

ited on the type of prevailing of parent with low contents of 11S globulins (h_p from -0,25 to -2,3), and 7S globulins – on the intermediate type of inheritance with deviation to parent with best on contents of 7S globulins (h_p from +0,076 to +0,69). Nevertheless, among the studied hybrid combinations there are hybrids, where the effect of prevailing of the best parent on the contents of these indexes is marked (h_p from +2,0 to +2,1). **Conclusions.** The got results testify that contents of 7S and 11S globulins in the soybean seed at the F_3 hybrids is controlled by the difficult genetic system with the different type of genes action and cooperation. **Key words:** *Glicine max.* L., 11S globulin (glicinin), 7S globulin (β -conglycinin).

БАЄР Г.Я.¹, ПІРКО Я.В.¹, СТАДНІЧУК Н.О.², РАХМЕТОВ Д.Б.², ЄМЕЦЬ А.І.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України
Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

² Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України
Україна, 01014, Київ, вул. Тимірязєвська, 1

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ ГЕНОТИПІВ *ELEUSINE CORACANA* (L.) GAERTN. ТА *ELEUSINE INDICA* (L.) GAERTN. ЗА ДОПОМОГОЮ ISSR-АНАЛІЗУ

Завдяки досягненням молекулярної генетики та геноміки зроблено вагомий внесок у розвиток біології, відкрито широкі можливості для використання новітніх технологій в практиці сільського господарства. Одним із сучасних напрямків у вирішенні теоретичних і практичних проблем селекції є добір рослин за допомогою генетичних маркерів (Marker Assisted Selection, MAS), який дозволяє на якісно новому рівні здійснювати селекційний процес, оскільки поглиблюються знання про генетичну природу ознаки, локалізацію відповідного гена або генів на певній хромосомі. Протягом тривалого часу об'єктом молекулярно-генетичних досліджень було обмежене коло видів рослин. Розвиток технології дослідження ДНК значно розширив спектр сільськогосподарських культур – об'єктів геномних досліджень. Незважаючи на те, що пальчасте просо (*Eleusine coracana*) займає третє місце після сорго та проса серед злакових культур, які культивуються на малородючих і посушливих ґрунтах, на сьогоднішній день є всього декілька робіт, де за допомогою молекулярних

маркерів охарактеризовано генетичну різноманітність цього виду [13, 10, 8, 14, 11].

У результаті раніше проведених досліджень нами були отримані соматоклональні варіанти пальчастого проса, які містять підвищену кількість вуглеводів, характеризуються підвищеним приростом біомаси та ранніми строками дозрівання, а також високою врожайністю насіння. Один з цих соматоклонів став джерелом для створення високопродуктивного сорту пальчастого проса Ярослав-8. Відомо, що *E. coracana* є тетраплоїдом ($2n=4x=36$) та за морфологічними ознаками подібний до *E. indica* ($2n=18$) та *E. africana* ($2n=36$). Проведений цитологічний аналіз засвідчив, що *E. indica* є донором одного з геномів (AA) для культурного виду *E. coracana* (AABB) [9]. Тому оцінка філогенетичних взаємовідносин між *E. coracana* та *E. indica*, а також генетичного поліморфізму за допомогою молекулярно-генетичних маркерів залишається одним із пріоритетних та актуальних завдань сьогодення.

Матеріали і методи

У роботі використовували два сорти *E. coracana*, отримані методами класичної селекції (Тропіканка і Євгенія) [6], три соматоклони *E. coracana* (SE-7 (сорт Ярослав-8), SE-1, SE-4) [3, 1], які було отримано від сорту Тропіканка, та три генотипи *E. indica*, два з яких (*E. indica* CAL 4A-21, *E. indica* CAL 4A-1) є стійкими до дії динітроанілінових гербіцидів і були любязно надані професором У.В. Баярдом (Мічиганський Університет, США).

ДНК виділяли із свіжого листя за допомо-

гою ЦТАБ-методу [7]. Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі, а також спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» з визначенням її концентрації. Для аналізу використовували 3 олігонуклеотидні праймери до мікросателітних послідовностей з двома селективними нуклеотидами на 3'-кінці та один праймер без них (табл. 1). Праймери було синтезовано на приладі AB 3400 DNA Synthesizer з наступною доочисткою (ЦККП «Гентест», Інститут харчо-

вої біотехнології та геноміки НАН України). Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ суміші dNTPs, 2,5 одиниці Taq-полімерази (Реплікон, Росія). Ампліфікацію проводили на

ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США) за наступною схемою: початкова денатурація – 95°C, 5 хв; ампліфікація – 45 циклів (95°C – 1 хв, 40°C – 1 хв, 72°C – 2 хв); кінцева елонгація – 72°C – 7 хв.

Таблиця 1. Праймери, що були використані для аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму представників роду *Eleusine*

Праймер	5'→3' послідовність	Загальна кількість локусів, шт	Поліморфні локуси, шт	Поліморфізм,%	Розмір фрагментів, пн.
ISSR-3	(CT) ₈ TG	5	4	80,0	300–500
ISSR-4	(CA) ₅ GT	7	6	85,7	240–1200
ISSR-16	(AG) ₇ GT	12	11	91,6	250–1300
ISSR-18	(ACTG) ₅	16	16	100	300–1700
Всього:		40	37	92,5	

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі в 1xTBE-буфері в присутності етидії броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували маркери довжини ДНК (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, «Fermentas» (Литва), та 1Kb Plus DNA Ladder, «Invitrogen» (США). За результатами аналізу була створена бінарна матриця на основі виявлених ампліконів за допомогою 4 ISSR-

праймерів. Кожний ISSR-фрагмент розглядався як окремий генетичний локус. Рівень поліморфізму визначали як відношення поліморфних локусів до загальної кількості локусів, визначених з використанням кожного праймера та відображали у відсотках. Генетичні дистанції Нея-Лі [12] розраховували за допомогою програми TREES [4]. У подальшому вони були використані для кластеризації досліджуваних генотипів (UPGMA-метод).

Результати та обговорення

У результаті проведеного ISSR-аналізу було виявлено 40 чітко відтворюваних ампліконів (локусів), з яких 3 (7,5 %) виявились мономорфними для усіх досліджених генотипів. Кількість ампліфікованих фрагментів за умов ПЛР з праймером ISSR-3 склала 5, з ISSR-4 – 7, ISSR-16 – 12 та 16 з праймером ISSR-18. Загальна кількість ампліфікованих фрагментів для *E. coracana* була 27, з яких 22 (81,5 %) виявились поліморфними, тоді як у представників *E. indica* виявлено 28 фрагментів, 21 (75 %) з яких були поліморфними. Слід відмітити, що у групі, яка об'єднує соматрони пальчастого проса, з 18 ампліконів лише 10 (55,5 %) виявились спільними, що вказує на високу диференціюючу здатність використаних праймерів. Більшість ампліфікованих фрагментів мали довжину в межах 300–1300 п.о. Варто відмітити, що для деяких генотипів були виявлені унікальні, характерні лише для них амплікони, які можуть бути цікавими для подальших генетичних та селекційних досліджень. Зокрема, з 8 проаналізованих зразків у 6 було виявлено унікальні фрагме-

нти. Слід зазначити, що їх найбільшу кількість було ідентифіковано у генотипів *E. indica* та сорту Євгенія.

Для оцінки генетичних взаємовідносин між представниками обох видів за сумарними даними ISSR-аналізу було проведено розрахунок генетичних дистанцій (D_N) та кластеризацію досліджених генотипів (рис. 1). У результаті зразки *E. coracana* та *E. indica* були розподілені на два кластери. Значення генетичних дистанцій варіювало в доволі широких межах. Мінімальне значення D_N (0,054) було виявлено між зразками *E. indica* CAL 4A-21 та *E. indica* CAL 4A-1, а найбільше – між сортом Євгенія та *E. indica*. З наведеної дендрограми видно, що генотипи згруповані в два кластери. Перший кластер містить представників *E. coracana*, а другий – об'єднує зразки *E. indica*. У межах кластерів спостерігається розподіл по групах, які відповідають їх генотиповій приналежності, а саме: у *E. coracana* сорт Тропіканка, який був вихідним для отримання сорту Ярослав-8 та соматронів,

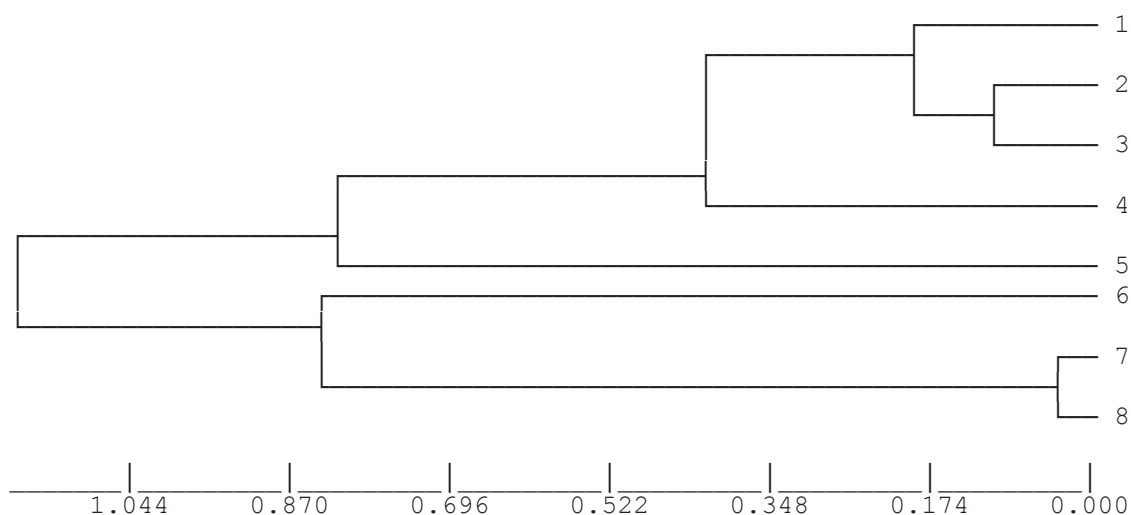


Рис. 1. Дендрограма, що відзеркалює генетичну диференціацію досліджених зразків у межах роду *Eleusine* (побудована на підставі значень D_N): 1–5 *E. coracana* (1 – сорт Тропіканка, 2 – SE-1; 3 – сорт Ярослав-8; 4 – SE-4; 5 – сорт Євгенія); 6 – 8 *E. indica* (6 – IND, 7 – CAL 4A-21, 8 – CAL 4A-1)

об'єднується з ними в одну підгрупу, причому соматоклон SE-4 виявився найбільш віддаленим від вихідного сорту. Сорт Євгенія, отриманий за допомогою методів класичної селекції, виявився максимально генетично диференційованим від соматоклонів та сорту Тропіканка. У групі генотипів *E. indica* дві динітроанілін-стійкі лінії також об'єдналися в одну підгрупу, що свідчить про високий рівень їх генетичної спорідненості. У цілому використані в нашому дослідженні соматоклони *E. coracana* за даними ISSR-аналізу доволі суттєво відрізнялися один від одного та від вихідного сорту Тропіканка, що знайшло віддзеркалення у відмінностях за їх морфологічними, фізіологічними та біохімічними характеристиками [2, 3, 5].

Відомо, що метод ISSR є цінним інструментом не лише для визначення генетичної гетерогенності популяцій, а і для оцінки рівня мі-

нливості калюсів та регенерантів в культурі *in vitro* [15, 16, 17, 18].

Таким чином, отримані дані вказують на існування певних генетичних відмінностей між дослідженими сортами та соматоклонами *E. coracana*, а також лініями *E. indica*, що створює передумови для використання вище зазначених праймерів та ISSR-аналізу в цілому для генетичного маркування генотипів пальчастого проса. Набуття інформації про будову геному *E. coracana* дозволить у майбутньому використовувати інші молекулярні маркери, отримані завдяки сіквенуванню ДНК, що дасть можливість спрямувати подальші дослідження на пошук взаємозв'язку між відповідними генетичними маркерами та господарсько-цінними ознаками пальчастого проса, що значно оптимізує трудомісткий та довготривалий традиційний селекційний процес.

Література

1. А.с. 09551 України на сорт рослин. Назва сорту: Ярослав-8; ботанічний таксон: *Eleusine coracana* (L.) Gaertn., Елевсіна (Дагуса) / Н.О. Стаднічук, Баєр Г.Я., Ємець А.І., Блюм Я.Б. – № 08324001, опубл. 03.11.2008.
2. Баєр Г.Я., Ємець А.І., Стаднічук Н.А., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Соматоклональна варіабельність як джерело для створення нових сортів пальчастого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn // Цитология и генетика. – 2007. – Т.41. – С. 9–15.
3. Баєр Г.Я., Рахметов Д.Б., Стаднічук Н.А., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Соматоклональна варіабельність в культурі *in vitro* как источник получения селекционного материала пальчастого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn // Физиол. биохим. культ. растений. – 2009. – Т.35. – С. 1–8.
4. Календарь Р.Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофоретических данных ДНК и белков: материалы конференции «Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений». – Киев, 1994. – С. 25–26.
5. Рахметов Д.Б., Баєр Г.Я., Стаднічук Н.О., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вивчення біохімічних характеристик соматоклональних варіантів пальчастого проса // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – К.: Логос, 2008. – Т. 5. – С. 430–434.

6. Стадничук Н.О. Интродукция *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. на уровне сорта в Лесостепи Украины // Биологическое разнообразие. Интродукция растений. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 257–259.
7. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moor D.D., Seidman J.G. Current protocols in molecular biology // John Wiley & Sons. – New York, 1987. – P. 4.3.1–4.3.3.
8. Babu B., Senthil N., Gomes S., Biji K., Rajendraprasad N., Kumar S., Babu R. Assessment of genetic diversity among finger millet (*Eleusine coracana* L.) accessions using molecular markers // Genet. Res. Crop Evol. – 2007. – Vol. 54. – P. 399–404.
9. Dida M.M., Devos K.M. Finger millet // Genome mapping and molecular breeding in plants. Cereals and millets / eds. C. Kole. – Heidelberg: Springer, 2006. – P. 333–343.
10. Fakrudin B., Shashidhar H.E., Kulkkarni R.S., Hittalmani S. Genetic diversity assessment of finger millet, *Eleusine coracana*, germplasm through RAPD analysis // Plant Genet. Res. Newsl. – 2004. – Vol. 138. – P. 50–54.
11. Kumar A., Sharma N., Panwar P., Gupta A. Use of SSR, RAPD markers and protein profiles based analysis to differentiate *Eleusine coracana* genotypes differing in their protein content // Mol. Biol. Rep. – 2012. – Vol. 39. – P. 4949–4960.
12. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
13. Parani M., Rajesh K., Lakshmi M., Parducci L., Szmidt A.E., Parida A. Species identification in seven small millet species using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of trnS-psbS gene region // Genome. – 2001. – Vol. 44. – P. 459–499.
14. Sinha A., Pande A. Finger printing of *Eleusine coracana* L. (Gaertn.) using microsatellite markers // Bioresearch Bull. – 2010. – Vol. 2. – P. 51–58.
15. Joshi P., Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay // Biol. Plantarum. – 2007. – Vol. 51. – P. 22–26.
16. Hu J., Gao X., Liu J., Xie C., Li J. Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers // Botanical Studies – 2008. – Vol. 49. – P. 189–197.
17. Бублик О.М., Андреев І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А. Мінливість міжмікросателітних ділянок геному (ISSR) у культурі тканин *Ungernia victoris* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. – К.: Логос, 2010. – Т. 9. – С. 8–12.
18. Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кравець Н.Б., Твардовська М.О., Кунах В.А. RAPD- та ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2001. – Т. 9, №1. – С. 21–35.

BAYER G.Ya.¹, PIRKO Ya.V.¹, STADNICHUK N.A.², RAKHMETOV D.B.², YEMETS A.I.¹, BLUME Ya.B.¹

¹*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net*

²*M.M. Grishko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 01014, Kyiv, Timiryazevska str., 1*

STUDYING THE GENETIC VARIATION OF *ELEUSINE CORACANA* (L.) GAERTN. AND *ELEUSINE INDICA* (L.) GAERTN. GENOTYPES BY ISSR-ANALYSIS

Aims. The aim of investigation is the applicability of ISSR markers for uncovering polymorphism to study the relationships between *Eleusine coracana* and *Eleusine indica* genotypes. **Methods.** Eight genotypes were analyzed using four primers. Extracted DNA was successfully used for study by ISSR-PCR method. The genetic distances were used to construct the UPGMA dendrogram which characterized relationships between studied genotypes. **Results.** The level of genetic polymorphism of *E. coracana* is 81,5 % and *E. indica* – 75 %. The unique fragments have been revealed in 6 genotypes. The studied genotypes were divided in two clusters according their genetic background. **Conclusions.** It was shown that ISSR analysis is the useful method for fingerprinting and determination of relationships between the different *E. coracana* and *E. indica* genotypes.

Key words: *Eleusine coracana*, *Eleusine indica*, ISSR-PCR, polymorphism, genetic distances.