II. ТЕОРЕТИЧНІ ПРОБЛЕМИ ОДНОНАСІННОСТІ

633.63:631.52

ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РОДУ *BETA* L.

М.В.Роїк, Л.В.Шаюк, І.П.Шевчук

Представлені результати дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Beta* L. на міжвидовому та внутрішньовидовому рівнях з допомогою RAPD-аналізу. Встановлено генетичну близькість *B. maritima* L. скандинавського походження та сорту цукрових буряків, а також показано віддаленість культурних буряків від середземноморських *B. maritima* L.

Вивчення генетичного потенціалу родів сільськогосподарських рослин для пошуку нових джерел стійкості та інших сільськогосподарсько-цінних ознак є невід'ємною частиною успішного ведення селекції. Використання ДНК-маркерів дозволяє всебічно дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм геному рослин. Особливо актуальною є ця проблема для буряків, оскільки до останнього часу виникає ряд спірних питань як на міжвидовому рівні, так і в межах виду.

Матеріали і методи. Рослинна вибірка для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму на міжвидовому рівні включала 13 видів роду *Beta* L., один з яких - *B.vulgaris* L. представлений двома формами: листковий буряк (*B. cicla*) та сорт цукрових буряків Рамонський 06 (Р06). ДНК виділяли з насіння за допомогою цетилтриетиламоніюброміду [1]. В роботі використано 11 RAPD-праймерів довжиною від 10 до 24 нуклеотидів. Ампліфікацію проводили на приладі "Термоциклер" за таких умов: денатурація 3 хв. при 94°С; 4 цикли попереднього відпалу праймера; 1 хв. при 93°С, 2 хв. при 39°-42°С та елонгація 2 хв. при 72°С; 33 основних цикли - температура відпалу була оптимальною для кожного праймера від 47° до 52°С.

Рослинна вибірка для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму на внутрішньовидовому рівні включала 14 зразків *B. maritima* L. та *B. vulgaris* L. різного походження. ДНК виділяли з п'ятиденних проростків, використовуючи цетилтриетиламонійбромід. Молекулярно-генетичний поліморфізм досліджували з допомогою 9-ти RAPD-праймерів довжиною від 10 до 22 нуклеотидів. Ампліфікацію проводили на приладі "TC 48/96 Thermal Cycler" за таких умов: денатурація 3 хв. при 94°С; 33 цикли: 1 хв. при 93°С, 2 хв. при 50°-55°С та елонгація 2 хв. при 72°С.

Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом у 2% агарозному гелі в 1×ТВЕ. Результат електрофоретичного розділення візуалізували бромистим етидієм та фотографували в УФ промінні [1].

На основі отриманих електрофоретичних спектрів побудовано матрицю, у якій присутність/відсутність алелей відображалась як 1/0 відповідно. За матрицею розраховано генетичні дистанції, рівень поліморфізму, очікувану гетерозиготність та маркерний індекс [2, 3].

Результати та обговорення. Підібрана маркерна система для аналізу філогенетичних відношень на міжвидовому рівні дозволила ідентифікувати 172 локуси, з яких 170 поліморфні. Високий відсоток (98%) поліморфізму є характерним для досліджень на міжвидовому рівні [4]. Крім того, очікувана

гетерозиготність та маркерний індекс також мали досить високе значення – від 0,31 до 0,41 та 0,57 відповідно.

На основі маркерних даних розраховано генетичні дистанції, за результатами їх аналізу види розподілені в три кластери, що відповідають секціям роду (рис. 1). Відповідно генетичним дистанціям, всі три секції значно віддалені одна від одної, що співпадає з літературними даними [5]. Така віддаленість отримана за рахунок того, що 10 з 11 праймерів дозволили виявити неполіморфні локуси для окремих секцій.

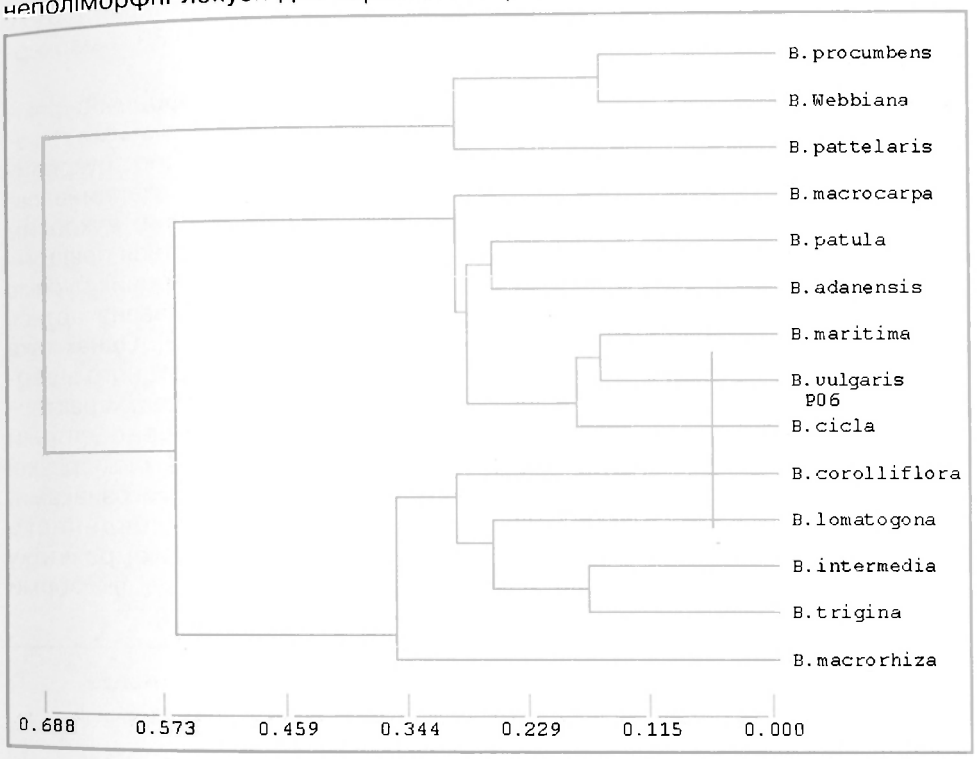

Рисунок 1— Дендрограма філогенетичних взаємовідношень видів роду Beta L.

Перший кластер утворюють види секції *Patellares,* їм характерна значна генетична віддаленість від інших видів роду.

До другого кластеру увійшли види секції *Vulgares*, котрі в свою чергу розділились на два кластери та окрему гілку. До першого кластеру входять *B. patula* і *B. Adanensi,* до другого - *B.maritima, B. cicla* та сорт цукрових буряків. Отримані результати співпадають з літературними, де вказано, що дивергенція *B. patula, B.maritima* та *B. macrocarpa* відбувалась практично одночасно [5, 6]. Для форм культурних буряків та виду *B.maritima,* характерні низькі значення генетичних дистанцій: *B. cicla* - P 06 - 0,340, *B. maritima* - *B. cicla* - 0,303 та *B .maritima* – P 06 - 0,287. Як видно, P 06 генетично ближче до *B. maritima,* ніж до *B. cicla.* За допомогою білкових маркерів було виявлено близкість *B. maritima* до форм цукрових буряків та віддаленість по відношенню до мангольдів [7].

Третій кластер утворюють види секції *Corollinae*. У літературі існує припущення, що види *B.macrorhiza*, *B.lomatogona* та *B. corolliflora* є вихідними для всіх інших, а дивергенція відбувалась таким чином: вид *B.trigyna* виник

у результаті схрещувань *B.lomatogona* та *B. corolliflora*, а *B. Intermedia* - з схрещувань *B.lomatogona* та *B.trigyna* [5, 6, 8]. Як видно на рисунку 1, отримані результати повністю підтверджують таку схему дивергенції.

Для досліджень на внутрішньовидовому рівні було сформовано другу маркерну систему, оскільки маркери, використані у попередніх дослідженнях, виявили низький рівень поліморфізму. Таким чином, підібрали 9 RAPD праймерів, що дозволили дослідити 190 локусів, 184 з яких виявились поліморфними. Рівень поліморфізму для всієї вибірки маркерів становить 97%. Очікувана гетерозиготність змінювалась у межах від 0,29 до 0,39, а маркерний індекс для вибірки праймерів склав 0,72.

У результаті аналізу розрахованих генетичних дистанцій форми буряків розподілено між трьома кластерами та двома окремо примикаючими гілками видно з рисунку 2 скандинавські форми *B. maritima* L. та сорт цукрових буряків увійшли до одного кластеру. Відомо, що *B. maritima* L. скандинавського походження має ряд морфофізіологічних ознак притаманних цукровим бурякам [5, 8], крім того у літературі неодноразово зустрічаються повідомлення про генетичну близькість, за білковими маркерами, цукрових буряків та форм *B. maritima* L. скандинавського походження, а також зазначається віддаленість останніх від мангольдів та кормових буряків [7, 9]. Однак така близькість, вірогідніше, спричинена тим, що в результаті природного відбору скандинавські різновиди *B. maritima* L. закріпили багато ознак, характерних для цукрових буряків. До цього ж кластеру віднесено форми *B. maritima* L. з Тунісу та Туреччини. Відомо, що для середземноморської *B. maritima* L. характерний поліморфізм як за морфологічними ознаками, так і за циклом розвитку, однак саме серед форм південного Середземноморського узбережжя зустрічається дворічний цикл розвитку та характерна висока цукристість навіть для однорічників, тоді як форми північного узбережжя – однорічники з низькою цукристістю [5].

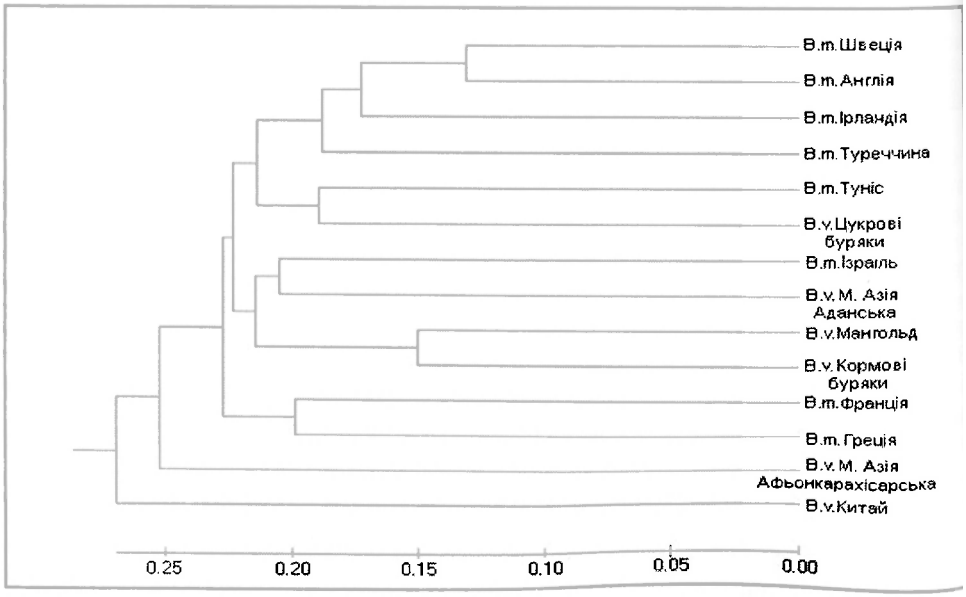

Рисунок 2 — Дендрограма буряків різних екотипів

Примітка. *B.m – B. maritima L., B.v – B. vulgaris L.*

ЗОСИМОВИЧ ВОЛОДИМИР ПАВЛОВИЧ, ЛАУРЕАТ ЛЕНІНСЬКОЇ ПРЕМІЇ

За результатами проведених досліджень для ізраїльської форми *B. maritima* L., мангольду, кормових буряків та азіатського сортотипу коренеплідних буряків Аданського помаранчевого характерні низькі значення генетичних дистанцій, що привело до їх групування в другий кластер. Як відомо, азіатські культурні буряки досить сильно відрізняються від європейських, однак використаний в наших дослідженнях Аданський помаранчевий за структурою коренеплоду та вмістом сухих речовин схожий на європейські столові буряки [8], що й спричинило їх групування в один кластер.

Третій кластер утворюють середземноморські форми *B. maritima* L. з Греції та Франції. Згідно генетичним дистанціям, вони досить віддалені від культурних буряків, що співпадає з літературними даними [7].

Окремо примикають дві гілки, котрі утворили різновиди *B. vulgaris* L. з Малої Азії та Китаю. Ці зразки представлені найбільш древніми коренеплідними формами, вони суттєво відрізняються від європейських буряків. Згідно генетичним дистанціям, форми з цих екотипів значно віддалені як від всіх культурних буряків, так і від диких форм *B. maritima* L. [5, 6, 8], що робить їх непридатними для використання у якості джерела стійкості та інших сільськогосподарсько-цінних ознак для цукрових буряків.

Висновки. Таким чином, можна зробити наступні висновки:

- на основі отриманих генетичних дистанцій види роду *Beta* L. розподілились між трьома значно віддаленими кластерами, які відповідають секціям роду;
- для видів секції *Vulgares* та *Corollinae* відмічено відповідність отриманих схем дивергенції, представлених В.П. Зосімовичем (1940 р.);
- встановлено генетичну близькість *B. maritima* L. скандинавського походження та цукрових буряків, однак такий розподіл ймовірно обумовлений тим, що природній та штучний відбори були направленні на закріплення одних і тих же ознак;
- згідно отриманим результатам, у якості джерела стійкості та інших сільськогосподарсько-цінних ознак для цукрових буряків доцільніше використовувати *B. maritima* L. скандинавського походження а також форми з Тунісу та Туреччини;
- для диференціації та ідентифікації буряків на між- та внутрішньовидовому рівнях доцільно використовувати представленні маркерні системи.

Список літератури

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. - М.: Мир. – 1984.
2. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Науч.-метод. руководство / под ред. Ю.М. Сиволапа. – К: Аграр. наука - 1998. С.8-21.
3. Powell W., Morgante M., Andre Ch., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis // Molecular Breeding. – 1996. – 2. p. 225-238.
4. Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Боброва В.К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений. Генетика, 1999, том 35, №11, С. 1538-1549.
5. Зосимович В.П. Свекловодство. К.: Гос. издат. колхозной и совхозной литературы УССР. – 1940. – С. 17-83.

6. Lange W., Brandenburg W.A., De Bock Th. S.M. Taxonomy and cultonomy of beet (*B. vulgaris* L.) // Botanical Journal of the Linnean Society. – 1999. – 130. p. 81-96.

7. Буренин В.И. Наследственные дифференцировки в роде *Beta L.* // Генетика. – 1994. – 30, № 12. - С. 1593-1598.

8. Красочки В.Т. Культурная флора СССР. Корнеплодные растения. Л.· «Колос». – 1971. – С 22-75.

9. Лисневич Л.А. Фізіолого-біохімічні властивості та функціональна роль запасних білків буряків. Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.12 // Ін-т. фізіол. рослин та генетики. - К.: - 1999. – 37 с.

Аннотация

Представлены результаты исследования молекулярно-генетического полиморфизма рода *Beta* L. на межвидовом и внутривидовом уровнях с помощью RAPD-анализа. Установлено генетическую близость *B. maritima* L. скандинавского происхождения и сорта сахарной свеклы, также показано удаленность культурной свеклы от средиземноморской *B. maritima* L.

Annotation

The article deals with the results of investigations of molecular-genetic polymorphism of the genus *Beta* L. Genetic relationship between *B. maritima* L. of Scandinavian origin and a sugar beet variety was established and also remoteness of cultured beet from Mediterranean *B. maritima* L. was shown.