

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ (*BETA VULGARIS L.*) ЗА ДОПОМОГОЮ ДНК- МАРКЕРІВ

О. Л. КЛЯЧЕНКО, кандидат біологічних наук, доцент,

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Л. М. ПРИСЯЖНЮК, кандидат сільськогосподарських наук,

Український інститут експертизи сортів рослин

E-mail: Klyachenko@ukr.net, prysiazhniuk_1@ukr.net

Анотація. *Наведено результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму у генотипів цукрових буряків із використанням RAPD- і SSR-аналізу. Виявлено та проаналізовано 14 алелів за чотирма RAPD-маркерами, встановлена гетерогенність матеріалів за частотою алелів (0,22-0,67) у досліджуваних генотипів, що свідчить про можливість застосування цих маркерів для генотипування цукрових буряків та визначення ступеня спорідненості між ними. Ідентифіковано п'ять типів алелів для застосування ДНК-маркеру GZM 086, за якими визначено поліморфні генотипи цукрових буряків: Катюша, УЛВ 37, Білоцерківський ЧС 57, Ялтушківський 64, Український ЧС 72. Виявлені алелі можна застосовувати для створення генетичних профілів, що характеризують генетичне різноманіття сортів та гібридів цукрових буряків.*

Визначені генетичні дистанції між генотипами у вибірці, які характеризують ступінь подібності досліджених форм. Встановлено, що найбільш подібними виявились генотипи, які належать до одного кластеру за досліджуваними ДНК-маркерами. Визначено, що генотипи із значенням генетичних дистанцій, яке наближається до одиниці є віддаленим за досліджуваним локусом. Встановлено, що з метою ідентифікації та диференціації сортів цукрових буряків доцільно застосовувати визначення міжсортного поліморфізму за використання різних ДНК-маркерів.

Ключові слова: *молекулярно-генетичний поліморфізм, RAPD-, SSR-маркери, генотипування*

Цукровий буряк (*Beta vulgaris L.*) відноситься до найважливіших технічних культур як основний продуцент цукру в умовах помірного клімату. На теперішній час селекційно-насінницькі компанії пропонують виробництву великий асортимент гібридів цукрового буряку, які створюються і підтримуються за унікальними схемами для кожної селекційної установи і проходять випробування в різних регіонах світу. Це викликає необхідність

проведення скринінгу і контролю наявних генетичних ресурсів та вивчення їх мінливості під час реєстрації нових гібридів і надійного захисту авторських прав селекціонерів, тестуванні однорідності комерційних партій насіння.

З розвитком ДНК-технологій новим етапом дослідження рослин є прямий аналіз геному і пов'язаний з цим пошук молекулярних маркерів, які дозволяють проводити диференціацію, ідентифікацію і моніторинг різних зразків, не залежать від стадії розвитку рослин і умов середовища та мають високу інформативність, технологічність, відтворюваність і великий потенціал поліморфізму [7, с. 26-31.].

В селекційно-наукових дослідженнях цукрового буряку все більшого застосування знаходять методи, засновані на ПЛР-ампліфікації ДНК, які дозволяють проводити ідентифікацію і диференціацію різних генотипів (видів, сортотипів, ліній гібридів). На сьогодні експериментально апробовано десятки маркерних систем, заснованих на поліморфізмі ДНК, серед яких найбільш поширені: RAPD [3, с. 5-6; 6, с. 36-37; 5, с. 22-23], SSR [3, с. 15-16] та ISSR аналізи [11, с. 429-430]. RAPD-PCR технологія заснована на аналізі ампліфікованої поліморфної ДНК із використанням обмеженого набору коротких одиночних праймерів (10-20 пн) із довільною нуклеотидною послідовністю [16, с. 6531]. Для більш точного виявлення поліморфізму близькоспоріднених генотипів використовується метод мікросателітного аналізу (SSR-PCR) [14, с. 796]. Під час ампліфікації ДНК із праймерами, які фланкують SSR, одержують кодомінантні маркери, що відповідають великій кількості алелів із різним числом тандемних повторів (від 2 до 6 нуклеотидів) [10, с. 15].

Мета дослідження – визначення міжсортowego поліморфізму різних генотипів цукрових буряків української і зарубіжної селекції та генетичної подібності між ними.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалами для досліджень слугували проростки сорту Ялтушківський однонасінний 64 (ЯлтО-64), диплоїдних гібридів на чоловічостерильній (ЧС) основі Ялтушківський ЧС 72 (Ялт ЧС72),

Уладово-Верхняцький ЧС37 (Ул-В ЧС37), Український ЧС 70 (Укр ЧС70), Український ЧС 72 (Укр ЧС72), Іванівський ЧС 33 (Іван ЧС33), Катюша (Syngenta, Швейцарія) та триплоїдних Олександрія, Білоцерківський ЧС 57 (БЦ ЧС57) вітчизняної та зарубіжної селекції.

Вибірка в межах кожного генотипу складала тридцять зразків. Геномну ДНК виділяли із 100 мг зелених листків 5–ти денних проростків з використанням катіонного детергенту ЦТАБ і розчиняли в ТЕ-буфері [1, с.11-14; 3, с. 15]. Концентрацію і чистоту виділеної ДНК визначали за допомогою спектрофотометричного методу, заснованого на відношенні довжини хвиль за максимальної фотометричної абсорбції нуклеїнових кислот за 260 нм і 280 нм [1, с. 16-18]. В роботі використовували 4 RAPD-маркери і мікросателітний маркер GZM 086 [8, с. 18-20; 12 с. 373; 15 с. 3], нуклеотидні послідовності яких наведено в таблиці 1. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили відповідно до типу ДНК-маркерів, емпірично підбираючи температуру гібридизації праймерів з урахуванням їх нуклеотидного складу.

1. Нуклеотидні послідовності праймерів

№ з/п	ДНК-маркер	Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' 3'
1.	RAPD	GEN 2-80-7	GCAGGTCGCG
2.		GEN 1-80-5	ACCCAGCCG
3.		GEN 1-70-9/2	TGCAGCACCG
4.		GEN 4-70-2	GGACCGACTG
5.	SSR	GZM 086	F – АСТТСТААТGGAGТААГААТGG R – АСGGCTACAGGАГААТАТТА

Розрахунок кількості компонентів ПЛР-суміші проводили за [3, с. 15; 11, с. 430-431]. Кількість праймерів визначали емпіричним шляхом індивідуально для кожного праймера у випадку RAPD-аналізу та пари праймерів – для SSR-методу. Під час дослідження RAPD-локусів ПЛР проводили в об'ємі реакційної суміші 25 мкл (100-250 мкМ дНТФ, 1^хПЛР буфер 1,5-3 мМ MgCl₂, 1 од. Таq полімерази) з використанням 1мкМ кожного праймера та 20 нг досліджуваної геномної ДНК. Реакцію ампліфікації для вивчення стану МС-локусу проводили на приладі Creason, США в об'ємі 25 мкл: 200 мкМ дНТФ, 1^хПЛР буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 1 од. Таq полімерази, по 0,5 мкМ кожного праймера та 20 нг

досліджуваної ДНК. Умови ПЛР для кожної групи праймерів з урахуванням підбраної температури для їх гібридизації наведено в таблиці 2. Водночас в наших дослідженнях частка гуанінових і цитозинових основ у нуклеотидній послідовності RAPD-праймерів становила від 70 до 80 %, що дозволяє за такого рівні їх насиченості підвищити температуру відпалу до 50-55 °С і уникнути синтезу неспецифічних фрагментів [11, с. 431; 13, с. 476]. Продукти ампліфікації ДНК для визначення стану мікросателітного локусу розділяли за допомогою горизонтального електрофорезу в 2 %-у агарозному гелі та в 3 %-у – для RAPD-аналізу за напруженості електричного поля 5 В/см упродовж 2,5-4 год. Результати електрофоретичного розділення візуалізували бромистим етидієм в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвиль в діапазоні 254-310 нм [1, с. 20-22; 3, с. 15]. Розмір алелів за отриманими електрофоретичними спектрами аналізували в парах нуклеотидів за допомогою комп'ютерної програми TotalLab v.2.01.

2. Умови проведення реакції ампліфікації

Праймер	Початкова денатурація	Денатурація	Гібридизація праймерів	Елонгація	Кінцева елонгація	Кількість циклів
GEN 2-80-7	94 °С 2 хв.	94 °С 30 с.	50 °С 45 с.	72 °С 60 с.	72 °С 7 хв.	45
GEN 1-80-5						
GEN 1-70-9/2						
GEN 4-70-2						
GZM 086	94 °С 3 хв.	93 °С 30 с.	55 °С 30 с.	72 °С 1 хв.	72 °С 5 хв.	33

На основі отриманих електрофореграм було побудовано матрицю, в якій присутність/відсутність алелів відображалась відповідно як 1/0. За матрицею було розраховано генетичні дистанції, частоти детектованих алелей, індекс поліморфності локусу (PIC) та побудовано дендрограми. Групування досліджуваних зразків у класи проводили незваженим методом середніх зв'язків, в якому критерієм для встановлення ступеня спорідненості слугувало середнє значення показників генетичної близькості між членами кластеру та

кандидатом до його включення [2, с. 25]. Отримані дані оброблені статистично за допомогою комп'ютерних програм Excel, Statistica 6.0 [3, с. 15; 11, с. 431].

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що концентрація виділеної геномної ДНК знаходилась в межах 102,2-206,4 мкг/мл, а чистота - 1,73-1,98 (табл. 3), що відповідає вимогам для проведення реакції ампліфікації, за якими вона повинна досягати не менше 100-200 мкг/мл і ступеня очистки – 1,8-1,9 за відношення довжини хвиль 260/280 нм [1, с. 16-18].

3. Середні значення концентрації і чистоти досліджених зразків отриманої ДНК

Сорт, гібрид	Концентрація, мкг/мл	Чистота, 260/280 нм
Катюша	102,2	1,92
Уладово-Верхняцький ЧС 37	167,6	1,73
Олександрія	187,4	1,94
Білоцерківський ЧС 57	206,4	1,92
Ялтушківський ЧС 72	112,4	1,94
Ялтушківський однонасінний 64	135,8	1,98
Іванівський ЧС 33	155,3	1,80
Український ЧС 72	143,4	1,96
Український ЧС 70	109,6	1,91

Ампліфікацію геномних ДНК для визначення поліморфізму досліджуваних матеріалів цукрового буряку за допомогою RAPD-аналізу проводили, застосовуючи мультиплексний підхід із використанням двох праймерів для однієї реакції: варіант № 1 - GEN 2-80-7 та GEN 1-80-5; варіант № 2 - GEN 1-70-9/2 та GEN 4-70-2. Результати ампліфікації геномних ДНК показали, що всі дев'ять генотипів цукрового буряку характеризуються високим поліморфізмом ДНК за використання запропонованих нами варіантів. Разом з тим виявлено 14 алелів (рис. 1), за якими можна проводити генотипування сорту і гібридів та встановити ступінь спорідненості між ними. Згідно з отриманими даними у переважної більшості генотипів виявлено алелі розміром 50 та 52 п.н., частота яких становила 0,67. Необхідно відмітити, що алель розміром 176 п.н. (за частоти 0,22) було ідентифіковано тільки у сорту Ялтушківський однонасінний 64 та диплоїдного гібриду Ялтушківський ЧС72. Всі інші виявлені алелі

розподілялись серед генотипів з відносно стабільною частотою 0,33-0,56. Середнє значення PIS для застосованих маркерів досить високий - 0,46. Відомо, що за наявності двох алелів, виявлених за використання домінантних маркерів, максимальне значення цього показника може досягати 0,5. Порівняльний аналіз алельного складу геномних ДНК сорту і гібридів цукрового буряку за допомогою чотирьох RAPD-праймерів засвідчує гетерогенність матеріалів як за кількістю ідентифікованих алелів, так і за їх частотою.

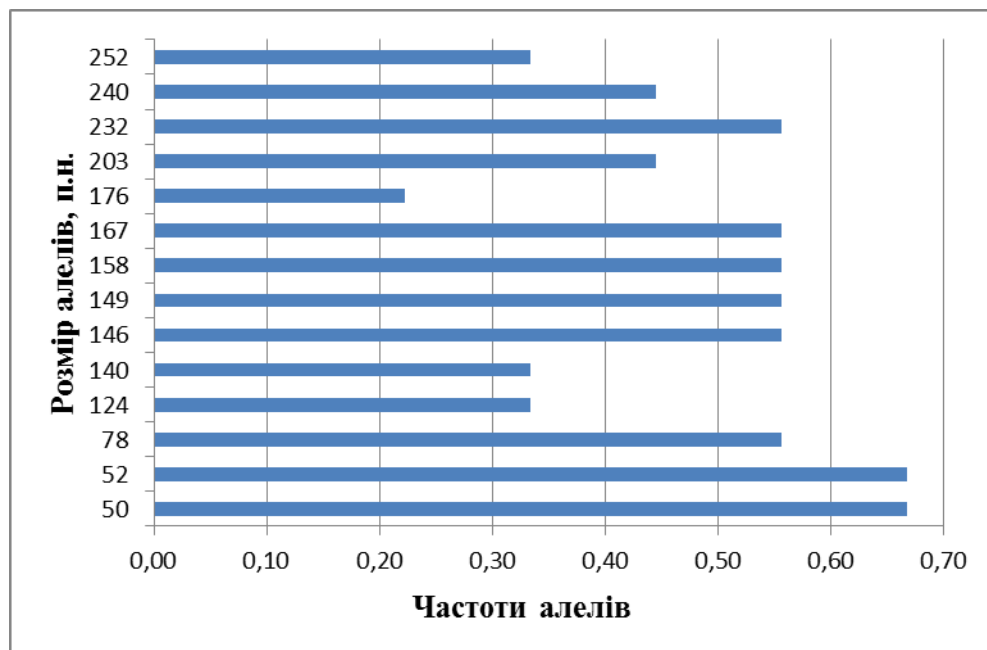


Рис. 1. Алелі, виявлені серед різних генотипів цукрового буряку за використаними RAPD-маркерами

В результаті ПЛР-аналізу геномної ДНК з маркером GZM 086 встановлено, що поліморфними тільки є п'ять (Ул-В ЧС37, Катюша, БЦ ЧС57, Ялто-64, Укр ЧС72) з дев'яти досліджених сорту і гібридів цукрового буряку. Згідно отриманих маркерних даних ідентифіковано та проаналізовано п'ять алелів, розподіл частот яких представлено на рисунку 2. Значення PIS, величина якого залежить від кількості виявлених алелів та їх частот (чим рівномірніше представлено алелі у вибірці, тим вищим буде індекс) [3, с. 15-16; 9, с. 980-983] становить 0,89, що засвідчує про їх рівномірний розподіл.

На основі побудованої матриці за маркерними даними RAPD- та SSR-аналізу розраховано генетичні дистанції і за допомогою кластерного аналізу

була проведена оцінка генетичної подібності сорту і гібридів цукрового буряку. Відповідно до генетичних дистанцій за результатами RAPD-аналізу досліджені генотипи було об'єднано в чотири кластери (рис. 3). До одного кластеру увійшли: сорт Ялтушківський однонасінний 64 і диплоїдний гібрид Ялтушківський ЧС 72; диплоїдний гібрид Уладово-Верхняцький ЧС 37 і триплоїдний гібрид Білоцерківський ЧС 57; диплоїдний гібрид Український ЧС 70 і триплоїдний гібрид Олександрія.



Рис. 2. Частоти алелів, виявлених серед генотипів цукрових буряків за маркером GZM 086

Диплоїдні гібриди Український ЧС 72 та Іванівський ЧС 33, генетична відстань між якими дорівнює нулю, утворили другий кластер, що свідчить про їх ідентичність за використаними RAPD-маркерами (табл. 4). Тому для їх диференціації та ідентифікації необхідно застосовувати більш розширену маркерну систему. Слід відмітити, що диплоїдний гібрид Катюша зарубіжної селекції утворює окремий кластер і відрізняється від решти досліджених матеріалів. Так, генетична віддаленість сорту і гібридів вітчизняної і зарубіжної селекції коливається у межах від 0,29 до 0,86, тоді як для гібриду Катюша вона складає 0,36 та 0,79.

До найбільш віддалених серед матеріалів української селекції відносяться триплоїдний гібрид Білоцерківський ЧС 57 та диплоїдні гібриди Український ЧС 72, Іванівський ЧС 33, що також підтверджує використання для їх створення селекційних матеріалів різного походження.

За результатами ідентифікованого молекулярно-генетичного поліморфізму мікросателітного локусу GZM 086 встановлено наявність двох генетично віддалених груп генотипів (рис. 4). Перший кластер утворюють диплоїдний гібрид Уладово-Верхняцький ЧС 37 і триплоїдний гібрид Білоцерківський ЧС 57, що вказує на їх спорідненість за дослідженим локусом. Наближеним до них є також диплоїдний гібрид Український ЧС 72. Необхідно зазначити, що гібриди Олександрія, Ялтушківський ЧС 72 та Український ЧС 70 формують другий кластер, оскільки за дослідженим MS-локусом не виявлено жодного алелю.

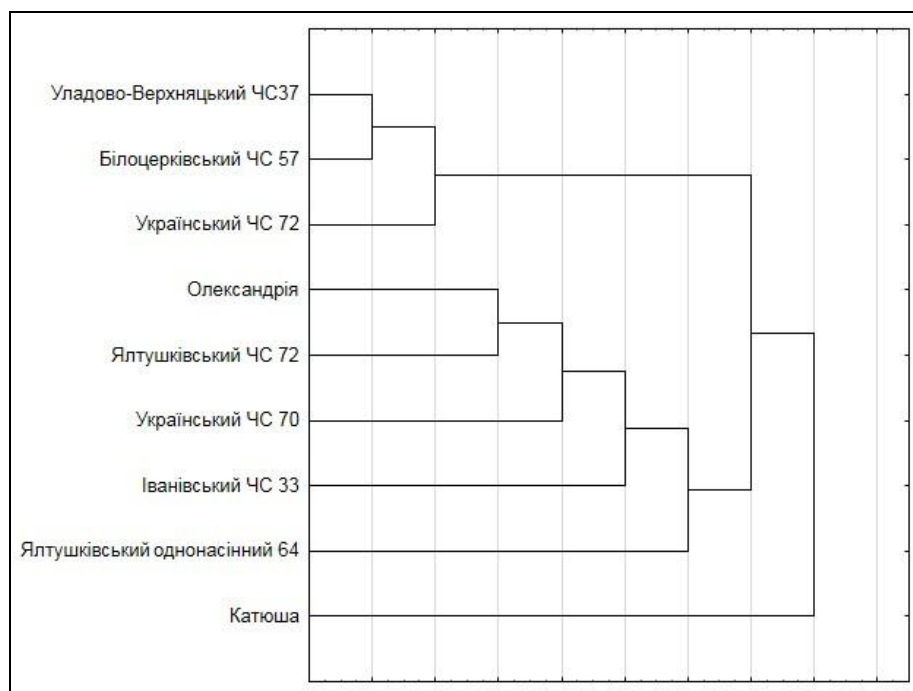


Рис. 4. Дендрограма генетичних відстаней різних генотипів цукрових буряків за SSR-маркером

До них примикають гібрид Іванівський ЧС 33 і сорт Ялтушківський однонасінний 64. Привертає увагу, що диплоїдний гібрид зарубіжної селекції Катюша, як і за результатами RAPD-аналізу, утворює окремий кластер, що

узгоджується з виявленими в нього унікальними для досліджуваної вибірки розмірами алелів (157 і 172 п.н). Найбільш віддаленими виявились генотипи з індексами генетичних дистанцій 0,80 (табл. 5). Генетичні дистанції, визначені для досліджуваних генотипів цукрових буряків за мікросателітним маркером, знаходились в межах 0,20-0,80. Генотипи, між якими генетичні відстані дорівнювали 0 належать до одного кластеру і є подібними за досліджуваним локусом. Однак триплоїдний гібрид Олександрія та диплоїдні гібриди Ялтушківський ЧС 72 і Український ЧС 70, між якими генетичні дистанції дорівнюють нулю, були згруповані за маркером GZM 086 за відсутністю алелів будь-яких розмірів. Слід наголосити, що генетичні дистанції за мікросателітним локусом між генотипами цукрових буряків мають досить низькі значення, що вказує на їх подібність, а також на низьку диференційну здатність маркеру. Тому, для диференціації цих генотипів необхідно розширити кількість досліджуваних локусів.

5. Генетичні дистанції досліджуваних генотипів цукрових буряків за SSR-маркером

Сорт, гібрид	Ул-В ЧС37	Олександрія	БЦ ЧС57	Ялт ЧС72	ЯлтО-64	Ів ЧС33	Ук ЧС72	Ук ЧС70
Катюша	0,80	0,40	0,80	0,40	0,80	0,60	0,80	0,40
Уладово-Верхняцький ЧС37	1	0,40	0,00	0,40	0,40	0,60	0,00	0,40
Олександрія		1	0,40	0,00	0,40	0,20	0,40	0,00
Білоцерківський ЧС 57			1	0,40	0,40	0,60	0,00	0,40
Ялтушківський ЧС 72				1	0,40	0,20	0,40	0,00
Ялтушківський однонасінний 64					1	0,20	0,40	0,40
Іванівський ЧС 33						1	0,60	0,20
Український ЧС 72							1	0,40
Український ЧС 70								1

Таким чином, у результаті проведених досліджень виявлено молекулярно-генетичний поліморфізм сорту і гібридів цукрових буряків із застосуванням двох маркерних систем та підібраних нами праймерів, визначені специфічні алелі для ідентифікації генотипів і встановлено їх генетичну подібність.

Висновки і перспективи подальших досліджень

Встановлено, що дев'ять вивчених генотипів цукрового буряку за допомогою RAPD- та SSR-маркерів виявились поліморфними. За маркером GZM 086 проаналізовано п'ять алелів, значення індексу поліморфності локусу становило 0,89, що засвідчує про рівномірний розподіл ідентифікованих алелів у вибірці. Застосування чотирьох RAPD-маркерів дало змогу ідентифікувати 14 алелів, які можна застосовувати для побудови ДНК-профілів, що характеризують генетичне різноманіття сорту та гібридів цукрового буряку. Для визначення міжсортового поліморфізму цукрового буряку можна рекомендувати вивчення алельного стану геномної ДНК за маркером GZM 086 та RAPD маркерами із застосуванням запропонованої мультиплексної системи.

Список літератури

1. Великов В. А. Молекулярная биология: практическое руководство / В. А. Великов. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.
2. Ерматраут Е. Р. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті STATISTICA 6.0 / Е. Р. Ерматраут, О. І. Присяжнюк, І. Л. Шевченко. – К.: ТОВ «ПоліграфКонсалтинг», 2007. – 56 с.
3. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *BETA* L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / М. В. Роїк, Ю. М. Сиволап, Г. П. Петюх [та ін.]. - К.: ТОВ «ПоліграфКонсалтинг», 2007. – 27 с.
4. Федулова Т. П. ДНК-маркеры для идентификации сортотипов в генофонде свеклы корнеплодной / Т. П. Федулова // Сахарная свекла. – 2014. – №5. – С. 14-16.
5. Федулова Т. П. Исследование внутривидового полиморфизма сортотипов свеклы корнеплодной (*Beta vulgaris* L.) / Т. П. Федулова, Д. Н. Федорин // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2015. - № 2 (45). – С. 21-24.
6. Федулова Т. П. Перспективы использования молекулярно-генетических маркеров в селекции сахарной свеклы / Т. П. Федулова // Сахарная свекла. – 2009. - № 9. – С. 34-37.
7. Хавкин Э. Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии для создания новых сортов сельскохозяйственных культур / Э. Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология. – 2003. - №3. – С. 26-39.
8. Dörnte J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.): Dissertation Doktors der Agrarwissenschaften / J. Dörnte. – Gatersleben. – 100 p.
9. Ghasemi A. R. Analysis of genetic diversity of sugar beet genotypes using random amplified polymorphic DNA marker / A. R. Ghasemi, A. R. Golparvar, M. N. Isfahani // Genetika. – 2014. - Vol. 46. - №3. – P. 975-984.

10. Holton T. A. Plant genotyping by analysis of microsatellites / T. A. Holton // In: Plant genotyping: The DNA fingerprinting of plants / [Ed. R. J. Henry]. - Wallingford, UK, 2001. – P.15-27.
11. Izzatulayeva V. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet / V. Izzatulayeva, Z. Akparov, S. Babayeva, J. Ojaghi, M. Abbasov // Turkish Journal of Biology. – 2014. – Vol. 38. – P. 429-438.
12. Lučić A. Genetic divergence of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in serbia revealed by rapd /A. Lučić, V. Isajev, L. Rakonjac, D. Ristić, M. Kostadinović, V. Babić and A. Nikolić. // Arch. Biol. Sci. - 2011 – Vol. 63. – P 371-380.
13. Möhring S. Multiplexed, linkage group-specific SNP marker sets for rapid genetic mapping and fingerprinting of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / S. Möhring, F. Salamini, K. Schneider // Molecular Breeding. – 2004. – Vol. 14. – P. 475–488.
14. Roose-Amsaleg C. Polimorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C. Roose-Amsaleg, E. Cariou-Pham, D. Vautrin, R. Tavernier, M. Sjlignac // Molecular Ecology Notes. – 2006. – №1. – P.796-799.
15. Smulders M. J. M. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers / M. J. M. Smulders, G. D. Esselink, I. Everaert, J. De Riek, B. Vosman / BMC Genetics. – 2010. – Vol. 11. – P. 1-11.
16. Williams J. G. K. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J Livak etc. //Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18. – P. 6231-6235.

References

1. Velikov, V. A. (2013). Molekulyarnaya biologiya: prakticheskoe rukovodstvo [*Molecular biology. Practical guide*]. Saratov: Izdatelstvo «Saratovskiy istochnik» [in Russian].
2. Ermatraut E. R., Prysiashniuk O. I., Shevchenko I. L. (2007). Statystychnyi analiz ahronomichnykh doslidnykh danykh v paketi STATISTICA 6.0 [*Statistical analysis of agronomic research data by program STATISTICA 6.0*]. K.: TOV «PolihrafKonsaltny» [in Ukrainian].
3. Roik M.V., Syvolap Iu.M., Petiukh H.P., Shaiuk L.V., Bab'iazh A.I., Bilous N.V. (2007). Vyznachennia molekuliarno-henetychnoho polimorfizmu rodu BETA L. za dopomohoiu polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii [*Determining of the molecular genetics polymorphisms of genus BETA L. by polymerase chain reaction*]. K.: TOV «PolihrafKonsaltny» [in Ukrainian].
4. Fedulova, T. P. (2014). DNK-markeryi dlya identifikatsii sortotipov v genofonde sveklyi korneplodnoy [DNA markers for identifying of varieties in the gene fond of sugar beet]. *Saharnaya svekla – Sugar beet*, 5, 14-16 [in Russian].
5. Fedulova, T. P., & Fedorin, D. N. (2015). Issledovanie vnutrividovogo polimorfizma sortotipov sveklyi korneplodnoy (*Beta vulgaris* L.) [Researching of intraspecific polymorphism varieties of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)]. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta – Bulletin of Voronezh State Agrarian University*, 2, 21-24 [in Russian].

6. Fedulova, T. P. (2009). Perspektivyi ispolzovaniya molekulyarno-geneticheskikh markerov v selektsii saharnoy svekly [Prospects of using of molecular genetic markers in breeding of sugar beet]. Saharnaya svekla – Sugar beet, 9, 34-37 [in Russian].

7. Havkin, E. E. (2003). Molekulyarnaya selektsiya rasteniy: DNK-tehnologii sozdaniya novyih sortov selskohozyaystvennyih kultur [Molecular plant breeding: DNA technologies for creation of new crop varieties]. Selskohozyaystvennaya biologiya – Agricultural biology, 3, 26-39.

8. Dörnte, J. (2011). Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) [Development, characterization and use of microsatellite markers in sugar beet]. Doktor's thesis. Gatersleben [in German].

9. Ghasemi, A. R., & Golparvar A. R., & Isfahani M. N. (2014). Analysis of genetic diversity of sugar beet genotypes using random amplified polymorphic DNA marker. Genetika, 3, 975-984.

10. Holton, T. A., & Henry Ed. R. J. (2001). Plant genotyping by analysis of microsatellites. In: Plant genotyping: The DNA fingerprinting of plants, 15-27.

11. Izzatulayeva, V., & Akparov, Z., & Babayeva, S., & Ojaghi, J., & Abbasov, M. (2014). Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet. Turkish Journal of Biology, 38, 429-438.

12. Lučić, A., & Isajev, V., & Rakonjac, L., & Ristić, D., & Kostadinović, M., & Babić, V. et al. (2011). Genetic divergence of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in serbia revealed by rapd. Arch. Biol. Sci., Belgrade., 63, 371-380.

13. Möhring, S., & Salamini, F., & Schneider K. (2004). Multiplexed, linkage group-specific SNP marker sets for rapid genetic mapping and fingerprinting of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Molecular Breeding, 14, 475-488.

14. Roose-Amsaleg, C., & Cariou-Pham, E., & Vautrin D., & Tavernier R., & Sjlignac, M. (2006). Polimorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum*. Molecular Ecology Notes, 1, 796-799.

15. Smulders, M. J. M., & Esselink, G. D., & Everaert, I., & De Riek, J., & Vosman, B. (2010). Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers. BMC Genetics, 11, 1-11.

16. Williams J.G.K., & Kubelik A.R., & Livak K.J. et al. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18, 6231-6235.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) С ПОМОЩЬЮ ДНК- МАРКЕРОВ

О. Л. Кляченко, Л. М. Присяжнюк

Аннотация. Приведены результаты исследований молекулярно-генетического полиморфизма генотипов сахарной свеклы с использованием RAPD- и SSR-анализа. Выявлены и проанализированы 14 аллелей по четырем

RAPD-маркерам, установлена гетерогенность материалов по частоте аллелей (0,22 0,67) в исследуемых генотипах, что свидетельствует о возможности применения этих маркеров для генотипирования сахарной свеклы и определения степени родства между ними. Определены пять типов аллелей при использовании ДНК-маркера GZM 086, по которым идентифицированы полиморфные генотипы сахарной свеклы: Катюша, УЛВ 37, Белоцерковский МС 57, Ялтушковская 64, Украинский МС 72. Обнаруженные аллели можно применять для создания генетических профилей, характеризующих генетическое многообразие сортов и гибридов сахарной свеклы

Определены генетические дистанции между генотипами в выборке, характеризующие степень сходства исследованных форм. Установлено, что наиболее подобными оказались генотипы, которые принадлежат к одному кластеру по исследуемым ДНК-маркерами. Определено, что генотипы со значением генетических дистанций, которое приближается к единице является удаленными по исследуемым локусам. Установлено, что с целью идентификации и дифференциации сортов сахарной свеклы целесообразно применять определение междусортного полиморфизма при использовании различных ДНК-маркеров.

Ключевые слова: молекулярно-генетический полиморфизм, *RAPD*-, *ISSR*-маркеры, генотипирование

DIFFERENTIATION AND IDENTIFICATION OF DIFFERENT GENOTYPES OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) USING DNA MARKERS

**O. L. Klyachenko, L. M. Prysiazhniuk **

Abstract. *It is studied the genetic polymorphism of nine different genotypes of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) of Ukrainian and foreign selection using *RAPD*- and *SSR*- analysis. In the total sample group of the studied genotypes it was found and analyzed 14 alleles with four *RAPD*-markers and proved heterogeneity of materials according to allele frequency (0.22-0.67), indicating the possibility of their use for genotyping varieties and hybrids of sugar beet and determining the degree of genetic kinship between them. When using DNA-marker GZM 086 identified five alleles, due to which they were identified polymorphic hybrids of Ukrainian breeding of Verhniachka CHS 37, Bila Tserkva CHS 57, Ukraina CHS72, 64 one-seeded Yaltushkivskyi variety, and hybrid Katiusha of foreign selection. The identified, alleles can be used to build DNA profiles that characterize the genetic diversity of different genotypes of sugar beet.*

They were determined the genetic distances between genotypes studied in the sample according to their similarity or distance. It was found that the most genetically similar are hybrids (variety), belonging to the same cluster according to used DNA-markers, and remote according to the studied locus - with values of genetic distances, which approaches one. For identification and differentiation of

varieties and hybrids of sugar beet it is appropriate to use the definition of intervarietal polymorphism using different DNA-markers.

Key words: *molecular-genetic polymorphism, RAPD-, SSR-markers genotyping*