

УДК: 635.112: 577.2

Изучение аллельного состояния микросателлитных локусов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)

Кляченко О. Л., Присяжнюк Л. М.

Приведены результаты исследований молекулярно-генетического полиморфизма у сортов и гибридов сахарной свеклы, из которых несколько оказались полиморфными. Выявлены и проанализированы пять типов аллелей по маркеру GZM 086 с использованием SSR-анализа. Установлено генетическое сходство между двумя парами гибридов по исследуемому локусу, что может свидетельствовать об их общем происхождении.

Ключевые слова: молекулярно-генетический полиморфизм, SSR-маркеры, генетическое сходство, сахарная свекла.

The study of the allelic state of microsatellite loci of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

Klyachenko O. L., Prisiazhniuk L. M.

The results of studies of the genetic polymorphism in varieties and hybrids of sugar beet, of which several were polymorphic, are presented. Five types of alleles at marker 086 GZM were identified and analyzed using SSR-analysis. Established genetic similarity between two pairs of hybrids through the test locus, may indicate their common origin.

Keywords: molecular genetic polymorphism, SSR-markers, genetic similarity, sugar beet.

Введение

Современные сорта и гибриды сахарной свеклы на основе цитоплазматической мужской стерильности обеспечивают высокие урожайность и сбор сахара. Для успешной селекционной работы необходим скрининг имеющихся генетических ресурсов и изучение их изменчивости.

В мировой практике для изучения особенностей генома близкородственных форм, которыми являются сорта и линии культурных растений, используют методы молекулярного маркирования на основе микросателлитных (МС) локусов. Большинство идентифицированных МС-локусов являются варибельными по длине, что обусловлено различным количеством tandemных последовательностей. Анализ длины микросателлитов, как правило, позволяет выявить значительное количество аллельных вариантов, а их распространение по всему геному позволяет охватить значительную его часть. В последние годы, проведен ряд исследований, посвященных поиску варибельных по длине МС-последовательностей в геноме сахарной свеклы, а также разработаны маркеры, позволяющие исследовать их аллельное состояние, в частности, маркеры серии GZM [5, 6].

Цель исследования

Целью исследования является установление межвидового полиморфизма МС-локуса с использованием маркера GZM 086 у сортов и гибридов сахарной свеклы украинской и зарубежной селекции.

Материал и методы

В исследованиях использовали сорта сахарной свеклы Белоцерковская односемянная 45, Ялтушковская односемянная 64, диплоидные гибриды на мужскостерильной основе Катюша, Атаманша, Иваново-Веселоподольский МС 84, Уладово-Верхнячский МС 37, Ялтушковский МС 72, Ивановский МС 33, Украинский МС 72, Украинский МС 70 и триплоидные — Александрия, Белоцерковский МС 57, которые внесены в Государственный реестр сортов растений Украины. Работа была выполнена с использованием лабораторного метода для определения молекулярно-генетического полиморфизма с помощью SSR-анализа; математически-статистического — для оценки результатов исследований, расчетно-сравнительного — для установления аллельного состояния микросателлитных локусов.

Для исследования полиморфизма между генотипами сахарной свеклы ДНК выделяли из проростков, полученных по общепринятой методике [1]. Выборка в пределах каждого исследованного сорта состояла из тридцати образцов. ДНК экстрагировали с использованием катионного детергента ЦТАБ [2, 4]. Измерение концентрации и чистоты ДНК проводили спектрофотометрическим методом, который основан на отношении длин волн при максимальной фотометрической абсорбции нуклеиновых кислот при 260 нм и 280

нм [2]. Для изучения молекулярно-генетического полиморфизма использовали маркер GZM 086, с известной хромосомной локализацией и структурой микросателлитного повтора, с описанием аллельного состава для культурной свеклы европейского происхождения [5, 6].

Реакцию амплификации проводили при таких температурных условиях: начальная денатурация при 94°C 3 мин., денатурация при 93°C 0,5 мин., гибридизация при 55°C 0,5 мин. и элонгация при 72°C 1 мин., 33 цикла. Основные структурные характеристики и оптимальная температура гибридизации праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика праймеров для MC-локуса GZM 086 сахарной свеклы

Нуклеотидная последовательность	Количество нуклеотидов, шт.	CG-состав, %	Температура гибридизации, °C
F — 5' -ACTTCTAATGGAGTAAGAATGG- 3'	22	36	55
R — 5' -ACGGCTACAGGAGAATATTA- 3'	20	40	

Согласно литературным данным, исследуемый MC-локус имеет 7 аллелей размером 162—210 п.н. с локализацией на III хромосоме и структуре повтора (GA)_n/(GTGA)_n [5].

После окончания ПЦР полученные продукты реакции разделяли с помощью горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле при разности потенциалов 2—6 W течение 2,5—4 ч., затем визуализировали при ультрафиолетовом освещении с длиной волны в диапазоне 254—310 нм [4]. Размер аллелей рассчитывали в парах нуклеотидов с помощью компьютерной программы TotalLab v.2.01.

По матрице присутствия/отсутствия аллелей в локусе для данных SSR-анализа рассчитывали генетическое подобие между исследуемыми образцами по формуле: $NL_{xy} = 2n_{11} / (2n_{11} + n_{01} + n_{10})$, где n_{11} — количество локусов с наличием общих аллелей, n_{01} и n_{10} — количество локусов с различными аллелями. Генетические дистанции определяли по формуле: $D = -\ln NL_{xy}$, где NL_{xy} — генетическое подобие.

Распределение генотипов согласно генетическим дистанциям осуществляли с помощью кластерного анализа. Группирование исследуемых образцов в классы проводили с помощью невзвешенного метода средних связей, согласно которому критерием для установления степени близости

является среднее значение показателей генетической близости между членами кластера и кандидатом на включение в кластер [3].

Для характеристики генетической структуры исследуемых генотипов сахарной свеклы рассчитывали частоты детектированных аллелей, которые отражают их относительное количество в исследуемой выборке по формуле: $p=n/N$, где n — количество образцов с наличием некоторого аллеля, N — общее количество образцов.

Одним из критериев, характеризующим степень идентифицированной изменчивости в популяции, и, соответственно, способность маркера определять разницу между генотипами, является индекс полиморфности локуса. Этот показатель рассчитывали по формуле: $PI_C=1-\sum p_{iu}^2$, где PI_C — индекс полиморфности локуса, p_{iu} — частота i -того аллеля для l локуса. Расчеты проводили с помощью компьютерных программ Excel, Statistica 6.0 [3, 4].

Результаты и обсуждение

Особенности выделения ДНК из растительного материала свеклы обусловлены характером ее биохимического состава и относительно малым размером генома. Поэтому, для выделения ДНК из проростков сахарной свеклы использовали метод экстракции с помощью ЦТАБ реагента, который позволяет минимизировать потери ДНК при экстракции. Для проведения реакции амплификации концентрация ДНК должна иметь значения не менее 150—200 мкг/мл и степень очистки — 1,8—1,9 при отношении длины волн 260/280 нм [2]. Результаты измерения представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Концентрация и чистота образцов полученной ДНК

№ п/п	Сорт, гибрид	Концентрация, мкг/мл	Чистота, 260/280 нм
1.	Белоцерковская односемянная 45	357,5	2,00
2.	Ялтушковская односемянная 64	374,8	1,98
3.	Иваново-Веселоподольский МС 84	292,4	1,72
4.	Уладово-Верхнячский МС 37	274,6	1,73
5.	Ялтушковский МС 72	335,4	1,94
6.	Катюша	341,2	1,92
7.	Атаманша	318,5	1,87
8.	Ивановский МС 33	349,3	2,02
9.	Украинский МС 72	179,4	1,96
10.	Украинский МС 70	169,6	1,98

11.	Александрия	264,4	1,94
12.	Белоцерковский МС 57	358,4	1,99

Из представленных данных можно видеть, что концентрация ДНК исследуемых образцов находилась в пределах 169,6—374,8 мкг/мл, значение чистоты 1,72—2,02.

Количество и качество выделенной ДНК свидетельствует о том, что выбранная методика выделения ДНК позволяет получить высокоочищенную ДНК с концентрацией не менее 150 мкг/мл, которую можно использовать для проведения ПЦР. На рис. 1 представлены аллели, полученные для 9 сортов сахарной свеклы с использованием маркера GZM 086.

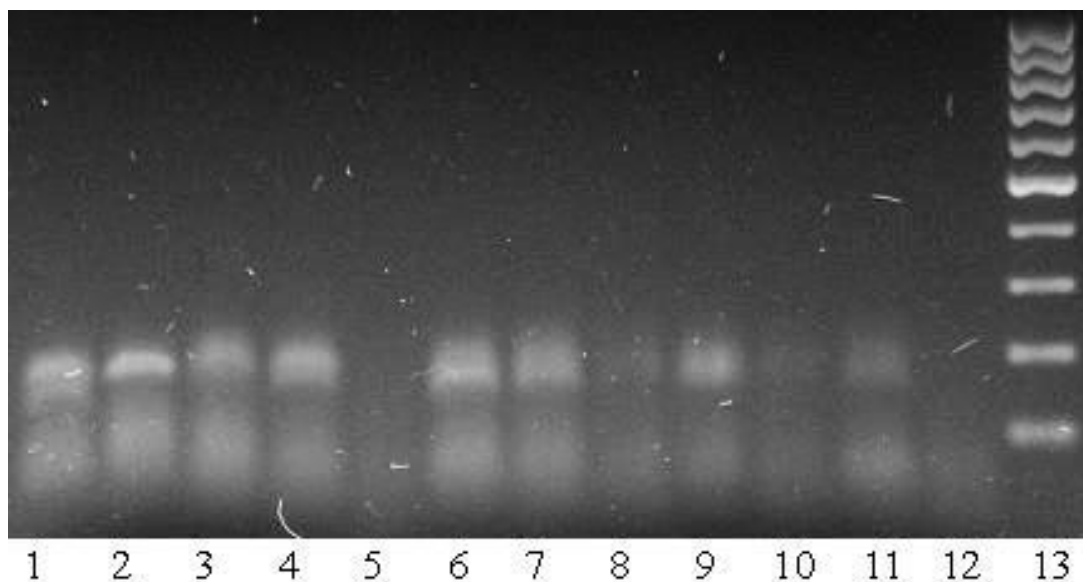


Рисунок 1 — Электрофоретическое распределение аллелей согласно маркеру GZM 086 для 12 генотипов сахарной свеклы: 1 — Катюша; 2 — Атаманша; 3 — Иваново-Веселоподольский МС 84; 4 — Уладово-Верхнячский МС 37; 5 — Александрия; 6 — Белоцерковский МС 57; 7 — Белоцерковская односемянная 45; 8 — Ялтушковская МС 72; 9 — Ялтушковская односемянная 64; 10 — Ивановский МС 33; 11 — Украинский МС 72; 12 — Украинский МС 70; 13 — маркер молекулярного веса 100bp

В результате электрофоретического разделения продуктов амплификации, полиморфизм аллелей идентифицирован у сортов Белоцерковская односемянная 45, Ялтушковская односемянная 64, а также у гибридов Украинский МС 72, Белоцерковский МС 57, Уладово-Верхнячский МС 37 и Катюша. На треках 2, 3, 10 представлены неполиморфные аллели исследуемых гибридов сахарной свеклы (Атаманша, Иваново-Веселоподольский МС 84 и Ивановский МС 33), они имеют в своем составе по одному виду аллеля. Для гибри-

дов Александрия, Ялтушковский МС 72 и Украинский МС 70 согласно маркеру GZM 086 не обнаружено ни одного аллеля. В итоге, был исследован полиморфизм 12 генотипов сахарной свеклы и установлено, что полиморфными из них являются 2 сорта и 4 гибрида.

Для расчета размера аллелей МС-локуса полученные электрофоретические спектры анализировали с помощью компьютерной программы TotalLab v.2.01. В целом, по маркеру GZM 086 выявлены и проанализированы пять аллелей размерами: 157; 177; 192; 202; 210 п.н., значение индекса полиморфности локуса составляло 0,62. Величина индекса полиморфности зависит от количества выявленных аллелей и их частот, а именно чем равномернее представлены аллели в выборке, тем выше будет индекс [5, 6]. Идентифицированные аллели МС-локуса равномерно представлены в выборке, что позволило получить высокое значение индекса полиморфности локуса (рисунок 2).

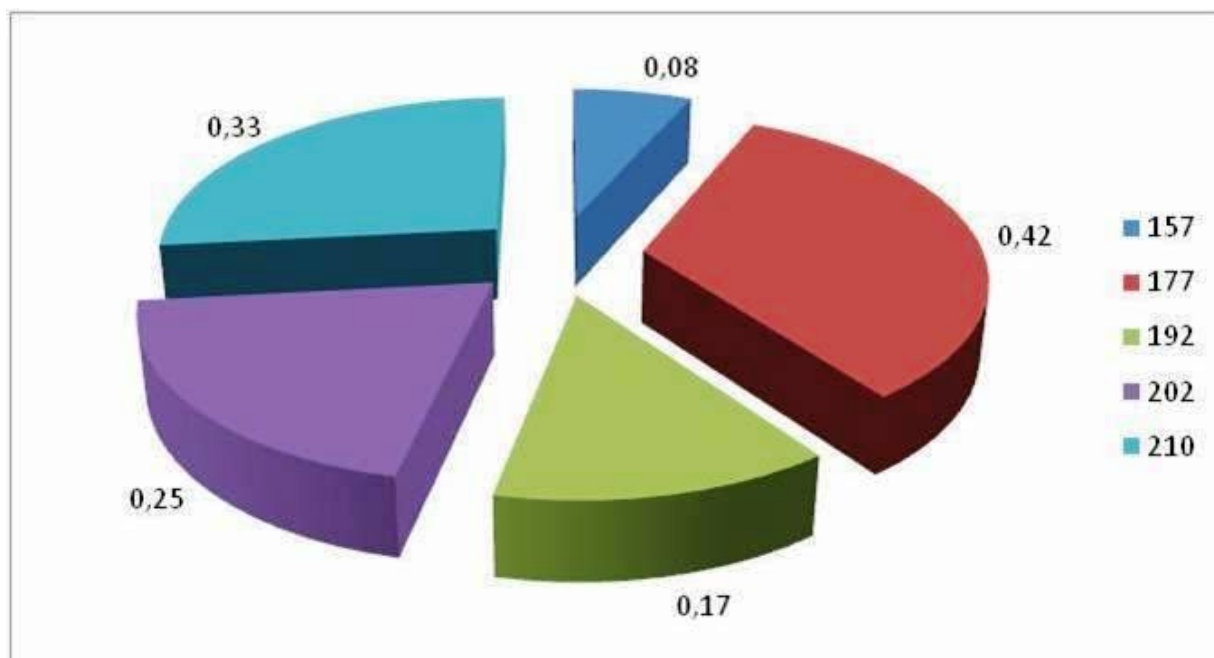


Рисунок 2 — Частоты аллелей выявленных у сортов сахарной свеклы по маркеру GZM 086

Таким образом, согласно результатам исследования молекулярно-генетического полиморфизма 12 генотипов сахарной свеклы отечественной и иностранной селекции был установлен качественный и количественный аллельный состав МС-локуса GZM 086.

Используя данные аллельного состава МС-локуса сортов сахарной свеклы, была построена матрица, в которой отмечали присутствие/отсутствие аллелей — соответственно 1/0. На основе матрицы была проведена оценка генетического сходства исследуемых генотипов с помощью кластерного анализа. В соответствии с полученным распределением, сорта и гибриды были объединены в два кластера (рисунок 3).

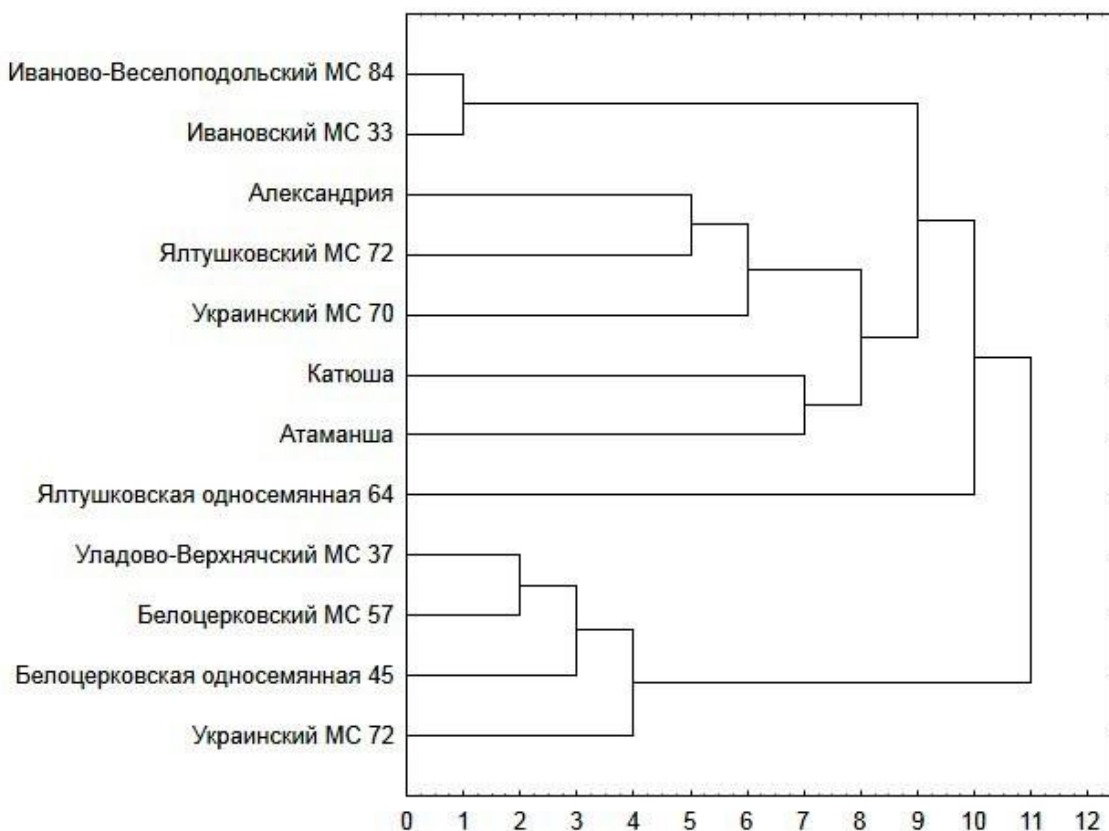


Рисунок 3 — Дендрограмма сортов сахарной свеклы

В результате анализа выявленного молекулярно-генетического полиморфизма, было установлено наличие двух генетически отдаленных групп для сортов и гибридов сахарной свеклы. Согласно полученным данным, в первый кластер вошли гибриды Иваново-Веселоподольский МС 84 и Ивановский МС 33, что указывает на генетическое сходство по исследуемому локусу. Также, близкими к указанным гибридам являются Александрия, Ялтушковский МС 72, Украинский МС 70, Катюша и Атаманша. Однако, следует отметить, что гибриды Александрия, Ялтушковский МС 72 и Украинский МС 70 формируют отдельный кластер, поскольку по исследованному МС-локусу не обнаружено ни одного аллеля. Ко второму кластеру, согласно полученной дендрограмме, относятся гибриды Уладово-Верхнячский МС 37 и Белоцер-

ковский МС 57, к ним прилегают сорт Белоцерковская односемянная 45 и гибрид Украинский МС 72. Отдельно от указанных кластеров, выделенный сорт Ялтушковская односемянная 64, который не принадлежит ни к одному кластеру.

Выводы

В результате исследования молекулярно-генетического полиморфизма сортов и гибридов сахарной свеклы по маркеру GZM 086, полиморфными оказались 2 сорта и 4 гибрида, что составило 0,67 %. По указанному МС-локусу проанализированы пять аллелей, значение индекса полиморфности локуса составило 0,62, что свидетельствует о том, что идентифицированные аллели равномерно представлены в выборке. Установлено, что для определения внутривидового полиморфизма сортов и гибридов сахарной свеклы можно рекомендовать изучение аллельного состояния по маркеру GZM 086 в комплексе с другими SSR-маркерами.

Литература

1. ДСТУ 3226-95 (ГОСТ 10882-98) Семена односемянной сахарной свеклы. Посевные качества. Технические условия. — Держстандарт України. — Київ. — 1999. — 16 с.
2. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство / Великов В.А. — Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. — 84 с.
3. 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.
4. Роїк М.В. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *BETA L.* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / Роїк М.В., Сиволап Ю.М., Петюх Г.П., Шаюк Л.В., Баб'яж А.І., Білоус Н.В. — 2007. — 27 с.
5. Dörnte J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris L.*): Dissertation Doktors der Agrarwissenschaften / Dörnte J. — Gatersleben, 22.10.2001. — 100 p.
6. 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(41). — P. 1—11.