

УДК 577.21:633.174

Г. Ю. ШЕВЧУК, к. б. н., асист.

Од. нац. мед. ун-т

e-mail: shanni2901@mail.ru

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВИДІВ РОДУ *SORGHUM MOENCH*

*Проведено аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму геному сорго на міжвидовому і внутрішньовидовому рівнях. Уточнено генетичне походження соризу. Створено тест-панель 15 мікросателітних маркерів з високою дискримінаційною здатністю. Оцінено генетичну чистоту ліній сорго за даними маркерами. Проаналізовано алейний склад SSR-локусів та створено базу даних ДНК-типуювання ліній сорго, що культивуються на Півдні України.*

Ключові слова: *Sorghum Moench*, полімеразна ланцюгова реакція, мікросателіти, геном, поліморфізм.

**Вступ.** Досягнення молекулярної генетики та геноміки зробили вагомий внесок у розвиток загальної біології та відкрили широкі можливості для використання новітніх технологій у сільськогосподарській практиці. Сучасний напрям у дослідженнях теоретичних і практичних проблем рослинництва базується на вивченні поліморфізму геному того чи іншого виду за допомогою молекулярних маркерів. До певного часу об'єктом генетичних і молекулярно-генетичних досліджень було обмежене коло видів рослин — горох, кукурудза. З розвитком технології вивчення ДНК розширився спектр сільськогосподарських культур — об'єктів геномних досліджень. Услід за пшеницею, ячменем, соняшником почались дослідження такої важливої культури, як сорго.

Сорго (*Sorghum bicolor* Moench) культивується в 85 країнах світу і є однією з п'яти найважливіших злакових культур [1]. Вирощування його в посушливих умовах Південного Степу України, як найбільш посухостійкої кормової та зернової культури, має велике значення. Сорго також виявилось придатною сировиною для виробництва біоетанолу. Йому властиві значне еколого-географічне та сортове різноманіття, велика кількість проміжних форм, що істотно ускладнює класифікацію. Наявна таксономія заснована на двох підходах: ботанічному (оцінка основних морфологічних ознак сорго) та практичному (опис господарських ознак) [2, 3]. При класифікації роду *Sorghum* Moench найбільш часто використовують другий підхід.

Кілька десятиліть тому в ряді селекційних центрів України та Молдови створено нову культуру — сорго рисозерне, сориз (*Sorghum oryzoidum*),

яка має високу харчову цінність і використовується для одержання високоякісних круп'яних виробів [4]. Походження та класифікація соризу на сьогодні недостатньо визначені, оскільки ідентифікація здійснюється за морфологічними та агрономічними ознаками. Застосування ж молекулярних маркерів в оцінці варіабельності видів та сортів рослин дозволяє виявити генетичні взаємовідносини та уточнити систематику родів рослин найважливіших сільськогосподарських культур [5, 6]. У цьому плані ДНК-маркери, які генеруються в результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), можуть виявитися важливим допоміжним інструментом і для класифікації сорго.

**Мета:** оцінка молекулярно-генетичного різноманіття видів роду *Sorghum* та розробка ідентифікаційної системи маркерів.

**Матеріал і методи.** Матеріалом слугували 15 ліній чотирьох видів сорго: сорго звичайного (НК-180; K35–Є5; НК–5418; НК–2517; НК–1486), цукрового (Одеська 1820; 1969 Буджак; Одеська 2111; Одеська 2113; 2179 Буджак), вінікового (2645 Буджак; 2806 Буджак; 2778 Буджак), суданського (2810 Буджак; Суданка 1); п'ять ліній соризу (4005 Буджак; 2265 Буджак; 721/I; 1/II; Одеська 302), п'ять сортів рису: Пам'яті Гічкіна, Преміум, Дебют, Віконт, Україна; лінія кукурудзи ГК 26.

Виділяли ДНК і ПЛР згідно відомої методики [8]. Продукти ПЛР фракціонували у 10,0 %-му поліакриламідному гелі в ТВЕ-буфері. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили згідно [9]. Кластерний аналіз з графічною побудовою дендрограм здійснювали за комп'ютерною програмою «TREES 4.0». Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках — як відношення поліморфних ПЛР-локусів до загального числа детектованих ПЛР-локусів:

$$P = n_p / (n_p + n_{np}) \times 100 \%,$$

де  $n_p$  — кількість поліморфних ПЛР-локусів, а  $n_{np}$  — кількість неполіморфних ПЛР-локусів.

Для кожного SSR-локусу визначали індекс поліморфності (Polimorphic Index Content), PIC за формулою:

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

де  $f_i^2$  — частота  $i$ -го алеля.

**Результати досліджень та обговорення.** Для виявлення генетичного різноманіття та філогенетичних відношень обрані зразки сімейства злакових — кукурудза та рис. Кукурудзу обрано для порівняльного аналізу у зв'язку з тим, що вона фенотипово і генетично найбільш близька до сорго, а рис — для оцінки достовірності однієї з гіпотез про походження соризу як гібрида звичайного хлібного сорго з дикорослими формами рису.

ПЛР-аналіз з застосуванням 10 довільних праймерів дозволив диференціювати досліджені види сімейства злаків. Отримані унікальні для кожного зразка спектри ампліфікації ДНК, які включали від 10 до 23 ком-

понентів. Проаналізовано 183 амплікони. Рівень поліморфізму між зразками вибірки, що належать до різних родів та видів, склав 99 %.

Дендрограма об'єднала зразки, що належать до трьох родів: *Sorghum*, *Zea*, *Oryza*. Генетична дистанція між кластером А, який містить зразки роду *Sorghum*, та представником роду *Zea* складає 0,925. Між тим, *Zea* і *Oryza* віддалені один від одного з коефіцієнтом 0,939 (рис. 1). Це ілюструє значну генетичну віддаленість роду *Sorghum* від його найближчих родичів. Такий розподіл співпадає з загальним уявленням систематики злаків.

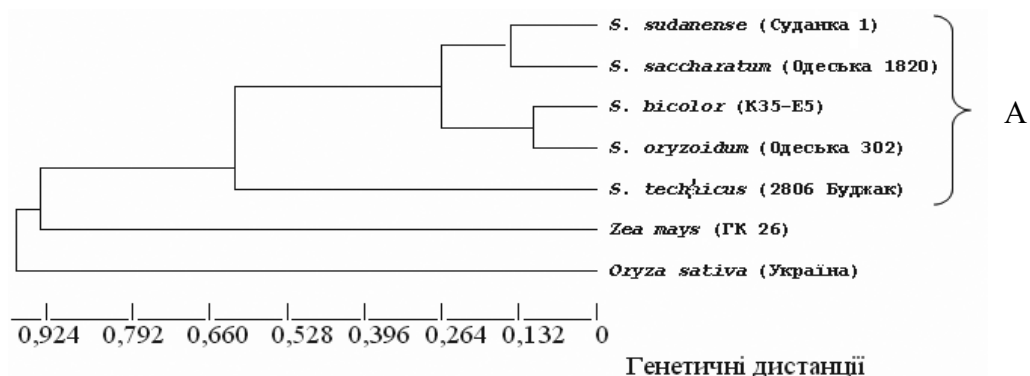


Рис. 1. Дендрограма між- та внутрішньородових взаємовідносин злакових за даними ДНК-типування за багатолокусними маркерами

Сориз знаходиться в одному кластері з іншими представниками роду сорго, на максимальних відстанях від кукурудзи та рису, мінімальна генетична дистанція виявлена між соризом та звичайним сорго. Отже, на основі молекулярно-генетичного аналізу можна зробити висновок, що сориз є формою сорго.

Використання ПЛР із 10 довільними праймерами дозволило диференціювати 20 генотипів сорго і оцінити між- та внутрішньовидовий поліморфізм цих зразків. Спектри ампліфікації ДНК були унікальні для кожної лінії і включали від 14 до 23 компонентів. Проаналізовано 188 ампліконів, з яких 180 — поліморфні. Рівень поліморфізму між зразками вибірки склав 96,2 %. Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,111 до 0,787 [9]. Кластеризація генотипів за даними багатолокусної системи маркерів відбиває належність зразків даної вибірки до груп, які відповідають ідентифікації за господарськими ознаками.

Для перевірки гіпотез походження соризу застосовували ПЛР-аналіз мікросателітних (МС) локусів. З метою детекції можливої присутності фрагментів рису в геномі соризу використовували 20 МС маркерів рису та 10 МС маркерів сорго. При ампліфікації послідовностей 10 МС локусів сорго отримали ДНК-спектри двох зразків соризу, чотирьох ліній сорго та чотирьох сортів рису. За МС локусами сорго Sb6–36 та Sb6–84 у всіх сортів рису виявлено продукти ампліфікації, аналогічні тим, що визна-

чені для зразків сорго. При ампліфікації 20 МС локусів рису отримано амплікони для всіх досліджуваних зразків. За сімома МС локусами рису (RM105, RM125, RM259, RM338, RM452, RM489 та RM552) виявлено продукти ампліфікації для двох зразків соризу та для деяких видів роду *Sorghum*. Для лінії Суданка 1 та ліній соризу Одеська 302 та 4005 Буджак визначені алелі МС локусів RM259 та RM338, які не характерні для досліджених зразків рису. Вищенаведене може свідчити про те, що сориз, отриманий унаслідок гібридизації видів сорго, несе фрагменти ДНК *Sorghum sudanense*. За сумарними даними ПЛР-аналізу МС локусів сорго та рису зразки на дендрограмі розподілились у два кластери (рис. 2). Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,226 до 0,994. Перший кластер містить представників роду *Sorghum*, при цьому найближчим до представників соризу є зразок *S. sudanense* — лінія Суданка 1. Другий кластер об'єднує зразки рису. На основі молекулярно-генетичного аналізу МС локусів сорго та рису виявлено, що у соризу нема фрагментів ДНК рису.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз різних фракцій геному сорго за молекулярними маркерами, що дозволило виявити високий рівень поліморфізму роду та близьку спорідненість соризу з звичайним та трав'янистим сорго [10].

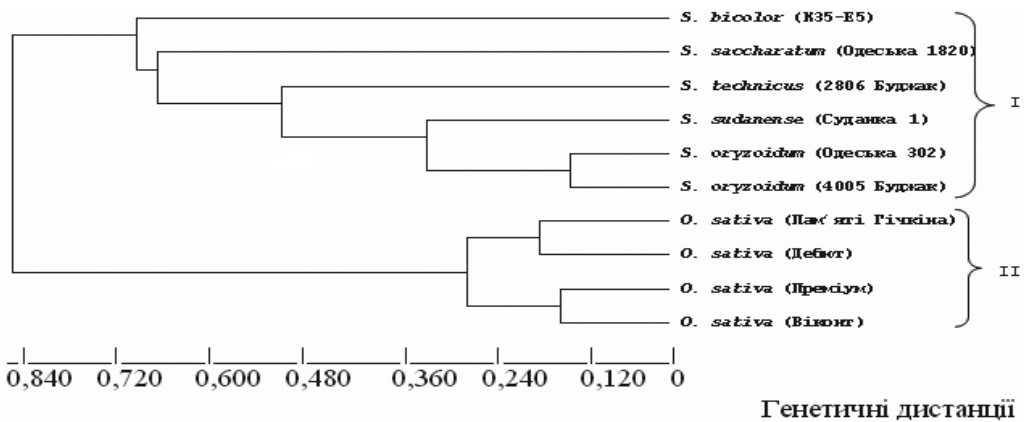


Рис. 2. Сумарна дендрограма генетичних взаємовідносин зразків сорго та рису за даними ПЛР-аналізу МС локусів сорго та рису

Запропоновано систему ідентифікації генотипів сорго за даними ДНК-профілювання 15 мікросателітних локусів, які локалізовані на різних хромосомах і виявляють поліморфізм у дослідженій вибірці генотипів. Для оцінки дискримінаційного потенціалу маркерної системи вивчали 20 ліній сорго та соризу. Число алелів на локус варіювало від трьох до восьми, середня кількість алелів на локус — 5. Середнє значення PIC 0,68 [11].

Рівень інформативності маркерної системи виявився достатнім для диференціації проаналізованих зразків. За трьома високополіморфними локусами — Sb4–121, Sb6–57, Sb6–84, які показують значення PIC 0,81,

0,79 та 0,76, відповідно оцінили генетичну однорідність ліній сорго. Внутрішньолінійної гетерогенності не виявлено [12, 13].

**Висновки.** Рівень міжродового поліморфізму видів сорго та інших злаків склав 99 %, що свідчить про значну генетичну віддаленість роду *Sorghum* від його найближчих родичів. Значний рівень між- та внутрішньовидового поліморфізму роду *Sorghum* (96,2 %) засвідчує широку мінливість ліній Півдня України. За багатолокусними та мікросателітними маркерами виявлено близьку спорідненість соризу зі звичайним і трав'янистим сорго та віддаленість його від рису. Сориз є формою сорго і не несе фрагментів ДНК рису. Розроблено систему реєстрації ліній сорго у вигляді молекулярно-генетичних формул — за алельним складом мікросателітних локусів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Islam-Faridi M. N. A molecular cytogenetic map of *Sorghum* chromosome 1: fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes / M. N. Islam-Faridi, K. L. Childs, P. E. Klein [et al.] // *Genetics*. — 2002. — Vol. 161, № 367. — P. 345–353.
2. Иванюкович Л. К. Обзор классификации сорго *Sorghum Moench* / Л. К. Иванюкович, Ю. А. Доронина // *Тр. по прикл. бот., ген. и сел.* — 1980. — Т. 69, вып. 1. — С. 18–27.
3. Демиденко В. Г. Сорго / В. Г. Демиденко. — Москва : Гос. изд-во сел. литературы, 1957. — 158 с.
4. Дремлюк Г. К. Сорго на изломе эпох. Приемы и методы селекции : монография / Г. К. Дремлюк. — Одесса : СГІ–НЦСС, 2008. — 243 с.
5. Кожухова Н. Э. Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика*. — 2006. — № 5. — С. 82–93.
6. Сиволап Ю. М. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів / Ю. М. Сиволап, В. В. Волкодав, М. С. Бальвінська, Н. Е. Кожухова, А. Є. Солоденко, С. В. Чеботар. — Одеса : Інтерпринт, 2004. — 14 с. (метод. рек.).
7. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г. Е. Сулимова // *Успехи современной биологии*. — 2004. — Т. 124, № 3. — С. 260–271.
8. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (науч.-метод. руковод.). — К. : Аграрная наука, 1998. — 156 с.
9. 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. 43, № 2. — С. 47–53.
10. Галаев О. В. Молекулярно-генетический анализ геному соризу *Sorghum oryzoidum* / О. В. Галаев, Г. Ю. Шевчук, В. В. Дудченко, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика*. — 2011. — Т. 45, № 4. — С. 9–15.
11. Деклараційний патент на корисну модель 48475, Україна «Спосіб реєстрації генотипів сорго» / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, Г. Ю. Шевчук. Південний

- біотехнологічний центр в рослинництві, дата подання 13.07.09; дата публікації 25.03.10. Бюл. № 6.
12. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична ідентифікація та реєстрація ліній, сортів, гібридів сорго / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, Г. Ю. Шевчук. — Одеса : Інтерпринт, 2010. — 12 с.
  13. Шевчук Г. Ю. ДНК-технології в дослідженні геному сорго / Г. Ю. Шевчук, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Вісник Одеського національного університету. (Серія «Біологія»). — 2010. — Т. 15, вип. 6. — С. 57–63.

Надійшла 10.06.2015.

UDC 577.21:633.174

**Shevchuk G. Yu.** Odessa National Medical University

### **MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF SPECIES OF THE GENUS *SORGHUM MOENCH***

The analysis of molecular genetic polymorphism of sorghum genome on the interspecific and intraspecific levels. The genetic origin of sorghum was refined. The 15 SSR-marker test-panel with high discriminatory ability was created. The genetic purity of the investigated lines was evaluated according to the analyzed markers. The allelic composition of SSR-loci and DNA typing database of sorghum lines cultivated in the south Ukraine was created.

УДК 577.21:633.174

**Шевчук А. Ю.**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ РОДА *SORGHUM MOENCH***

Проведен анализ молекулярно-генетического полиморфизма генома сорго на межвидовом и внутривидовом уровнях. Уточнено генетическое происхождение сорго. Создана тест-панель 15 микросателлитных маркеров с высокой дискриминационной способностью. Оценена генетическая чистота линий сорго по данным маркерам. Проанализирован аллельный состав SSR-локусов и создана база данных ДНК-типирования линий сорго, культивируемых на Юге Украины.