



# Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 577.21:633.17

© 2016

Ю.О. Гончаров

Т.М. Сатарова,

доктор  
біологічних наук

О.В. Яланський,

В.Ю. Черчель,

кандидати сільсько-  
господарських наук

Державна установа Інститут  
зернових культур НААН

К.С. Веселянська

Державний вищий навчальний  
заклад «Український  
державний хіміко-  
технологічний університет»

## АЛЕЛЬНИЙ СТАН МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ СУЧАСНИХ СОРТІВ СОРГО ЗЕРНОВОГО

**Мета.** Вивчення алельного стану мікросателітних локусів у сучасних сортах сорго зернового для використання у селекції.

**Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція, методи статистичної обробки даних.

**Результати.** Наведено результати аналізу

26 сортів сорго зернового селекції ДУ Інститут зернових культур НААН за 4-ма мікросателітними локусами (маркери Sb4-32, Sb4-121, Sb6-57 і Sb6-84). Ідентифіковано 33 алеля, у середньому по 8,3 алеля на локус, що свідчить про високий рівень генетичного різноманіття досліджених сортів. Індекс поліморфності вивчених SSR-маркерів для масиву досліджених зразків — 0,42–0,73.

**Висновки.** Ідентифікований алельний стан мікросателітних локусів рекомендовано використовувати у селекційному процесі під час паспортизації, ідентифікації та реєстрації сортів сорго зернового вітчизняної селекції.

**Ключові слова:** сорго зернове, SSR-маркери, алелі, полімеразна ланцюгова реакція, локус.

Сорго зернове (*Sorghum bicolor* L.) — перспективна харчова, кормова та технічна зернова культура, яка має багато переваг перед іншими зерновими за посухостійкістю та широким використанням на продовольчі та технічні цілі. У 100 кг зерна сорго міститься 118–130 к. од. У зерні цієї культури вуглеводів — 71–82%, білка — 12–15, жиру — 3–5, клітковини — 2,4–4,8% [1].

Ефективним сучасним методом створення нових сортів сільськогосподарських культур є MAS-селекція (Marker-Assisted Selection). MAS-селекція за застосування ДНК-маркерів дає змогу проводити добір на поліпшення тієї

чи іншої ознаки безпосередньо за генотипом і здійснювати порівняльну оцінку алельного стану маркерів для генотипування, паспортизації, ідентифікації та реєстрації сортів [2]. Поширеним типом ДНК-маркерів є мікросателітні маркери. Мікросателіти (Single Sequence Repeats, SSR) — короткі (1–6 нуклеотидів) тандемні повтори з різною кількістю копій. Це високополіморфні ділянки ДНК з десятками алелей у кожному локусі та високими темпами мутування. Алелі мікросателітного локусу відрізняються один від одного довжиною ампліфікованого фрагмента ДНК та кількістю повторів [2–4]. У рослин короткі мікросателітні

# 1. Характеристика використаних SSR-маркерів за [5, 7, 13]

SSR-маркер	Повтор (мотив)	Послідовності праймерів для ідентифікації алельного стану SSR-маркера (5'–3')
Sb4-32	AG	F: gaa aaa tct ccg tca atc cca aaa taa R: cgc tga aca acg aaa gga ata agt g
Sb4-121	AC	F: gaa aaa tct ccg tca atc cca aaa taa R: cgc tga aca acg aaa gga ata agt g
Sb6-57	AG	F: aca ggg ctt tag gga aat cg R: cca tca ccg tgc gca tct
Sb6-84	AG	F: cgc tct cgggat gaa tga R: taa cgg acc act aac aaa tga tt

повтори представлені у великій кількості і становлять значну частину некодуючої ДНК, проте, велика кількість мікросателітів, які містять GC-пари, міститься в кодуючих областях геному [3, 4]. Мікросателітні маркери (SSR-маркери) монолокусні, поліалельні, кодомінантні, що дає змогу використовувати їх як генетичні маркери для аналізу алельного стану локусів у геномах сільськогосподарських культур [2], зокрема у сорго. Алельний стан мікросателітних локусів сорго досліджено в роботах українських [5, 6] і закордонних [7–10] учених, але постійна селекційна робота зі створення нових сортів цієї культури потребує молекулярно-генетичної оцінки нового відомого та елітного селекційного матеріалу.

**Мета досліджень** — вивчення алельного стану мікросателітних локусів у сучасних сортів сорго зернового для подальшого використання у селекції.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для досліджень були 26 сортів сорго зернового, створених у степовій зоні України на Синельниківській селекційно-дослідній станції (Дніпропетровська обл.) та Генічеській селекційній станції (Херсонська обл.) Державної установи Інститут зернових культур НААН. Ці сорти — чисті лінії, які розмножуються самоzapиленням.

ДНК ізолювали з проростків за СТАВ-методом згідно з протоколом виділення рослинної ДНК [11]. Визначення концентрації нуклеїнових кислот проводили спектрофотометрично. Чистоту препаратів ДНК визначали за співвідношенням поглинання за довжини хвилі 230, 260, 280 та 320 нм [12]. Концентрацію ДНК у зразках доводили до 20 нг/мл.

Для дослідження поліморфізму ДНК сорго зернового було використано 4 SSR-маркери (табл. 1).

Для маркерів Sb6-57 і Sb6-84 проводили диплекс-ПЛР за таких умов: початкова денатурація 2 хв за температури 96°C; далі 35 циклів, кожний з яких має таку послідовність: 1 хв за 94°C, 30 с за 55°C, 1 хв за 72°C; заключна елонгація — 2 хв за 72°C.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для маркерів Sb4-121 і Sb4-32 здійснювали за таких умов: початкова денатурація — 2 хв за температури 94°C; далі 40 циклів, кожний з яких проводили в такій послідовності: 30 с за 94°C, 30 с за 58°C, 1 хв за 72°C; заключна елонгація — 5 хв за 72°C.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в горизонтальному агарозному гелі (3%) на приладі для електрофорезу Sub-cell GT (Bio-Rad) за напруги 5 В/см та кімнатної температури.

Для аналізу отриманих результатів, зокрема для візуалізації фрагментів ДНК (ампліконів), у трис-боратний буфер (ТБЕ) додавали 5 мкл/л бромистого етидію. Гелі аналізували на приладі для візуалізації GelDocTM (Bio-Rad).

Індекс поліморфності маркера  $i$  (PIC) розраховували за формулою [5]:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2,$$

де  $f_i$  — частота  $i$ -го алеля;  $n$  — кількість алелей,  $i$  виражали в частках одиниці. Високим індексом поліморфності маркера вважається  $PIC > 0,25$ .

Частоту зустрічальності алеля розраховували як співвідношення кількості зразків, у яких виявлено цей алель, й загальної кількості проаналізованих зразків і виражали в частках одиниці.

Мажорним алелем за маркером  $i$  вважали алель, найпоширеніший за частотою зустрічальності у добірці досліджених

## 2. Характеристика стану 4-х мікросателітних локусів у 26 сортів сорго зернового

SSR-маркер	Кількість досліджених сортів, шт.	Кількість алелей, шт.	Min–max довжина алелей, п.н.	Довжина мажорного алеля, п.н.	Частота зустрічальності мажорного алеля	PIC
Sb4-32	26	7	156–190	173	0,23	0,42
Sb4-121	26	9	197–249	203	0,23	0,57
Sb6-57	25	8	250–294	282	0,32	0,73
Sb6-84	26	9	157–205	180	0,31	0,67

селекційних зразків. Частоту мажорного алеля за маркером *i* визначали як співвідношення кількості селекційних зразків, що виявили мажорний алель за маркером *i*, та загальної кількості проаналізованих зразків.

**Результати та обговорення.** Усі досліджені зразки сорго зернового виявилися гомозиготними за проаналізованими мікросателітними локусами. Визначено поліморфізм розміру ампліконів у дослідженій добірці з 26 сортів (табл. 2).

Кількість алелей 4-х досліджених мікросателітних локусів у добірці з 26 сортів сорго становила від 7 (Sb4-32) до 9 (Sb4-121 та Sb6-84). Усього було ідентифіковано 33 алеля, тобто в середньому по 8,3 алеля на маркер, що свідчить про достатньо високе генетичне різноманіття досліджених зразків. Діапазон довжини алелей варіював від 34 п.н. для Sb4-32 до 52 п.н. для Sb4-121. У 2-х інших маркерів цей показник становив 44 п.н. для Sb6-57 і 48 п.н. для Sb6-84. Мажорні алелі за маркерами Sb4-32 та Sb6-84 займали медіанне положення серед інших алелей, а для двох інших маркерів були зміщені у бік коротших (Sb4-121) і довших (Sb6-57) алелей. Алель, визначений як мажорний, виявляли у 23% досліджених сортів для Sb4-32 та Sb4-121 та у 31 і 32% досліджених сортів відповідно для маркерів Sb6-84 та Sb6-57. Загалом, частка сортів з мажорним алелем на рівні 23–32% свідчить про значне генетичне різноманіття дослідженої добірки сортів сорго зернового за проаналізованими локусами. Індекс поліморфності використаних SSR-маркерів був на достатньо високому рівні — від 0,42 (Sb4-32) до 0,73 (Sb6-57). Середнє значення індексу поліморфності становило 0,60, що підтверджує високий рівень дискримінації обраної маркерної системи.

Порівняння отриманих нами експериментальних даних для сортів сорго зернового, створених у степовій зоні України,

з даними щодо алельного стану тих самих мікросателітних локусів Sb4-32, Sb4-121, Sb6-57 і Sb6-84 у сортів світової колекції у роботах [5–10, 13, 14] свідчить, що кількість алелей за кожним з маркерів у двох групах перебуває на приблизно однаковому рівні. Діапазон довжини алелей для вітчизняної добірки сортів дещо ширший, а за маркером Sb4-121 значно ширший, ніж за результатами інших авторів. Границі довжини ампліконів у вітчизняному селекційному матеріалі зміщені у бік коротких алелей для маркерів Sb4-32, Sb6-57, Sb6-84, а PIC для всіх маркерів дещо або істотно менший, ніж за аналізу зарубіжних сортів. Середня кількість алелей на локус у різних дослідженнях [7, 8, 10] для 9–15 SSR-маркерів коливалася в діапазоні 4,4–18,3, пропорційно збільшуючись у разі розширення кількості досліджуваних зразків від 27 до 380. У нашій роботі під час дослідження 26 сортів, селекція яких відбувалася в степовій зоні, середня кількість алелей на маркерний SSR-локус була на рівні 8,3. Отже, отримані результати свідчать про подібність проаналізованих сортів сорго зернового української та світової селекції за кількістю алелей 4-х досліджених мікросателітних локусів і середньою кількістю алелей на локус. Водночас у вітчизняних сортів ширший діапазон довжини алелей, границі довжини ампліконів зміщені у бік коротких алелей, а PIC має менші значення.

Виявлені характеристики алельного стану мікросателітних маркерів Sb4-32, Sb4-121, Sb6-57 та Sb6-84 дали змогу позначити індивідуальні особливості 26 сортів сорго зернового української селекції, які можуть бути використані для їх паспортизації. Досить велика кількість алелей у кожному локусі забезпечила унікальність кожного сорту за 4-ма мікросателітними маркерами, що є необхідною умовою для типування, ідентифікації та реєстрації сортів сорго зернового.

## Висновки

У результаті проведеного дослідження встановлено алельний стан мікросателітних маркерів Sb4-32, Sb4-121, Sb6-57 та Sb6-84 у 26 сортів сорго зернового. Ідентифіковано 33 алеля, у середньому по 8,3 алеля на локус, що свідчить про високий рівень генетичного різноманіття досліджених сортів. Індекс поліморфності

вивчених маркерів для масиву досліджених зразків становить 0,42–0,73. Визначені показники алельного стану SSR-маркерів можуть бути використані для характеристики поліморфізму мікросателітних локусів, а також для паспортизації, ідентифікації та реєстрації сортів сорго зернового вітчизняної селекції.

## Бібліографія

1. Дремлюк Г.К. Сорго на изломе эпох. Приемы и методы селекции/Г.К. Дремлюк. — Одесса: СГИ — НЦСС, 2008. — 236 с.
2. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции/Е.К. Хлесткина//Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2013. — Т. 17, № 4. — С. 1044–1054.
3. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования геном/И.Н. Леонова//Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2013. — Т. 17, № 2. — С. 314–325.
4. Сиволап Ю.М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений/Ю.М. Сиволап, Н.Э. Кожухова, Р.Н. Календарь. — Одесса: Астропринт, 2011. — 366 с.
5. Шевчук А.Ю. Молекулярно-генетический анализ форм сорго, возделываемых в Украине/А.Ю. Шевчук, Н.Э. Кожухова, Ю.М. Сиволап//Цитология и генетика. — 2009. — Т. 2. — С. 47–53.
6. Шевчук Г.Ю. ДНК-технології в дослідженні геному сорго/Г.Ю. Шевчук, Н.Е. Кожухова, Ю.М. Сиволап//Вісн. ОНУ. — 2010. — Т. 15, № 6. — С. 57–63.
7. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats/J.S. Smith, S. Kresovich, M.S. Hopkins et al.//Crop Sci. — 2000. — V. 40. — P. 226–232.
8. Population genetic structure of *in situ* wild *Sorghum bicolor* in its Ethiopian center of origin based on SSR markers/A. Adugna, A.A. Snow, P.M. Sweeney, E. Mutegyl//Genet. Resour. Crop. Evol. — 2012. — Oktober.
9. Adugna A. Analysis of in situ diversity and population structure in Ethiopian cultivated *Sorghum bicolor* (L.) landraces using phenotypic traits and SSR markers//SpringerPlus. — 2014. — V. 3, № 212. — P. 1–14.
10. Ng'uni D. Genetic diversity in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) accessions of Zambia as revealed by simple sequence repeats (SSR)/D. Ng'uni, M. Geleta, T. Bryngelsson//Hereditas. — 2011. — V. 148. — P. 52–62.
11. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях/Ю.М. Сиволап. — К.: Аграр. наука, 1998. — 156 с.
12. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство/В.А. Великов. — Саратов: Саратовский источник, 2013. — 84 с.
13. Genetic redundancy and diversity among 'orange' accessions in the U. S. national sorghum collection as assessed with simple sequence repeat (SSR) markers/R.E. Dean, J.A. Dahlberg, M.S. Hopkins et al.//Crop Sci. — 1999. — V. 39. — P. 1215–1221.
14. Agrama H.A. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accession using SSRs and RAPDs/H.A. Agrama, M.R. Tuinstra//African Journal of Biotechnology. — 2003. — V. 2, №10. — P. 334–340.

Надійшла 16.05.2016.