцієнтом 0,800. Це показує генетичну відокремленість роду *Sorghum* від його найближчих родичів. Род *Sorghum* представлено вибіркою з 20 зразків, п'ять із яких складають *Sorghum oryzoidum* (соріз), вони становили загальний кластер дендрограми, в межах якого рівень молекулярно-генетичного поліморфізму склав 96,2%.

У кластері зразки розподілились на два субкластери (А і В). Перший субкластер (А) складається з трьох груп. До першої групи ввійшли зразки цукрового сорго, друга група включає зернове сорго та одного представника віничного — 2645 Буджак. Третю створили представники суданки та сорізу (4005 Буджак і Одеська 302). Другий субкластер (В) представлено віничним сорго (2778 і 2806



Дендрограма філогенетичних відношень досліджуваних зразків за допомогою ДП-ПЛР-аналізу

Буджак), суданкою (2810 Буджак) та сорізом (2265 Буджак, 721/ I і 1/ II). Класифікація генотипів за даними ДП-ПЛР-аналізу відобразила належність зразків даної вибірки до груп, які відповідають ідентифікації за господарськими ознаками, та дозволила виявити близьку спорідненість сорізу з зерновим сорго.

На основі молекулярно-генетичного аналізу можна зробити висновок, що сорізі є формою сорго і не несе фрагментів ДНК, отриманих від віддаленої гібридизації. В останньому випадку генетичні дистанції між сорізом та іншими формами сорго були б більшими, ніж внутрішньовидові. Таким чином, відокремлення сорізу в окремий вид *Sorghum oryzoidum* пов'язано не з генетичними, а з господарсько-цінними особливостями.

SSR-аналіз. При ампліфікації 15 SSR-локусів отримали ДНК-профілі генотипів 20 ліній сорго та сорізу. Число алелів на локус варіювалося від трьох до восьми. Значення РІС (Polymorphic Index Content — індекс поліморфності) варіювалися від 0,55 (локус Xtxp 406) до 0,83 (локус Sb6-84). Середнє значення РІС склало 0,67, що свідчить про високий рівень дискримінації добраної маркерної системи.

Встановлення генетичної однорідності дослідного матеріалу є першим і обов'язковим етапом будь-якого молекулярно-генетичного аналізу.

Генетичну однорідність сорту, лінії чи гібриду тестували шляхом аналізу ДНК 50 індивідуальних рослин за трьома високополіморфними локусами (Sb6-36, Sb6-57, Sb6-84).

ДНК-спектри індивідуальних зразків, що досліджувались, за зазначеними трьома локусами є ідентичними, це дає змогу зробити висновок, що матеріал є однорідним, і продовжити молекулярно-генетичний аналіз за рештою локусів.

На основі молекулярно-генетичного аналізу 15 мікросателітних локусів для кожного генотипу отримано індивідуальний набір алелів (табл. 1), що дозволило скласти генетичні формули ліній (табл. 2). Отримані формули дають змогу створити каталог генотипів сортів сорго та можливість проводити паспортиза-

Таблиця 1

Кодування та алейна характеристика досліджуваних SSR-локусів

Локус	Код локусу	Довжина аляля	Частота зустрічальності	Локус	Код локусу	Довжина аляля	Частота зустрічальності		
Sb1-1	A	255	0,55	Sb6-84	I	177	0,15		
		258	0,35			180	0,15		
		261	0,10			183	0,15		
Sb4-15	B	155	0,10			186	0,25		
		158	0,50			189	0,15		
		161	0,30			192	0,15		
		164	0,10						
Sb4-22	C	365	0,45			Sb6-325	J	125	0,50
		368	0,15					128	0,25
		371	0,15					131	0,15
		374	0,10					134	0,10
		377	0,05			Sb6-342	K	265	0,55
380	0,10	268	0,25						
Sb4-32	D	195	0,05	271	0,20				
		198	0,20	Xtxp 18	L	128	0,05		
		201	0,60			131	0,10		
		204	0,05			134	0,40		
		207	0,10			137	0,10		
		140	0,35						
Sb4-34	E	300	0,10	Xtxp 250	M	406	0,20		
		303	0,15			409	0,25		
		306	0,10			412	0,20		
		309	0,10			415	0,15		
		312	0,55			418	0,15		
Sb4-121	F	185	0,05			421	0,05		
		188	0,10			Xtxp 400	N	338	0,05
		191	0,10					441	0,05
		194	0,05					444	0,30
		197	0,05					447	0,15
		200	0,05	450	0,05				
		203	0,10	453	0,05				
		206	0,50	456	0,15				
		459	0,20						
Sb6-36	G	160	0,60	Xtxp 406	O	370	0,60		
		163	0,25			373	0,25		
		166	0,05			376	0,15		
		169	0,10						
Sb6-57	H	290	0,15	Середнє			0,67		
		293	0,25						
		296	0,15						
		299	0,20						
		302	0,25						

цію генотипів. Літерою вказали код локусу, цифрою в нижньому індексі — довжину алелів в парах нуклеотидів (п. н.). Оскільки для ліній відмічено гомозиготний стан досліджуваних локусів, приведена довжина одного алеля.

Таблиця 2

Генетичні формули ліній сорго

Лінія	Формула
НК-180	A ₂₆₁ B ₁₅₈ C ₃₈₀ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₂₀₃ G ₁₆₉ H ₂₉₃ I ₁₈₀ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₂₈ M ₄₁₈ N ₃₃₈ O ₃₇₀
K35-Є5	A ₂₆₁ B ₁₅₈ C ₃₈₀ D ₁₉₅ E ₃₀₀ F ₂₀₃ G ₁₆₉ H ₂₉₃ I ₁₈₀ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₂₈ M ₄₁₈ N ₃₃₈ O ₃₇₀
НК-5418	A ₂₆₁ B ₁₅₈ C ₃₈₀ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₂₀₀ G ₁₆₉ H ₂₉₃ I ₁₈₃ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₂₈ M ₄₁₈ N ₃₃₈ O ₃₇₀
НК-2517	A ₂₆₁ B ₁₅₈ C ₃₈₀ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₂₀₀ G ₁₆₉ H ₂₉₃ I ₁₈₀ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₃₁ M ₄₁₈ N ₃₃₈ O ₃₇₃
НК-1486	A ₂₆₁ B ₁₅₈ C ₃₇₁ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₂₀₀ G ₁₆₀ H ₂₉₃ I ₁₈₀ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₃₄ M ₄₁₂ N ₄₅₃ O ₃₇₃
Одеська 1820	A ₂₅₈ B ₁₅₈ C ₃₇₁ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₁₉₇ G ₁₆₉ H ₃₀₂ I ₁₇₇ J ₁₃₁ K ₂₆₈ L ₁₄₀ M ₄₁₂ N ₄₅₀ O ₃₇₃
1969 Буджак	A ₂₅₈ B ₁₅₅ C ₃₇₄ D ₂₀₁ E ₃₁₂ F ₁₉₄ G ₁₆₉ H ₂₉₆ I ₁₈₆ J ₁₃₁ K ₂₆₈ L ₁₃₄ M ₄₁₅ N ₄₄₇ O ₃₇₆
Одеська 2111	A ₂₅₈ B ₁₅₅ C ₃₆₈ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₁₉₁ G ₁₆₉ H ₂₉₆ I ₁₈₆ J ₁₃₁ K ₂₆₈ L ₁₃₄ M ₄₁₅ N ₄₄₄ O ₃₇₆
Одеська 2113	A ₂₅₈ B ₁₆₁ C ₃₆₅ D ₂₀₄ E ₃₁₂ F ₁₈₈ G ₁₆₉ H ₂₉₃ I ₁₉₂ J ₁₃₁ K ₂₆₈ L ₁₃₄ M ₄₁₈ N ₄₄₁ O ₃₇₆
2179 Буджак	A ₂₅₈ B ₁₅₈ C ₃₆₅ D ₂₀₄ E ₃₀₀ F ₁₈₈ G ₁₆₆ H ₂₉₆ I ₁₈₉ J ₁₃₁ K ₂₆₈ L ₁₂₈ M ₄₂₁ N ₄₄₁ O ₃₇₃
2645 Буджак	A ₂₅₈ B ₁₆₁ C ₃₇₇ D ₂₀₄ E ₃₀₀ F ₁₈₅ G ₁₆₆ H ₃₀₂ I ₁₉₂ J ₁₂₈ K ₂₆₅ L ₁₃₁ M ₄₂₁ N ₄₄₁ O ₃₇₀
2806 Буджак	A ₂₅₈ B ₁₆₁ C ₃₇₇ D ₂₀₇ E ₃₀₀ F ₁₈₅ G ₁₆₆ H ₂₉₉ I ₁₈₉ J ₁₂₈ K ₂₆₅ L ₁₃₄ M ₄₁₅ N ₄₅₀ O ₃₇₀
2778 Буджак	A ₂₅₅ B ₁₆₁ C ₃₇₄ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₁₈₅ G ₁₆₆ H ₂₉₉ I ₁₇₇ J ₁₂₈ K ₂₆₅ L ₁₃₄ M ₄₁₅ N ₄₅₀ O ₃₇₀
2810 Буджак	A ₂₅₅ B ₁₆₄ C ₃₇₄ D ₁₉₈ E ₃₀₀ F ₁₈₅ G ₁₆₆ H ₃₀₂ I ₁₈₃ J ₁₂₅ K ₂₆₅ L ₁₃₇ M ₄₂₁ N ₄₅₆ O ₃₇₀
Суданка 1	A ₂₆₁ B ₁₆₁ C ₃₇₇ D ₂₀₁ E ₃₀₀ F ₁₈₅ G ₁₆₃ H ₂₉₃ I ₁₉₂ J ₁₂₅ K ₂₇₁ L ₁₃₇ M ₄₂₁ N ₄₅₃ O ₃₇₃
4005 Буджак	A ₂₆₁ B ₁₆₁ C ₃₈₀ D ₂₀₄ E ₃₀₉ F ₁₈₅ G ₁₆₉ H ₂₉₀ I ₁₈₆ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₃₄ M ₄₀₉ N ₄₅₃ O ₃₇₀
2265 Буджак	A ₂₆₁ B ₁₆₁ C ₃₈₀ D ₂₀₁ E ₃₀₉ F ₁₈₅ G ₁₆₉ H ₂₉₀ I ₁₈₃ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₃₄ M ₄₀₉ N ₄₅₃ O ₃₇₀
721/1	A ₂₆₁ B ₁₆₁ C ₃₈₀ D ₂₀₁ E ₃₀₉ F ₁₈₅ G ₁₆₉ H ₂₉₀ I ₁₈₃ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₂₈ M ₄₀₉ N ₄₅₃ O ₃₇₀
1/П	A ₂₆₁ B ₁₆₁ C ₃₈₀ D ₂₀₁ E ₃₀₆ F ₁₈₅ G ₁₆₉ H ₂₉₀ I ₁₈₀ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₂₈ M ₄₁₂ N ₄₅₃ O ₃₇₀
Одеська 302	A ₂₆₁ B ₁₆₁ C ₃₈₀ D ₁₉₅ E ₃₀₆ F ₁₈₅ G ₁₆₀ H ₂₉₀ I ₁₇₇ J ₁₃₄ K ₂₇₁ L ₁₂₈ M ₄₀₆ N ₄₅₉ O ₃₇₀

Вивчення між- та внутрішньовидової різноманітності за допомогою ДП-ПЛР дозволило встановити високий рівень поліморфізму як серед видів сорго та сорізу (96,2%), так і в межах всієї вибірки (99%), що свідчить про високу мінливість досліджуваних зразків, які важко класифікувати через велику кількість проміжних форм. В розробці теоретичних та практичних аспектів селекції сорго та сорізу необхідно використовувати обидва методи, які доповнюють один одного та дозволяють ефективно вирішувати актуальні проблеми покращення цих культур.

Висновки

1. За даними ДП-ПЛР-аналізу кластеризація генотипів відбулася згідно їх видовій належності: представники роду *Sorghum* M. увійшли в один кластер, представники родів *Zea* L. та *Oryza* L. — в інший.
2. Рівень поліморфізму між зразками сорго та його найближчих родичів склав 99%, в межах вибірки сорго та сорізу — 96,2%, що свідчить про високу мінливість досліджуваних зразків.
3. SSR-ПЛР-аналіз дозволив оцінити генетичну однорідність досліджуваних генотипів та можливість провадити паспортизацію, вирішувати проблему захисту авторських прав.
4. Розроблено ДНК-технологію для реєстрації генотипів сорго у вигляді генетичних формул, які відображують алельний склад досліджуваних мікросателітних локусів.

Література

1. Дремлюк Г. К. Сорго на изломе эпох. Приемы и методы селекции. — Одесса: СГИ—НЦСС. — 2008. — 243 с.
2. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научно-методическое руководство). — К.: Аграрная наука. — 1998. — 156 с.
3. Календарь Р. Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Материалы конференции «Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений» (10—13 мая 1994). — К., 1994. — С. 25—26.
4. Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы // Цитология и генетика. — 2006. — № 5. — С. 82—93.
5. Сиволап Ю. М., Волкодав В. В., Бальвінська М. С., Кожухова Н. Е. та ін. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів. Методичні рекомендації. — 2004. — Одеса: Астропринт. — 14 с.
6. Сиволап Ю. М., Галаев А. В., Нестерец В. Г. Дифференциация и идентификация сортов пшеницы и тритикале при помощи ДНК-типирования // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2004. — Т. 2. — № 1. — С. 3—15.
7. Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н. Генетический полиморфизм ячменя, выявляемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. — 1995. — Т. 31. — № 10. — С. 1358—1364.
8. Шевчук А. Ю., Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетический анализ форм сорго, возделываемых в Украине // Цитология и генетика. — 2009. — Т. 43. — № 2. — С. 47—53.
9. Agrama H A., Tuinstra M. R. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs // African Journal of Biotechnology. — 2003. — Vol. 2. — N 10. — P. 334—340.
10. Klein R., Klein P., Mullet J., Minx P. et al. Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pantatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12 // TAG. — 2005. — Vol. 111. — P. 994—1012.
11. Wu Y. Q., Huang Y. An SSR genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and its comparison to a published genetic map // Genome. — 2006. — Vol. 50. — P. 84—89.

А. Ю. Шевчук, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААНУ,
Овидиопольская дор. 3, Одесса, 65036, Украина,
тел.: +38 (0482) 39-52-74, e-mail: anni2901@mail.ru

ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ГЕНОМА СОРГО

Резюме

Современные биотехнологии, основанные на исследовании молекулярно-генетического полиморфизма, повышают эффективность традиционной селекции растений. Анализ меж- и внутривидового разнообразия с помощью молекулярных маркеров позволил установить высокий уровень полиморфизма как среди видов сорго и сориза (96,2%), так и в пределах всей выборки (99%), что свидетельствует о большой изменчивости исследуемых образцов. Кластеризация генотипов соответствует их видовой принадлежности. Для каждого генотипа получен индивидуальный набор аллелей, что позволило составить генетические формулы линий.

Ключевые слова: биотехнология, меж- и внутривидовой полиморфизм, ПЦР-анализ, *Sorghum orysooidum*, *Sorghum bicolor*, микросателлитные локусы.

A. Yu. Shevchuk, N. E. Kozhukhova, Yu. M. Sivolap

South Plant Biotechnology Center NAASU, Ovidiopolska doroga, 3, Odesa, 65036,
Ukraine, tel.: +38 (0482) 39-52-74, e-mail: anni2901@mail.ru

DNA-TECHNOLOGIES IN SORGHUM GENOME RESEARCH

Summary

Modern biotechnology based on the study of molecular-genetic polymorphism, increase the effectiveness of traditional plant breeding. Analysis of inter- and intraspecific diversity by using AP-PCR revealed a high level of polymorphism among species of sorghum and soriz (96.2 %) and within the whole sample (99 %), that testifies to wide variability of the analyzed samples. Clusterisation of genotypes was generated according to their specific belonging. The individual set of alleles was received for each genotype that provided the genetic formula lines.

Key words: biotechnology, inter- and intraspecific polymorphism, PCR-analysis, *Sorghum oryroidum*, *Sorghum bicolor*, microsatellite markers.
