

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 631.52:635.652

RAPD-АНАЛІЗ ГЕНОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РІЗНИХ ВИДІВ РОДУ *PHASEOLUS* L.

© 2012 р. Л. В. Головань, В. К. Пузік

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)*

Вивчено генетичне різноманіття 25 зразків квасолі (*Phaseolus* L.) чотирьох видів. Використання методу RAPD-аналізу дозволило диференціювати на молекулярно-генетичному рівні види й зразки квасолі зарубіжної і вітчизняної селекції та встановити генетичні взаємозв'язки між ними. Результати досліджень свідчать про віддаленість видів один від одного (кожен вид виділився в окремий кластер). Це підтверджується відсутністю фрагментів, спільних для усіх видів, а також невеликою кількістю ампліконів, спільних у межах дослідженої вибірки окремого виду. Результати оцінки міжвидового поліморфізму представників роду *Phaseolus* L. узгоджуються з основними класифікаціями роду, що ґрунтується на анатомо-морфологічних ознаках.

Ключові слова: *Phaseolus vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A. Grau., *Ph. multiflorus* Lam., RAPD-аналіз, кластер, генетичне різноманіття

Збереження і вивчення генетичних ресурсів рослин є актуальним генетико-селекційним завданням. Оцінка генетичного різноманіття вихідного селекційного матеріалу, характеристика існуючого генофонду, визначення ступеня спорідненості зразків потребують наявності точних, надійних та ефективних методів ідентифікації. Молекулярні маркери – сучасні інструменти для вирішення теоретичних і практичних проблем селекції та генетики. Добір з їх допомогою (Marker Assisted Selection – MAS) дозволяє на якісно новому рівні здійснювати селекційний процес (Малышев и др., 2005; Бурляева и др., 2007; Коновалов и др., 2008; Рисованная, 2009). Перевагою його використання є можливість вивчення генетичного контролю ознаки, локалізації відповідного гена чи генів у хромосомі (Кочиева и др., 2001; Сиволап и др., 2008).

Одним із варіантів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є ДНК з праймерами вільного нуклеотидного складу (RAPD), вони дозволяють досліджувати велику кількість локу-

сів, які представляють різні ділянки геному (Календарь и др., 2002), що має велике значення при визначенні філогенетичних зв'язків між видами та генетичної мінливості у окремих генотипів (Бурляева и др., 2007).

Вивчення генетичної різноманітності та філогенетичних зв'язків є актуальним для розроблення селекційних програм. Такий підхід дає можливість добирати сорти чи популяції для схрещування, що мають бажані ознаки та генетично віддалені один від одного (Смирнов, 2005). Одним із основних завдань селекційної роботи є диференціація вихідного матеріалу за ступенем генетичної близькості. Сорти, популяції та селекційні форми, що використовуються у селекційній роботі, досить різноманітні за проявом ознак і їх походження не завжди відоме. ДНК-технології дають можливість виявляти як міжвидову, так і внутрішньовидову мінливість, розподіляти та класифікувати селекційний матеріал залежно від рівня генетичної близькості.

У дослідженнях квасолі звичайної використано різні типи маркерів (RLFP, RAPD та ISSR). Для квасолі побудова генетичних карт може бути полегшена використанням RAPD-аналізу. Це дозволило відкрити молекулярно-

Адреса для кореспонденції: Головань Лариса Володимирівна, Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, п/в «Комуніст-1» Харків, 62483, Україна; e-mail: 11985kl@mail.ru

генетичні маркери пов'язані з генами стійкості до хвороб (Miklas et al., 1993). Так, RAPD-аналіз використовується у селекції квасолі для визначення генів стійкості до кутової плямистості листків (Eveline et al., 2003), стійкості до антракнозу (Rodrigues-Suarez et al., 2007), до вірусу жовтої мозаїки (Matthew et al., 2007), іржі (Jung et al., 1996), бактеріального в'янення (Yu et al., 1998). Була проведена якісна та кількісна характеристика RAPD-поліморфізму (Skroch et al., 1995).

Здійснена оцінка генетичного різноманіття та встановлені генетичні зв'язки виду *Ph. vulgaris* зразків італійської селекції (Marotti et al., 2007), за допомогою RAPD-аналізу вдалося згрупувати американські зразки залежно від їх місця створення (Métais et al., 2000). Шляхом використання 50 RAPD праймерів (Skroch et al., 1995) при вивченні зразків з Танзанії було встановлено, що вони на 60% генетично подібні (Briand et al., 1998), вивчено колекцію зразків з південної Бразилії (Maciel et al., 2001).

Досліджувалася генетична мінливість *Ph.*

lunatus з використанням 16 диких та 30 культурних форм (Fofana et al., 1997), які розділилися на дві групи – американську та андійську. Також були проведені дослідження *Ph. multiflorus* з використанням трьох RAPD-праймерів (Acampora et al., 2007).

Проте зразки української селекції у цьому плані залишаються невивченими. Метою нашої роботи був аналіз різних рівнів генетичної мінливості, встановлення генетичних дистанцій та філогенетичних зв'язків у межах роду *Phaseolus* L. за допомогою RAPD-аналізу.

МЕТОДИКА

Як рослинний матеріал використовували 25 зразків квасолі з колекції Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва (ХНАУ) та Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ) (табл. 1). Зразки інтродуковані з різних еколого-географічних зон (Україна, Болгарія, Туреччина, Франція, США, Філіппіни, Росія, Іран,

Таблиця 1. Перелік зразків квасолі, що вивчалися

№ з/п	№ Національного каталогу України	Назва зразка	Країна походження
<i>Ph. vulgaris</i> (L.) Savi			
1	UD0300775	Докучаєвська	Україна
2	UD0300025	Первомайська	Україна
3	UD0501709	-	Україна
4	UD0501722	-	Україна
5	UD0503341	-	Україна
6	UD0503256	-	Україна
7	UD0500045	Прелом	Болгарія
8	UD0501043	Horoz	Туреччина
9	UD0500223	Isex	Франція
10	UD0500227	Holberg	США
<i>Ph. lunatus</i> L. Ssp. <i>Microsperma</i>			
11	UD0302220	Пестропалевая	Росія
12	UD0303348	Gezentye Bab	Угорщина
13	UD0303348	Henderson	США
14	UD0303247	Three Color Poll	США
15	UD0301530	Koro Irion	Філіппіни
<i>Ph. multiflorus</i> Lam			
16	UD0300461	Місцева 15	Україна
17	UD0301762	-	Україна
18	UD0303436	-	Україна
19	UD0303446	Blanka	Польща
20	UD0300843	-	Німеччина
<i>Ph. acutifolius</i> A Grau			
21	UD0301625	-	Україна
22	UD0301237	Accutifolius	Німеччина
23	UD0301869	Зард американ	Іран
24	UD0300124	PI 440798	Мексика
25	UD0300498	PI 476858	Мексика

RAPD-АНАЛІЗ ГЕНОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ

Таблиця 2. Праймери та їх послідовності

Праймер	Нуклеотидна послідовність
OAC20	5'-ACGGAAGTGG-3'
OPF10	5'-GGAAGCTTGG-3'
OPI-19	5'-AATGCGGGAG-3'
OPU-01	5'-ACGGACGTCA-3'
OPZ-04	5'-AGGCTGTGCT-3'
OPW-04	5'-CAGAAGCGGA-3'
OPW-06	5'-AGGCCCGATG-3'
OPW-10	5'-TCGCATCCCT-3'
P28	5'-CAAACGTCGG-3'
P37	5'-CTGACCAGCC-3'

Мексика та ін.) і належать до чотирьох видів: *Ph. vulgaris* (L.) Savi, *Ph. lunatus* L. Ssp. *Microsperma*, *Ph. acutifolius* A. Grau, *Ph. multiflorus* Lam. Вибір рослинного матеріалу пов'язаний з його використанням у селекційному процесі зі створення вихідного матеріалу квасолі.

RAPD-аналіз. ДНК виділяли з 10 зрілих насінин цетавлонним методом (Ausubel et al., 1987). Отриману ДНК перевіряли в 1% агарозному гелі у присутності бромистого етидію. Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра.

Умови ампліфікації. Поліморфізм RAPD-локусів вивчали методом ПЛР. Ампліфікацію проводили з використанням наборів для ПЛР (GenePak™ PCR Core). Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл і містив 20 нг геномної ДНК та 0,2 мкМ праймера. В епендорфи зверху суміші наливали 20 мкл мінерального масла. У роботі було використано 10 праймерів з вказаною послідовністю (табл. 2). Ампліфікацію проводили на чотириканальному програмованому термостаті ТП4-ПЦР-01 «Герцик» за таких умов: 1 цикл – денатурація при 94°C (5 хв), 45 циклів: 94°C (1 хв), відпал – 36°C (1 хв), елонгація – 72°C (2 хв), 1 цикл – фінальна елонгація, 72°C (7 хв). За даних умов результати ампліфікації відтворювалися. Кожен аналіз проводився у дворазовому повторенні.

Електрофорез ДНК. Розподіл продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 2% агарозному гелі у присутності бромистого етидію. Як електродний та буфер для гелю використовували ТРІС-ЕДТА-боратну буферну систему – 0,09 М ТРІС, 0,09 М Н₃ВО₃, 0,0031 М ЕДТА (рН 8,3). Електрофорез проводили у горизонтальному приладі Hoefer SuperSub100 (Brody et al., 2004). Як маркер для визначення розмірів ампліфікованих фрагментів використовували 1 kb DNA leader.

Візуалізацію результатів аналізу здійснювали за допомогою транслюмінатора ТСР-20 з наступним фотографуванням гелів в УФ-променях.

Статистична обробка даних. Визначення кількості та розмірів продуктів ампліфікації проводили за допомогою програмного пакета "TotalLab TL120". За результатами аналізу були створені бінарні матриці в яких було позначено «присутність» (1) чи «відсутність» (0) амплікона. Аналіз генетичного різноманіття проводили обчисленням генетичних дистанцій за Nei, Li (1979). Кластеризацію та побудову дендрограм, що показує філогенетичні зв'язки між вивченими зразками квасолі, проводили методом NJ (близьких сусідів) за допомогою пакета програм Phylip-3.69 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

Статистичну достовірність утворення кластерів в отриманих деревах оцінювали за допомогою бутстреп-аналізу у програмі PHYLIP. Оцінка бутстреп-значень була проведена у 1000 повторностях.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Нами було вивчено генетичне різноманіття 25 зразків квасолі чотирьох видів різного еколого-географічного походження (Україна, Росія, США, Болгарія, Мексика, Туреччина та ін.). Ампліфікація з довільними праймерами дозволила виявити високу спорідненість продуктів ампліфікації між зразками одного виду та велику міжвидову відмінність, що дає змогу навіть без побудови відповідних дендрограм ідентифікувати особини одного виду.

Вивчені праймери дозволяють виявити на електрофореграмах від 14 до 22 продуктів ампліфікації у різних видів роду *Phaseolus* L. У цілому було ідентифіковано 173 локуси. Молекулярний розмір виявлених ампліконів був у межах 100–2759 п.н. (табл. 3). Загалом за всіма вивченими видами квасолі відзначено досить ви-

Таблиця 3. Поліморфізм різних видів квасолі за RAPD-локусами

Вид	Кількість локусів, шт	Кількість моно-морфних локусів, шт	Кількість поліморфних локусів, шт	Рівень поліморфізму, %	Розмір ампліфікованих фрагментів, min-max п.н.	Кількість унікальних ампліконів, шт.	Частка унікальних ампліконів, %
<i>Ph. vulgaris</i>	98	11	87	88,8	100-2759	30	30,0
<i>Ph. lunatus</i>	58	18	40	69,0	201-1978	12	20,7
<i>Ph. multiflorus</i>	61	35	26	43,0	125-2380	10	16,4
<i>Ph. acutifolius</i>	56	21	35	62,5	100-1351	17	30,3

Таблиця 4. Унікальні амплікони виявлені при міжвидовому аналізі з використанням RAPD-маркерів

№	Зразок	Вид квасолі	Розмір амплікона	Маркер
1	Holberg	<i>Ph. vulgaris</i>	1621 п.н.	OAC20
2	UDO501722	<i>Ph. vulgaris</i>	1232 п.н.	
3	UDO503341	<i>Ph. vulgaris</i>	1570 п.н.	OPI19
4	Geszentye Bab	<i>Ph. lunatus</i>	678 п.н., 513 п.н.	
5	Isex	<i>Ph. vulgaris</i>	1169 п.н.	OPU01
6	Зард Американ	<i>Ph. acutifolius</i>	815 п.н.	
7	Докучаєвська	<i>Ph. vulgaris</i>	1935 п.н., 1570 п.н.	
8	Henderson	<i>Ph. lunatus</i>	758 п.н.	OPF10
9	Accutifolius	<i>Ph. acutifolius</i>	284 п.н.	
10	Blanka	<i>Ph. multiflorus</i>	2380 п.н., 1678 п.н.	OPW06
11	Докучаєвська	<i>Ph. vulgaris</i>	1500 п.н.	
12	Geszentye Bab	<i>Ph. lunatus</i>	1419 п.н.	OPW10
13	UDO503341	<i>Ph. vulgaris</i>	823 п.н.	
14	Первомайська	<i>Ph. vulgaris</i>	112 п.н.	
15	Докучаєвська	<i>Ph. vulgaris</i>	2759 п.н.	OPW04
16	UDO503341	<i>Ph. vulgaris</i>	2226 п.н., 1146 п.н., 255 п.н.	P28
17	Isex	<i>Ph. vulgaris</i>	100 п.н.	
18	UDO503341	<i>Ph. vulgaris</i>	1300 п.н.	
19	Зард Американ	<i>Ph. acutifolius</i>	450 п.н.	P37
20	Accutifolius	<i>Ph. acutifolius</i>	250 п.н.	
21	Geszentye Bab	<i>Ph. lunatus</i>	1177 п.н.	OPZ04
22	PI440798	<i>Ph. acutifolius</i>	600 п.н., 230 п.н.	

сокий рівень поліморфізму, детектований за допомогою RAPD-аналізу. Даний показник залежить як від нуклеотидного складу використаних праймерів, так і від виду протестованих рослин. Зокрема, нами для RAPD-аналізу зразків квасолі були використані праймери, що показали високий рівень поліморфізму у виду *Ph. vulgaris* (Haley et al., 1993; Miklas et al., 1995). З іншого боку, вид квасолі *Ph. multiflorus* є перехреснозапильним і має високий рівень генетичної мінливості.

При міжвидовому аналізі для зразків було ідентифіковано унікальні присутні в одному

генотипі фрагменти (табл. 4). Так, за праймером OAC-20 унікальними виявилися ділянки розміром 1621 п.н. (Holberg, США) та 1232 п.н. (UDO501722, Україна). Найбільшу кількість унікальних ампліконів було виявлено з використанням праймера OPF10 – 1935 п.н. та 1570 п.н. (Докучаєвська, Україна), 758 п.н. (Henderson, США), 284 п.н. (Accutifolius, Німеччина) та OPW10: 1500 п.н. (Докучаєвська, Україна), 1419 п.н. (Geszentye Bab, Угорщина), 823 п.н. (UDO503341, Україна), 112 п.н. (Первомайська, Україна). Ці ділянки можуть слугувати маркерами конкретного сорту.

RAPD-АНАЛІЗ ГЕНОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ

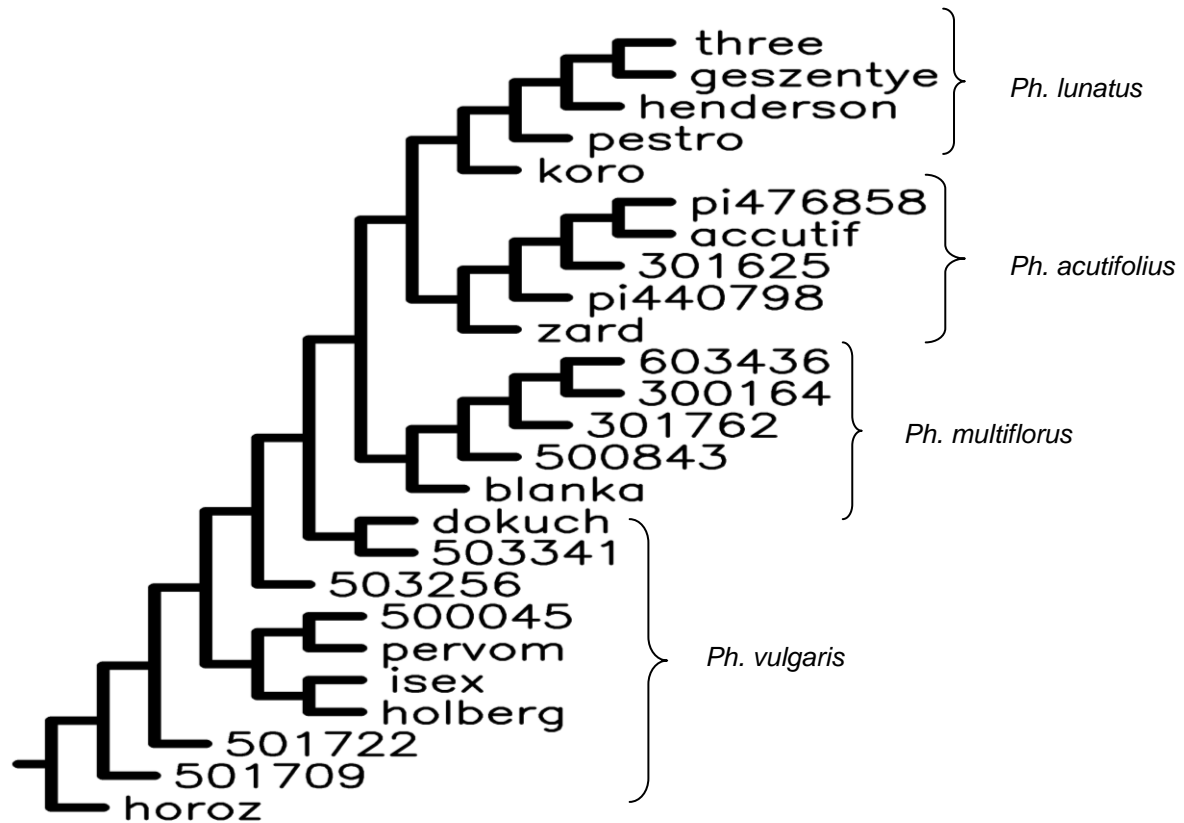


Рис. 1. Дендрограма філогенетичних зв'язків між зразками квасолі за RAPD-аналізом.

Мономорфні компоненти були виявлені лише у межах кожного виду. При міжвидовому аналізі всі локуси були поліморфні. На основі даних RAPD-аналізу була отримана матриця генетичних дистанцій Nei і Li, яка надалі використовувалася для вивчення генетичних взаємозв'язків між зразками квасолі різних видів за допомогою кластерного аналізу. Найбільші генетичні дистанції були виявлені для видів *Ph. vulgaris* та *Ph. acutifolius*. Найменшими генетичними дистанціями характеризувалися види *Ph. vulgaris* та *Ph. multiflorus*.

У результаті кластеризації зразків квасолі методом приєднання ближчих сусідів з наступним бутстреп-аналізом було виділено чотири кластери (рис. 1).

У генотипів, об'єднаних у перший кластер, були виявлені такі мономорфні локуси: OF-10 (952 п.н., 710 п.н.), OPW-06 (1163 п.н., 885 п.н., 421 п.н., 328 п.н.), OPW-04 (1363 п.н., 1164 п.н., 587 п.н.), OPZ-04 (702 п.н., 569 п.н.) (табл. 5). Присутність спільних ампліконів для всіх досліджених генотипів цього кластера виявляє консервативні ділянки геному, що свідчить про єдине походження таксонів. Останні локуси були поліморфними. Наявність поліморфних фрагментів ДНК демонструє відносно високий внутрішньовидовий та внутрішньопідвидовий, а також індивідуальний поліморфізм,

який пояснюється присутністю у геномі виду *Ph. vulgaris* високо повторюваних послідовностей. Всього серед зразків цього кластера ампліфіковано 98 локусів, серед яких 87 були поліморфними. Середній рівень поліморфізму за всіма праймерами становив 88,8% (табл. 3). Досить високий рівень поліморфізму також було отримано у роботі Marotti et al. (2007). Так, при використанні шести RAPD-праймерів рівень поліморфізму був 69%. При вивченні зразків з південної Бразилії з використанням 15 праймерів отримано 304 продукти, рівень поліморфізму яких склав 88,8% (Maciel et al., 2001).

У першому кластері за окремими праймерами виявлені унікальні компоненти. Так, за праймером OAC-20: UDO501722 (Україна) 1232 п.н., UDO503341 (Україна) 658 п.н. та Holberg (США) 1621 п.н., 685 п.н., які не зустрічалися в інших зразків цього кластера. Унікальні компоненти були відзначені також за іншими праймерами (табл. 6).

Найбільшу кількість ампліконів було ідентифіковано з використанням OPW-10 праймера – для п'яти зразків колекції. Всього було ампліфіковано 30 унікальних фрагментів, їх частка у цьому кластері становить 30,0% (табл. 3). Виявлені специфічні фрагменти у представників квасолі звичайної можуть розглядатися як родо-, видо- та підвидо-специфічні маркери, які

ГОЛОВАНЬ, ПУЗІК

Таблиця 5. Мономорфні локуси виявлені за допомогою RAPD-маркерів

№ кластера	Маркер	Розмір ампліфікона
1	OPF10	952 п.н., 710 п.н.
	OPW-06	1163 п.н., 885 п.н., 421 п.н., 328 п.н.
	OPW-04	1363 п.н., 1164 п.н., 587 п.н.
	OPZ-04	702 п.н., 569 п.н.
2	OAC20	1748 п.н., 1352 п.н., 750 п.н., 495 п.н.
	OPI19	1284 п.н., 760 п.н.
	OPU01	1352 п.н., 537 п.н., 432 п.н., 328 п.н., 188 п.н.
	OPF10	1252 п.н., 952 п.н., 710 п.н., 242 п.н.
	OPW06	1163 п.н., 885 п.н., 328 п.н.
	OPW10	1011 п.н., 622 п.н., 275 п.н.
	OPW04	1363 п.н., 1164 п.н., 964 п.н., 515 п.н., 189 п.н.
	P28	1099 п.н., 703 п.н., 444 п.н.
	P37	1556 п.н., 1225 п.н., 864 п.н., 396 п.н.
	OPZ04	908 п.н., 757 п.н.
3	OAC20	332 п.н., 174 п.н., 100 п.н.
	OPU01	648 п.н., 432 п.н.
	OPF10	100 п.н.
	OPW06	726 п.н., 655 п.н.
	OPW10	622 п.н.
	OPW04	826 п.н., 745 п.н., 450 п.н.
	P28	548 п.н., 444 п.н.
	P37	372 п.н., 150 п.н., 100 п.н.
	OPZ04	386 п.н., 273 п.н., 200 п.н., 150 п.н.
4	OAC20	750 п.н.
	OPI19	1672 п.н., 372 п.н.
	OPU01	760 п.н., 537 п.н., 328 п.н.
	OPF10	637 п.н.
	OPW06	885 п.н., 772 п.н., 655 п.н.
	OPW04	587 п.н.
	P28	635 п.н., 374 п.н.
	P37	758 п.н., 461 п.н.
OPZ04	1028 п.н., 757 п.н., 648 п.н.	

Таблиця 6. Унікальні амплікони характерні для першого кластера, виявлені з використанням RAPD-маркерів

Назва зразка	Розмір амплікона	Праймер
UDO501722	1232 п.н.	OAC-20
UDO503341	658 п.н.	
Holberg	1621 п.н., 685 п.н.	
UDO503341	1570 п.н., 760 п.н.	OI-19
Holberg	970 п.н., 655 п.н.	
Isex	1169 п.н.	OPU-01
Первомайська	760 п.н.	
UDO503341	147 п.н.	OF10
Докучаєвська	1935 п.н., 1570 п.н., 1010 п.н.	
UDO503341	772 п.н.	
UDO50172	275 п.н.	OPW-10
UDO503341	823 п.н.	
Isex	484 п.н.	
Первомайська	340 п.н., 112 п.н.	
Докучаєвська	1500 п.н.	
Докучаєвська	2759 п.н.	OPW-04
UDO503341	2226 п.н., 1146 п.н., 833 п.н., 548 п.н., 255 п.н.	P-28
Isex	100 п.н.	
UDO503341	1300 п.н., 461 п.н.	P37

RAPD-АНАЛІЗ ГЕНОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ

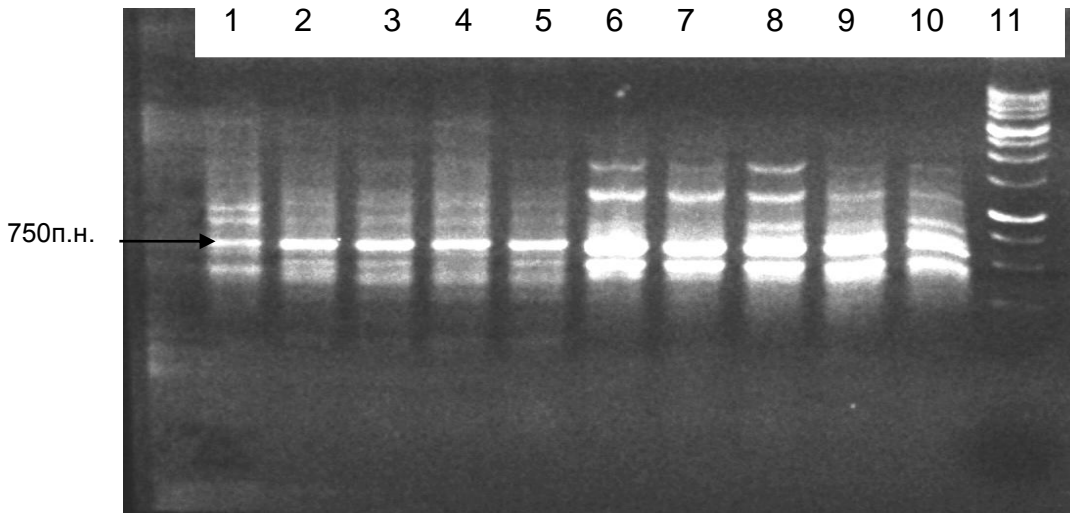


Рис. 2. Електрофореграма RAPD-спектрів 10 зразків квасолі, отримана при використанні праймера ОАС20. Стрілками показані мономорфні компоненти, цифрами – їх молекулярна маса.

1-5 – *Ph. lunatus*, 6-10 – *Ph. multiflorus*, 11 – маркер.

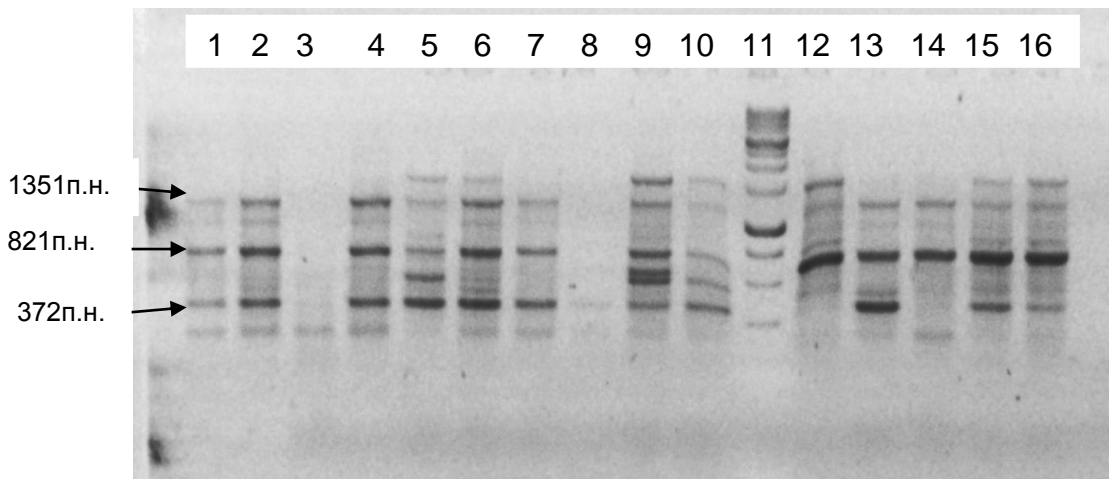


Рис. 3. Електрофореграма RAPD-спектрів 15 зразків квасолі, отримана при використанні праймера ОІ19. Стрілками показані мономорфні компоненти, цифрами – їх молекулярна маса.

1-10 – *Ph. vulgaris*, 12-16 – *Ph. multiflorus*, 11 – маркер.

можуть використовуватися як молекулярний інструмент у генотипуванні, паспортизації та аналізі таксономічних взаємозв'язків.

Всі зразки, віднесені до цього кластера, належать до виду *Ph. vulgaris*. Найбільш генетично близькими виявилися зразки: Isex (Франція) з Holberg (США), Прелом (Болгарія) з Первомайською (Україна) та UDO503341 (Україна) з Докучаєвською (Україна). Їх предкові дикі популяції, очевидно, складають одну популяцію. Найбільш віддаленим у межах даного кластера виявився зразок Ногоз (Туреччина). Також у даний кластер увійшли зразки: UDO503256 (Україна), що генетично був ближчим до зразків UDO503341 (Україна) та Доку-

чаєвська (Україна); зразок UDO501722 (Україна) та UDO501709 (Україна), за генетичною відстанню вони були ближчими до зразка Ногоз (Туреччина). Провести аналіз родоводів цих зразків не вдалося, оскільки більшу частину з них складають зразки народної селекції та іноземної селекції. Але встановлені родоводи двох сортів селекції ХНАУ ім. В.В. Докучаєва: сорт Докучаєвська створено шляхом мутагенезу з використанням рентгенівських променів з сорту Харківська 9; сорт Первомайська створено шляхом гібридизації N65-90 (лінія створена методом мутагенезу з сорту Алуна-Молдова) на Біла Канадська. Саме цим можна пояснити генетичну близькість сорту Первомайська з зразками іноземної селекції (Isex, Holberg).

Таблиця 7. Унікальні амплікони характерні для другого кластера, виявлені з використанням RAPD-маркерів

№ з/п	Назва зразка	Розмір амплікона	Праймер
1	UD0301762 (Україна)	206 п.н.	OP19
2	Blanka (Польща)	886 п.н.	OPU01
3	Blanka (Польща)	2380 п.н., 1678 п.н., 655 п.н.	OPW06
4	UD0500843 (Німеччина)		
5	Blanka (Польща)	1340 п.н.	OPW10
6	UD0303436 (Україна)	750 п.н.	
7	UD0303436 (Україна)	125 п.н.	P28
8	UD0500843 (Німеччина)	519 п.н.	OPZ04

Таблиця 8. Унікальні амплікони характерні для третього кластера, виявлені з використанням RAPD-маркерів

№ з/п	Назва зразка	Розмір амплікона	Праймер
1	UDO501869 (Зард Американ, Іран)	893 п.н., 685 п.н.	OAC20
2	UDO501869 (Зард Американ, Іран)	1351 п.н.	OI19
3	UD0301625 (Україна)	655 п.н., 558 п.н.,	
4	UDO501869 (Зард Американ, Іран)	932 п.н., 886 п.н., 815 п.н., 760 п.н.	OPU01
5	Accutifolius (Німеччина)	284 п.н.	OF10
6	UDO501869 (Зард Американ, Іран)	328 п.н.	OPW06
7	UD0300124 (PI440798, Мексика)	833 п.н., 635 п.н.	P28
8	UDO501869 (Зард Американ, Іран)	450 п.н.	P37
9	Accutifolius (Німеччина)	250 п.н.	
10	UD0300124 (PI440798, Мексика)	600 п.н., 230 п.н.,	OPZ04
11	Accutifolius (Німеччина)	201 п.н.	

Таблиця 9. Унікальні амплікони характерні для четвертого кластера, виявлені з використанням RAPD-маркерів

№ з/п	Назва зразка	Розмір амплікона	Праймер
1	Geszentye Bab	1183 п.н., 1000 п.н., 495 п.н.	OAC20
2	Geszentye Bab	678 п.н., 513 п.н.	OI19
3	Geszentye Bab	1268 п.н., 932 п.н., 603 п.н.	OPU01
4	Henderson	1010 п.н., 758 п.н.	OF10
5	Geszentye Bab	1419 п.н.	OPW10
6	Geszentye Bab	1177 п.н.	OPZ04

До другого кластера ввійшли зразки, що належать до виду *Ph. multiflorus*. Передумовою об'єднання цих генотипів у другий кластер були такі мономорфні локуси: за праймером OAC20 – 1748 п.н., 1352 п.н., 750 п.н., 495 п.н.; OP19 – 1284 п.н., 760 п.н.; OPU01 – 1352 п.н., 537 п.н., 432 п.н., 328 п.н., 188 п.н. та ін. (табл. 5, рис. 3). Всі інші виявлені локуси були поліморфними. Всього було ампліфіковано 61 локус, з яких 26 були поліморфними (табл. 3). Середній рівень поліморфізму цього кластера за всіма праймерами становив 43%. Також було отримано 10 унікальних ампліконів. Так, наприклад, праймер OP19-UD0301762 (Україна) – 206 п.н., OPU01-Blanka (Польща) – 886 п.н. (табл. 7). Частка унікальних ампліконів за даним кластером становила 16,4% (табл. 3). Ви-

явлені амплікони можуть бути використані для ідентифікації конкретного зразка.

Найбільш генетично близькими у даному кластері виявилися зразки UDO300461 (Україна) та UDO303436 (Україна). У міру збільшення генетичних дистанцій розташувалися зразки UDO301762 (Україна), UDO500843 (Німеччина) та Blanka (Польща). Родоводи цих зразків не відомі.

До третього кластера віднесені зразки, що належать до виду *Ph. acutifolius*. Для зразків, представлених у цьому кластері, були характерні наступні мономорфні локуси: праймер OAC20 – 332 п.н., 174 п.н. та 100 п.н., праймер OPU01 – 648 п.н., 432 п.н., праймер OPF10 – 100 п.н., праймер OPW06 – 726 п.н., 655 п.н. та

RAPD-АНАЛІЗ ГЕНОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ

ін. (табл. 5). Всі інші виявлені локуси були поліморфними. Всього було ампліфіковано 56 локусів, з яких 35 були поліморфними. Середній рівень поліморфізму цього кластера за всіма праймерами становив 62,5% (табл. 3).

Для зразків, що ввійшли в цей кластер, було виявлено 17 унікальних локусів: зокрема, за праймером OAC20 виявлено три унікальних амплікони розміром – 332 п.н., 174 п.н. та 100 п.н. відповідно (табл. 8). Унікальні амплікони були візуалізовані і з використанням інших праймерів. Найбільшу кількість ампліконів було отримано з використанням праймера OPU01 – 4. Частка унікальних ампліконів за цим кластером становила 30,3% (табл. 3). Виявлені амплікони можуть бути використані для ідентифікації конкретного зразка. Так, за допомогою цих праймерів можливо ідентифікувати чотири зразки з п'яти представлених у колекції, причому для деяких з них для більшої точності можна використовувати декілька праймерів. Так, зразок UDO501869 (Зард Американ, Іран) ідентифікується за п'ятьма праймерами (табл. 8).

Найбільш генетично близькими у даному кластері виявилися зразки UDO500498 (PI476858, Мексика) та UDO301237 (Acutifolius, Німеччина). У міру збільшення генетичних дистанцій розташувалися зразки UDO301625 (Україна), UDO300124 (PI440798, Мексика) та UDO501869 (Зард Американ, Іран). Родоводи цих зразків не відомі.

Четвертий кластер охарактеризувався зразками виду *Ph. lunatus*. Для зразків цього кластера були виявлені такі мономорфні локуси: праймер OAC20 – 750 п.н., праймер OPI19 – 1672 п.н. та 372 п.н., праймер OPU01 – 760 п.н., 537 п.н. та 328 п.н., праймер OPF10 – 637 п.н., праймер OPW06 – 885 п.н., 772 п.н. та 655 п.н., праймер OPW04 – 587 п.н., праймер P28 – 635 п.н. та 374 п.н., праймер P37 – 758 п.н. та 461 п.н., праймер OPZ04 – 1028 п.н., 757 п.н. та 648 п.н. (рис. 2, табл. 5). Всі інші виявлені локуси були поліморфними. Всього було ампліфіковано 58 локусів, з яких 40 були поліморфними. Середній рівень поліморфізму цього кластера за всіма праймерами становив 69,0% (табл. 3). У роботі Fofana et al. (1997) при використанні 12 олігонуклеотидних праймерів отримано 172 амплікони, рівень поліморфізму яких склав 37,7%.

Також було отримано 12 унікальних ампліконів. Так, наприклад, за праймером OPI19 у зразку UDO503348 (Geszentye Bab, Угорщина)

– 678 п.н. та 513 п.н., у праймера OPU01-UDO503348 (Geszentye Bab, Угорщина) – 1268 п.н., 932 п.н. та 603 п.н. та інші (табл. 9). Частка унікальних ампліконів за цим кластером становила 20,7% (табл. 3). Виявлені амплікони можуть бути використані для ідентифікації конкретного зразка. Найбільше унікальних ампліконів виявлено у зразку UDO503348 (Geszentye Bab, Угорщина) – 10 з використанням OAC20, OPI19, OPU01, OPW10 та OPZ04 праймерів.

Найбільш генетично близькими у даному кластері виявилися зразки UDO503348 (Geszentye Bab, Угорщина) та UDO503247 (Three Color Poll, США). У міру збільшення генетичних дистанцій розташувалися зразки (Henderson, США), UDO302220 (Пестропалева, Росія) та UDO301530 (Koro Iron, Філіппіни). Провести аналіз родоводів цих зразків не вдалося, оскільки більшу частину з них складають зразки іноземної селекції.

Отримане нами філогенетичне дерево показує, що *Ph. vulgaris* та *Ph. multiflorus* є генетично ближчими між собою, ніж до інших видів, взятих в аналіз. Для цих двох кластерів характерна наявність семи мономорфних локусів. Так, за праймером OF10 знайдені два мономорфних амплікони з розміром 952 п.н. та 710 п.н., за OPW06 – 1163 п.н., 885 п.н. та 328 п.н., за OPW04 – 1363 п.н. та 1164 п.н. Між видами *Ph. lunatus* та *Ph. multiflorus* знайдено п'ять мономорфних локусів: OAC20 – 750 п.н., праймер OPU01 – 537 п.н. та 328 п.н., за OPW06 – 885 п.н., за OPZ04 – 757 п.н. Між видами *Ph. multiflorus* та *Ph. acutifolius* виявлено три спільних локуси: OPU01 – 432 п.н., OPW10 – 622 п.н., P28 – 444 п.н. Між видами *Ph. vulgaris* та *Ph. lunatus* знайдено два спільних локуси: OPW06 – 885 п.н., OPW04 – 587 п.н. Між видами *Ph. lunatus* та *Ph. acutifolius* виявлений лише один локус за праймером OPW06 – 655 п.н.. Між видами *Ph. vulgaris* та *Ph. acutifolius* взагалі не виявлено спільних локусів.

Отже, у результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу з допомогою RAPD-маркерів вивчена колекція квасолі чотирьох видів. Всього ідентифіковано 173 локуси, кількість продуктів ампліфікації варіювала від 14 до 22 залежно від використаного праймера. Розмір ампліфікованих фрагментів був у межах від 100 п.н. до 2759 п.н. При міжвидовому аналізі рівень поліморфізму становив 100% (всі локуси поліморфні). При внутрішньовидовому аналізі рівень поліморфізму варіював залежно від виду: у квасолі звичайної (*Ph. vulgaris*) рівень поліморфізму становив 88,8%; у *Ph.*

multiflorus – 69,0%; у *Ph. lunatus* – 43,0%; у *Ph. acutifolius* – 62,5%. Як при міжвидовому, так і при внутрішньовидовому аналізі виявлені унікальні присутні тільки у одному генотипі амплікони. Ці ділянки можуть слугувати маркерами конкретного зразка та використовуватися для ідентифікації та паспортизації генетичних ресурсів. У квасолі звичайної виявлено 30 унікальних ампліконів (30,0%), у квасолі багатоквіткової – 10 (16,4%), у квасолі лимської – 12 (20,7%), у квасолі гостролистої – 17 (30,3%). У межах кожного виділеного у результаті кластеризації методом NJ кластера виявлені мономорфні локуси. Так, у межах першого кластера, який представлений видом *Ph. vulgaris*, виявлено 11 локусів, у межах II кластера – 35 локусів (вид *Ph. multiflorus*), III кластера – 21 локус (*Ph. acutifolius*) та у межах четвертого – 18 локусів (*Ph. lunatus*). Найбільші генетичні дистанції були виявлені для видів *Ph. vulgaris* та *Ph. acutifolius*. Найменшими генетичними дистанціями характеризувалися види *Ph. vulgaris* та *Ph. multiflorus*.

Використання методу RAPD-аналізу дозволило диференціювати на молекулярно-генетичному рівні види й зразки квасолі зарубіжної та вітчизняної селекції і встановити генетичні взаємозв'язки між ними. Результати досліджень свідчать про віддаленість видів один від одного (кожен вид виділився в окремий кластер), це підтверджується відсутністю фрагментів, спільних для усіх видів, а також невеликою кількістю ампліконів, спільних у межах дослідженої вибірки окремого виду. Отже, отримані нами результати оцінки міжвидового поліморфізму представників роду *Phaseolus* L. узгоджуються з основними класифікаціями роду, що ґрунтуються на анатомо-морфологічних ознаках.

ЛІТЕРАТУРА

- Бурляева М.О., Алпатьева Н.В., Рыжова Н.Н. и др. Молекулярные подходы к решению вопросов филогении и систематики рода *Lathyrus* L. // Мат-лы 4-й Междунар. науч. конф. «Биологическое разнообразие. Интродукция растений», С-Петербург, 5-8 июня 2007 г. – СПб., 2007. – С. 25-26.
- Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002. – Т. 34, № 4. – С. 279-296.
- Коновалов А.А., Моисеева Е.А., Гончаров Н.П. и др. Анализ наследования и сцепления некоторых признаков в хромосоме 5R у ржи *Secale cereal* L. // Селекция і насінництво. – 2008. – Вип. 96. – С.106-112.
- Кочиева Е.З., Горюнова С.В., Поморцев А.А. и др. Молекулярное маркирование геномов ячменей // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 8. – С. 1088-1094.
- Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н., Храпалова И.А. и др. Использование метода RAPD анализа в определении генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tournef.) Mill // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 6. – С. 874-880.
- Мальшев С.В., Войлоков А.В., Корзун В.Н. и др. Картирование генома ржи (*Secale cereale* L.) с помощью молекулярных маркеров // Вестн. ВОГиС. – 2005. – Т. 9, № 4. – С.473-480.
- Рисованная В.И. Оценка чистоты генеративного потомства винограда с использованием молекулярно-генетических маркеров // Виноградарство и виноделие. – 2009. – №1. – С. 5-7.
- Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. ДНК-технології у дослідженні генетичного потенціалу кукурудзи // Селекция і насінництво. – 2008. – Вип. 96. – С. 113-120.
- Смирнов В.Г. Значение генетических коллекций для фундаментальных исследований и селекционных программ // Идентифицированный генофонд растений и селекция. – СПб: ВИР, 2005. – С.783-806.
- Acampora A., Ciaffi M., De Pace C., Paolacci A. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. // Euphytica. – 2007. – V. 157. – P. 69-82.
- Ausubel F. M., Brent R. et al. *Current protocols in molecular biology* // John Wiley & Sons. – New York, 1987. – P. 431-433.
- Briand L., Brown A.E., Lenne J.M. et al. Random amplified polymorphic DNA variation within and among bean landrace mixtures (*Phaseolus vulgaris* L.) from Tanzania // Euphytica. – 1998. – V. 102. – P. 371-377.
- Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E. et al. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // Bio-Techniques. – 2004. – V. 37. – P. 598-602.
- Caixeta E.T., Borem A., Fagundes S.A. et al. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene // Euphytica. – 2003. – V. 134. – P. 297-303.
- Cristina R., Belen M., Astrid P. et al. A genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and localization of genes for species resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) // Theor. Appl. Genet. – 2007. – V. 114. – P. 713-722.

RAPD-ANALYSIS OF GENOME POLYMORPHISM

- Fofana B., Vekemans X., Jardin P. et al. Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers // *Euphytica*. – 1997. – V. 95. – P. 157-165.
- Haley S.D., Stavely P.N., Byrum J. et al. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V. 85. – P. 505-512.
- Jung G., Coyne D., Skroch P. et al. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight and rust in common beans // *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* – 1996. – V. 121. – P. 794-803.
- Maciel F.L., Gerald L.T.S., Echeverrigaray S. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) of south – Brasil // *Euphytica*. – 2001. – V. 120. – P. 257-263.
- Marotti I., Alessandra B., Maurizio M. et al. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers // *Gen. Resources Crop Evolution*. – 2007. – V. 54. – P. 175-188.
- Matthew W.B., Rodriguez L.M., Pedraza F. et al. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – V. 114. – P. 261-271.
- Metais C., Aubry B., Hamon R. et al. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 101. – P. 1207-1214.
- Miklas P.N., Stavely J.R., Martinez-Cruzado J.C. et al. Coupling and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI181996 rust resistance in common bean // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – V. 87. – P. 659-664.
- Miklas P.N., Stavely J.R., Kelly J.D. et al. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V. 85. – P. 745-749.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Sci. USA*. – 1979. – V. 76. – P. 5269-5273.
- Skroch P., Neinbuis J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – V. 91. – P. 1086-1091.
- Yu Z.H., Stall R.E., Vallejos C.E. Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans // *Crop Sci.* – 1998. – V. 38. – P. 1290-1296.

Надійшла до редакції
16.02.2012 р.

RAPD-ANALYSIS OF GENOME POLYMORPHISM OF DIFFERENT SPECIES OF *PHASEOLUS* L. GENUS

L. V. Golovan', V. K. Pouzik

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)

The use of method of RAPD-analysis has allowed to differentiate on molecular-genetic level the species and samples of common bean of foreign and domestic selection, to establish the genetic interconnections between them. The results of studies testify to remoteness of species from each other (each species was allocated in separate clusters), it is confirmed by the absence of fragments of general for all species, and also by the small amount of amplicons, the general within the investigated sample of separate species. The results of estimation of interspecific polymorphism of representatives of *Phaseolus* L. genus conform to basic classifications of genus which are based on anatomical-morphological signs.

Key words: *Phaseolus vulgaris* (L.), *Savi*, *Ph. lunatus* L. *Ssp. Microsperma*, *Ph. acutifolius* A. *Grau.*, *Ph. multiflorus* Lam., RAPD-analysis, cluster, genetic variety

ГОЛОВАНЬ, ПУЗИК

**RAPD-АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА
РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *PHASEOLUS* L.**

Л. В. Головань, В. К. Пузик

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)*

Использование метода RAPD-анализа позволило дифференцировать на молекулярно-генетическом уровне виды и образцы фасоли зарубежной и отечественной селекции, установить генетические взаимосвязи между ними. Результаты исследований свидетельствуют об отдаленности видов друг от друга (каждый вид выделился в отдельный кластер), это подтверждается отсутствием фрагментов, общих для всех видов, а также небольшим количеством ампликонов, общих в пределах исследованной выборки отдельного вида. Результаты оценки межвидового полиморфизма представителей рода *Phaseolus* L. согласуются с основными классификациями рода, который основывается на анатомо-морфологических признаках.

Ключевые слова: *Phaseolus vulgaris* (L.), *Savi*, *Ph. lunatus* L. *Ssp. Microsperma*, *Ph. acutifolius* A. Grau, *Ph. multiflorus* Lam., RAPD-анализ, кластер, генетическое разнообразие