

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 631.523:633.32

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЯ СОРТІВ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ЗА SSR МАРКЕРАМИ

© 2012 р. Ю. М. Дугарь¹, В. М. Попов²

¹Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)

²Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва
Національної академії аграрних наук України (Харків, Україна)

Проведена ідентифікація та паспортизація 15 сортів конюшини лучної української селекції з використанням мікросателітних послідовностей. Виявлені унікальні алелі сортів конюшини та алелі, характерні для всіх генотипів. Побудована дендрограма сортів конюшини за допомогою методу найближчих сусідів. Обговорюються можливі причини об'єднання вивчених сортів конюшини у два кластери на основі генетичних відстаней Nei.

Ключові слова: *Trifolium pratense* L., мікросателіти, паспортизація, кластерний аналіз

При роботі з генетичними ресурсами рослин важливим етапом є систематизація зразків за різними типами генетичних маркерів: морфологічними, біохімічними та молекулярними. У більшості випадків ідентифікацію зразків генофонду здійснюють за морфологічними маркерами, які є доступними та дешевими. Але при роботі з однотипними зразками вони мають недостатню розрізняльну здатність (Рябчун, Богуславський, 2011). У зв'язку з цим для більш ефективної роботи при систематизації колекційних зразків рослин широко застосовують різні молекулярні маркери, серед яких достатньо інформативними є варіабельні повтори – мікросателіти (SSR). Їх з успіхом використовували для ідентифікації та паспортизації зразків пшениці (Сиволап и др., 2000; Чеботарь, Сиволап, 2001), ячменю (Сиволап и др., 2011), кукурудзи (Кожухова, Сиволап, 2004; Сиволап и др., 2011), соняшнику (Солоденко и др., 2004; Саналатий и др., 2006) тощо. Порівняно з цими сільськогосподарськими культурами мінливість геному конюшини лучної (*Trifo-*

lium pratense L.) є малодослідженою за молекулярними маркерами. Міжсортівий поліморфізм зразків конюшини лучної в основному вивчається за RAPD маркерами (Kongkiatngam et al., 1995; Kongkiatngam et al., 1996; Campos-de-Quiroz et al., 2001; Дугарь, Попов, 2011), також у науковій літературі зустрічаються поодинокі дані щодо застосування ISSR та SSR маркерів (Dias et al., 2008; Berzina et al., 2008; Дугарь, 2012). Останній тип молекулярних маркерів почали широко застосовувати в картуванні геному конюшини з визначенням локусів зчеплених з генами морфологічних ознак (Sato et al., 2005; Isobe et al., 2009; Klimenko et al., 2010; Riday Krohn, 2010).

Актуальним напрямом дослідження є ідентифікація та паспортизація селекційних зразків конюшини лучної за SSR маркерами. Подібна робота в Україні дотепер не проводилась. У зв'язку з цим, метою нашого дослідження була паспортизація українських сортів конюшини лучної за мікросателітними локусами.

Адреса для кореспонденції: Дугарь Юлія Миколаївна, Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, п/в «Комуніст-1», Харків, 62483, Україна; e-mail: jndugar@gmail.com

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЯ

Таблиця 1. Сорти конюшини лучної та їх походження

№ з/п	Сорт	Оригіатор
1	Тернопільська 3	Подільська ДС Тернопільського інституту АПВ, Тернопільська обл.
2	Тернопільська 4	
3	Миронівська 45	Миронівський інститут селекції і насінництва пшениці ім. В.М. Ремесла, Київська обл.
4	Дарунок	Інститут землеробства, Київська обл.
5	Кумач	
6	Маруся	
7	Поліс	
8	Полянка	
9	Анітра	Інститут кормів, Вінницька обл.
10	Політанка	
11	Спарта	
12	Агрос 12	Чернігівський інститут АПВ, Чернігівська обл.
13	Фалкон	Носівська СДС Чернігівського інституту АПВ, Чернігівська обл.
14	Полтавська 75	Полтавська ДСГДС, Полтавська обл.
15	UDS 00131	Карпати, місцевий сорт

Таблиця 2. Характеристика SSR-праймерів

№ з/п	Локус	Повтор	Послідовність 5'-3'	Температура відпалу, °C
1	TPSSR05 (DQ058174)	(GT) ₃₁	AGGGTGTGCGTGCAACA TATGTCTATCTTCCCTTTTAATGTCTTCTG	55
2	TPSSR16 (DQ058183)	(CT) ₁₆	GCGCTTATTCGAAGACGGAA TCAGTGGAGTAGGGTCGTCTG	60
3	TPSSR17 (DQ058184)	(CTT) ₂₂	AAGCAGCGAGACTTCCCTTTG TGGAAGGTAAACATCGAGAGCA	60
4	TPSSR23 (DQ058187)	(AG) ₃₀	CAGTCGGGTGTTGCCATTT GAGGAATAAACTCAATACTTCAGTACTAGAT	60
5	TPSSR28 (DQ058191)	(AG) ₁₈	CTCTTAAAGGGTTGGTATTGAAATCG TCTTGTCTCGCCGACGTTT	60
6	TPSSR29 (DQ058192)	(GA) ₃₅	TTTCGGTAGTGGAAGATGATGGA TCAATAATTTTCAGAAAAAGATCAAAACC	60
7	TPSSR34 (DQ058195)	(CT) ₇ ; (CT) ₂₂ ; (CT) ₈	GTTAGTGCAGCGAAAGGAAGG GTTTCAGTGGATCAGTGAGTAACACAA	60
8	TPSSR46 (DQ058203)	(TC) ₂₈	TCAAATAAACTTTTCATAACGTTTCATCTC TCCGAAGAAACCATTATCTACGTTG	60
9	TPSSR50 (DQ058211)	(CT) ₂₃	TTTGTTCAGGAAAATGAGGCG ATTCSCTCCATCTTCTCTATGT	60
10	TPSSR52 (DQ058206)	(CT) ₃₁	ATTCSCTCCATCTTCTCTATGT TTATATTAATGGGAGTTAGTATGATCTA	60

МЕТОДИКА

Як рослинний матеріал використовували 15 сортів конюшини лучної української селекції, одержані з Устимівської дослідної станції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва (Харків) та Інституту кормів (Вінниця) (табл. 1). Репрезентативна вибірка складала 450 рослин.

Геномну ДНК виділяли із насіння конюшини лучної за допомогою СТАВ-буферу за стандартною методикою (Ausubel et al., 1987). У роботі використовували 10 мікросателітних локусів: TPSSR 05, TPSSR 16, TPSSR 17, TPSSR 23,

TPSSR 28, TPSSR 29, TPSSR 34, TPSSR 46, TPSSR 50, TPSSR 52 (табл.2), які були відібрані як високоінформативні (Kolliker et al., 2006). Поліморфізм мікросателітних локусів виявляли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили у пробірках з ліофілізованим набором реактивів для ПЛР (GenePak PCR core) у ампліфікаторі «Терцик» (Росія). Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл та містив 20 нг геномної ДНК і по 0,2 мкМ праймерів. У пробірки додавали по 20 мкл мінеральної олії. ПЛР проводили за програмою, яка була запропонована Kolliker et al. (2006).

Якість виділеної ДНК перевіряли у 1 % агарозному гелі. Результати дослідження аналізували за допомогою горизонтального електрофорузу в 3% агарозному гелі (200 В, 220 мА протягом 45 хв.) із забарвленням бромистим етидієм та наступним фотографуванням в УФ-світлі. Електродний буфер використовували з низькою іонною силою (Brody, Kern, 2004.) Для визначення розмірів ампліфікованих фрагментів використовували маркери молекулярної маси DNA ladders 50 bp та pUC 19/MspI DNA Marker.

Аналіз генетичного різноманіття проводили шляхом розрахунку генетичних відстаней за Nei, адже ця відстань пристосована спеціально для алейних даних та враховує такі фактори еволюції як мутації та дрейф генів (Nei, 1972). Для вивчення генетичних взаємовідносин між сортами конюшини лучної будували дендограму методом найближчих сусідів (Neighbor-joining, NJ) (Лукашев, 2009). Достовірність топології (розташування гілок дерева) одержаної дендограми перевіряли за допомогою бутстреп-аналізу (bootstrap analysis, bootstrap resampling) при 1000 повтореннях. Статистичну обробку одержаних даних проводили із використанням пакета прикладних програм "PHYLIP-3.69".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Паспортизація сортів конюшини лучної

Аналіз сортів конюшини лучної показав, що кількість алейних варіантів в межах кожного сорту становила від одного (сорт Кумач) до дев'яти (сорт Маруся). При розрахунках середніх значень за десятьма локусами було встановлено, що сорти за кількістю алейнів не відрізняються. Мінімальне середнє склало $4,10 \pm 0,88$ для сорту Поліс, а максимальне – $5,90 \pm 1,10$ для сорту Тернопільська 4.

На основі виявлених фрагментів мікросателітних ділянок ДНК для досліджуваних сортів конюшини лучної створені алейні формули, які можуть бути використані як молекулярно-генетичні паспорти (табл. 3). При розробці таких паспортів мікросателітні локуси позначають великими латинськими літерами таким чином: А – TPSSR05, В – TPSSR16, С – TPSSR17, D – TPSSR23, Е – TPSSR28, F – TPSSR29, G – TPSSR34, H – TPSSR46, I – TPSSR50, J – TPSSR52. Нижнім цифровим індексом представлений алейний стан (гомозигота або гетерозигота) відповідного мікросателітного локуса та розмір виявлених фрагментів у парах нуклеотидів. Такий тип складання молекулярно-генетичних

паспортів був запропонований Ю.М. Сиволапом із співробітниками і апробований для багатьох сільськогосподарських культур (Сиволап, 2011).

У репрезентативній вибірці з 15 сортів конюшини лучної виявлені унікальні, властиві лише певному сорту алейні. Так, наприклад, унікальними є два алейні сорту Миронівська 45 розміром 280 та 100 п.н. відповідно за локусами TPSSR 05 та TPSSR 52. Два унікальних алейні також було ідентифіковано у місцевого сорту UDS 00131 за локусом TPSSR 17 (206, 213 п.н.). По одному такому алейню визначено у сортів Тернопільська 4 та Фалкон за локусами TPSSR 34 (234 п.н.) та TPSSR 46 (232 п.н.), відповідно.

Вісім із десяти пар праймерів виявляли алейні, присутні в генотипі кожного із досліджуваних зразків (табл. 4). Локуси TPSSR 28, 34, 50, напевно, є найбільш консервативними серед проаналізованих, адже вони детектували по три таких алейні. Деякі сорти конюшини лучної виділялись із загальної вибірки відсутністю компонента, який був присутній в усіх інших генотипах. Це такі сорти як Тернопільська 4 (206 п.н., TPSSR 16; 184 п.н., TPSSR 29), Фалкон (216 п.н., TPSSR 05), Спарта (240 п.н., TPSSR 05), Полтавська 75 (172 п.н., TPSSR 29), UDS00131 (152 п.н., TPSSR 29), Агрос 12 (166 п.н., TPSSR 46), Тернопільська 3 (176 п.н., TPSSR 46) та Маруся (198 п.н., TPSSR 46).

Кластерний аналіз сортів конюшини лучної

Нині існують кілька основних метрик для візуалізації результатів аналізу генетичних взаємовідносин. Це кластерний та факторний аналізи, а також багатомірне шкалювання, які доповнюють один одного. Найбільш широко використовується кластерний аналіз, який дозволяє класифікувати досліджувані зразки у групи за певними ознаками (Ким и др., 1989). Мірою відмінностей вважають генетичну відстань, або генетичну подібність, яка є умовною одиницею, що відображає кількісне значення генетичної віддаленості або подібності (Сиволап, 2011).

На основі частот алейних варіантів нами була одержана матриця генетичних відстаней між досліджуваними сортами конюшини лучної. Найбільш віддаленими за генетичним відстаням Nei була пара сортів Миронівська 45 та Дарунок ($D=0,382$), а найбільш близькими – Миронівська 45 та Агрос 12 ($D=0,105$). Слід зазначити, що останні сорти створені в різних

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЯ

Таблиця 3. Молекулярно-генетичні паспорти конюшини лучної

№ з/п	Сорт	Генетичний паспорт
1	2	3
1	Тернопільська 3	A 188, 202, 216, 226, 240, 202/188, 226/188, 226/202, 226/216, 240/202, 256/226 B 190, 206, 216, 228, 228/206, 244/190, 244/216, 260/206, 260/216 C 141, 150, 162, 183/162 D 170, 180, 194, 204, 216, 204/180, 204/194, 216/170, 216/204 E 136, 142, 154, 162, 170, 154/128, 154/136, 162/128, 170/142 F 136, 152, 160, 172, 184, 172/136, 172/152, 184/152, 200/160 G 172, 186, 200, 186/164, 200/172 H 158, 166, 186, 198, 208, 166/158, 186/166 I 174, 192, 202, 210, 220, 174/148, 174/153, 192/148, 202/154, 210/174 J 124, 134, 124/112
2	Тернопільська 4	A 178, 188, 216, 226, 240, 256, 216/188, 226/202, 256/216 B 176, 190, 216, 228, 190/176, 216/176, 216/190, 228/190 C 150, 162, 162/150, 171/141, 183/150, 183/162, 195/162 D 158, 170, 180, 194, 204, 216, 194/158, 204/158 E 136, 142, 154, 142/136, 154/136, 154/142, 162/136 F 144, 152, 160, 172, 200, 200/152, 200/160, 200/172, 214/152, 214/172 G 164, 172, 186, 200, 200/164, 200/172, 218/164, 218/172, 234/172 H 158, 166, 176, 186, 198, 198/166, 218/166 I 174, 192, 202, 210, 230, 202/164, 202/174, 210/174, 220/174 J 124 134, 144, 152, 124/106, 134/124, 144/106, 144/124, 152/106, 152/124, 152/134, 166/134, 188/134
3	Миронівська 45	A 178, 188, 202, 216, 226, 240, 216/188, 226/188, 226/216, 240/178, 240/188, 240/216, 280/216 B 190, 206, 216, 228, 206/176, 216/190, 216/206, 228/206, 244/206, 244/228 C 150, 162, 183/150 D 158, 180, 194, 204, 230, 204/194 E 136, 142, 154, 154/136, 162/142 F 144, 152, 160, 184, 206, 184/152, 184/171, 206/152, 214/160, 214/172 G 172, 186, 200, 186/172, 200/172, 200/186 H 166, 176, 186, 198, 208, 198/166, 198/176 I 164, 174, 192, 202, 210, 192/164, 202/154, 202/164, 202/174, 220/192, 230/202 J 118, 124, 134, 144, 124/100, 144/106, 144/118, 152/106, 152/134, 166/124
4	Дарунок	A 188, 202, 216, 226, 240, 226/188, 226/202 B 184, 190, 206, 216, 228, 206/184, 216/190, 228/190, 244/176 C 150, 162, 171/150, 183/150, 183/162 D 158, 194, 216, 230, 194/148 194/158, 216/180, 230/194 E 136, 142, 154, 162, 142/136, 154/136, 154/142, 162/136, 162/142 F 144, 152, 160, 172, 184, 200, 172/160, 184/160, 200/152, 200/160 G 172, 186, 200, 186/172, 200/172, 200/186 H 158, 166, 176, 186, 198, 198/158, 208/176 I 154, 174, 192, 202, 210, 220, 192/164, 192/174, 202/164, 202/192, 210/174, 220/192 J 112, 124, 134, 144, 152, 188, 134/112, 144/112, 144/134, 152/106, 152/124, 152/144, 166/144
5	Кумач	A 202, 216, 240, 256, 240/188, 240/202 B 206, 216, 228, 216/190, 228/190, 228/206, 228/216 C 150 D 158, 204, 216, 246, 170/148, 194/148, 194/158, 204/148, 216/204, 246/216 E 136, 142, 154, 162, 162/142 F 136, 152, 160, 172, 200, 172/152, 184/160, 200/160 G 172, 186, 186/172, 200 H 158, 166, 176, 186, 198, 208, 176/158, 186/158, 198/166, 208/198 I 164, 174, 192, 202, 220, 174/164, 192/164, 192/174, 202/164, 202/192 J 118, 124, 134, 144, 152, 166, 134/118, 152/134, 166/134
6	Маруся	A 188, 202, 216, 226, 240, 226/188, 226/202 B 166, 184, 190, 206, 228, 244, 190/166, 228/184, 228/190, 228/206 C 150, 171/150 D 158, 170, 194, 204, 216, 230, 180/158, 194/138, 194/158, 194/170, 204/148, 204/158, 216/170 E 128, 136, 142, 142/136, 154/128, 154/136 F 144, 152, 160, 172, 184, 200, 206, 172/144, 184/152 G 172, 186, 200, 186/172, 200/172 H 158, 166, 176, 186, 176/166, 186/166 I 154, 164, 174, 202, 210, 174/154, 192/164, 202/148, 202/174, 210/174, 220/174 J 124, 134, 144, 134/112, 144/112, 144/134, 152/124, 166/124
7	Поліс	A 202, 216, 240, 202/178 B 190, 206, 216, 206/184, 216/176, 216/184, 216/190 C 150, 162, 171/150 D 194, 204, 216, 194/158, 204/158 E 136, 142, 154, 154/136 F 144, 152, 160, 184, 172/144, 172/160, 184/152 G 172, 200, 186, 200/186 H 166, 176, 186, 198, 186/166, 198/166, 198/176 I 174, 192, 202, 210, 174/148, 210/192 J 118, 124, 134, 144, 166, 134/118, 144/118
8	Полянка	A 188, 202, 216, 226, 226/188, 226/202, 240/202 B 184, 206, 216, 228, 216/184, 244/216 C 150, 162, 171, 171/150 D 194, 216, 230, 194/148, 194/170, 216/194, 230/194 E 136, 142, 154, 162, 154/136, 154/142, 164/142 F 136, 144, 152, 160, 184, 200, 160/136, 172/144, 184/152, 200/152 G 164, 172, 186, 200, 186/164, 200/172, 200/186, 218 H 166, 176, 186, 198, 198/166 I 164, 174, 192, 202, 210, 192/174, 202/174, 220/202 J 118, 124, 134, 152, 124/112, 134/124, 152/118, 152/124
9	Анітра	A 202, 216, 240, 256, 226/202, 226/216, 240/202, 240/216, 256/202, 256/216 B 190, 206, 216, 228, 244, 206/190, 216/190, 216/206, 244/216, 260/206 C 150, 162 D 158, 194, 204, 216, 204/158, 204/170, 216/170, 216/194, 216/204 E 136, 142, 154, 162, 154/136, 154/142, 162/128, 162/136, 182/154 F 136, 144, 152, 172, 184, 206, 184/144, 184/152, 200/152, 206/184 G 172, 186, 200, 218, 186/172, 218/172, 218/186 H 166, 176, 186, 198, 208, 186/166, 198/176, 208/176 I 174, 192, 202, 210, 164/154, 174/154, 192/164, 192/174, 210/154, 220/174, 220/202, 230/210 J 112, 124, 134, 152, 134/112, 134/124, 152/112, 152/124, 152/134
10	Політанка	A 188, 202, 216, 240, 256, 202/178, 216/170, 216/202, 240/202, 256/202 B 190, 206, 216, 228, 260, 206/190, 216/190, 228/206, 260/216 C 150, 162 D 138, 158, 170, 194, 204, 230, 194/158, 204/180, 230/204 E 142, 154, 162, 142/136, 154/136, 154/142, 162/142, 170/136 F 144, 152, 160, 172, 184, 200, 206, 184/152, 184/160, 200/152, 200/160, 206/152, 206/160 G 172, 186, 200, 218, 246/186 H 158, 166, 176, 186, 198, 186/176 I 174, 192, 202, 210, 192/164, 202/174, 210/174, 210/192 J 124, 134, 144, 152, 124/112, 134/112, 144/124, 166/144
11	Спарта	A 188, 202, 216, 226, 256/202, 256/226 B 190, 206, 216, 228, 244, 216/176, 216/190, 228/206, 228/190, 244/206 C 150, 162, 195/162 D 147, 170, 194, 204, 216, 230, 204/158, 204/170, 216/194 E 128, 136, 142, 154, 162, 170, 142/128, 154/142, 162/136, 162/142, 162/154, 170/128 F 144, 152, 160, 172, 184, 200, 184/144, 200/152, 206/160 G 164, 172, 186, 200, 218 H 166, 176, 186, 198, 208, 166/158, 198/186, 218/166, 208/176, 218/198 I 154, 164, 174, 192, 202, 210, 174/154, 192/154, 192/174, 202/174, 202/192, 210/174, 210/192 J 112, 124, 134, 152, 134/112, 144/112, 152/134
12	Агрос 12	A 188, 202, 216, 226, 240, 256, 256/216 B 184, 206, 216, 228, 244, 206/184, 216/184, 228/184, 244/216 C 150, 171, 171/150 D 158, 180, 194, 204, 216, 180/158, 194/158, 204/148, 216/204, 230/194 E 136, 142, 154, 162, 162/136, 182/142 F 144, 152, 184, 184/144, 184/172, 206/152 G 164, 172, 186, 200, 186/172 H 176, 186, 198, 208, 186/176 I 164, 174, 192, 202, 230, 164/130, 164/148, 174/164, 192/164, 192/174, 202/174, 210/174, 210/192 J 112, 118, 124, 134, 144, 152, 134/112, 144/112, 144/124, 152/124

1	2	3
13	Фалкон	A 202, 226, 240, 256, 226/188, 226/202, 240/202, 256/202 B 190, 206, 216, 228, 244, 216/184, 216/190, 228/184, 228/190, 228/206, 244/216, 260/190 C 150, 183, 162/150 D 170, 180, 194, 204, 216, 230, 194/158, 216/180 E 142, 154, 162, 170, 154/136, 154/142, 162/136, 162/142 F 144, 152, 160, 172, 184, 206, 184/152, 184/172, 206/172, 206/184 G 172, 186, 200, 200/172, 200/186 H 166, 176, 186, 198, 198/176, 218, 232/186 I 164, 174, 192, 202, 210, 174/164, 192/164, 202/154, 202/164, 202/192, 210/192 J 112, 124, 134, 144, 152, 124/112, 152/112, 152/124, 152/134, 166/124, 166/134
14	Полтавська 75	A 170, 188, 202, 216, 240, 256, 202/170, 216/170, 216/187, 216/202, 256/202 B 176, 190, 206, 228, 228/190, 228/206, 244/228 C 150, 171/150, 195/171 D 180, 194, 204, 216, 246, 194/170, 204/194, 216/180 E 136, 142, 154, 170, 154/136, 154/142, 162/136, 162/142 F 152, 160, 184, 200, 184/152, 184/160, 200/152, 200/160, 206/160 G 172, 186, 200, 218, 200/172, 200/186 H 158, 166, 176, 186, 198, 176/158, 186/158, 198/176 I 174, 192, 202, 210, 220, 174/154, 192/154, 192/164, 192/174, 202/154, 202/174 J 124, 134, 144, 152, 166, 144/124, 144/134, 166/134
15	UDS 00131	A 178, 202, 216, 216/178, 240/216, 256/240 B 190, 206, 216, 206/166, 216/190 C 141, 150, 171, 183, 206, 213, 183/150 D 138, 158, 170, 180, 204, 170/138, 170/148, 170/158, 180/170, 194/138, 194/170, 194/180, 204/158, 204/180, 216/158 E 136, 142, 154, 162, 154/142, 162/142 F 144, 160, 172, 184, 200, 214, 172/136, 172/144, 184/160, 200/144, 200/160, 214/160, 214/184 G 164, 172, 186, 200, 186/172, 200/164, 200/172, 200/186, 246/186 H 166, 176, 186, 198, 208, 208/186 I 148, 154, 164, 174, 192, 202, 154/130, 174/148, 174/164, 192/148, 202/174 J 118, 124, 134, 152, 134/118, 134/124, 152/124, 152/134, 166/124

Примітка: A – TPSSR05, B – TPSSR16, C – TPSSR17, D – TPSSR23, E – TPSSR28, F – TPSSR29, G – TPSSR34, H – TPSSR46, I – TPSSR50, J – TPSSR52.

Таблиця 4. Алелі, притаманні усім досліджуваним зразкам

№ з/п	Локус	Алель, п.н.
1	TPSSR 05	202
2	TPSSR 17	150
3	TPSSR 23	194
4	TPSSR 28	136, 142, 154
5	TPSSR 34	172, 186, 200
6	TPSSR 46	186
7	TPSSR 50	174, 192, 202
8	TPSSR 52	122, 134

селекційних установах, можливо напрями їх селекції були схожими.

Одержані генетичні відстані були використані для побудови дендрограми методом найближчих сусідів (NJ) взаємовідносин між сортами конюшини лучної. В результаті кластеризації досліджуваних генотипів умовно виділено два основні кластери (рис. 1). Загалом виділені кластери сортів конюшини лучної були представлені зразками різного походження, що, можливо, пов'язано з їх спільним походженням та схожими напрямками селекції. При детальному розгляді молекулярно-генетичних паспортів сортів конюшини лучної не виявлено специфічних алелей, які б могли пояснити належність певного сорту до того чи іншого кластера. Були виявлені тільки деякі подібності між сортами кластерів 1 та 2.

Перший кластер, в основному, представлений сортами отриманими в Інституті землеробства (Київ): Дарунок, Полянка, Маруся, Кумач, Поліс, а також сортами з інших селекцій-

них установ (Спарта, Фалкон, Полтавська 75). Сорт Полянка та Дарунок об'єднані в кластер 1, що є логічним, оскільки при створенні сорту Полянка був залучений сорт Дарунок. Ця пара сортів відрізняється від решти відсутністю алельного варіанта розміром 204 п.н. за локусом TPSSR 23. Для сортів Маруся і Полтавська 75 характерною є відсутність алеля 216 п.н. (TPSSR 16). Поруч із сортом Полтавська 75 на дендрограмі розташований сорт Кумач, для яких характерним є алель 246 п.н. за локусом TPSSR 23. Слід зазначити, що цей алельний варіант у загальній вибірці сортів більше не зустрічається. Сорти Маруся та Поліс створені в одному селекційному центрі й відрізняються від інших сортів відсутністю алельного варіанта 162 п.н. (TPSSR 28).

До складу другого кластера увійшов один сорт кийської селекції – Миронівська 45 (основна група сортів з цього регіону розташована у першому кластері), але слід звернути увагу на те, що він створений іншим оригіном

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЯ

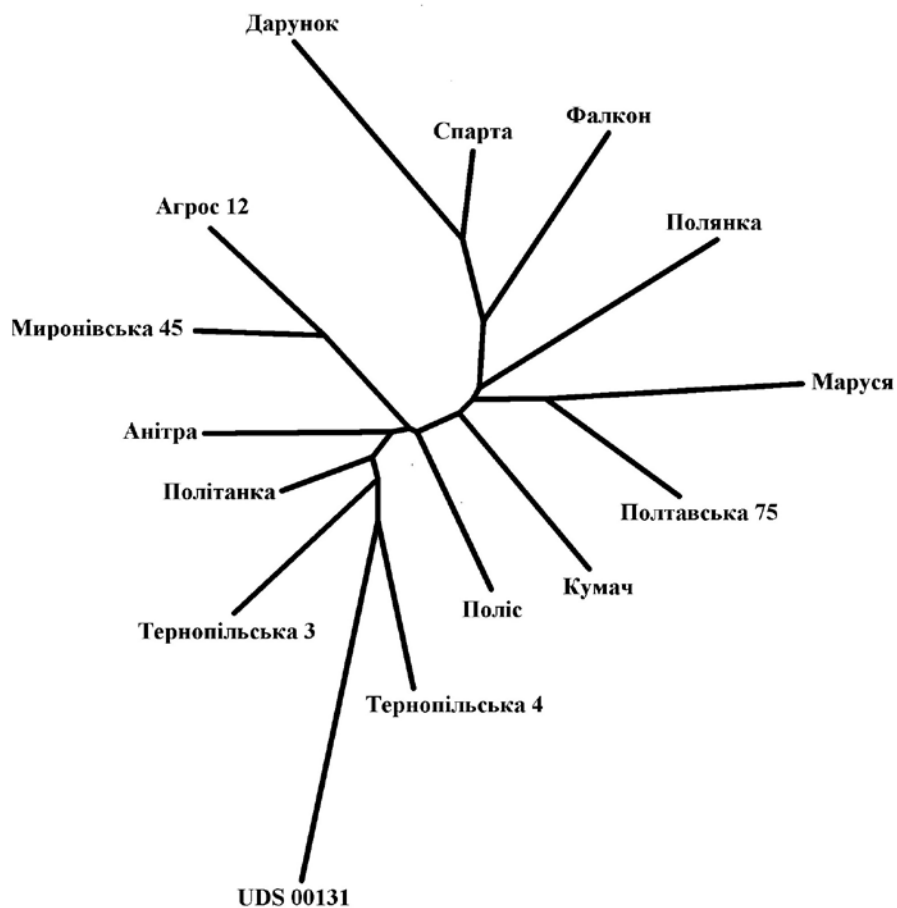


Рис. 1. Дендрограма сортів конюшини лучної, побудована методом NJ.

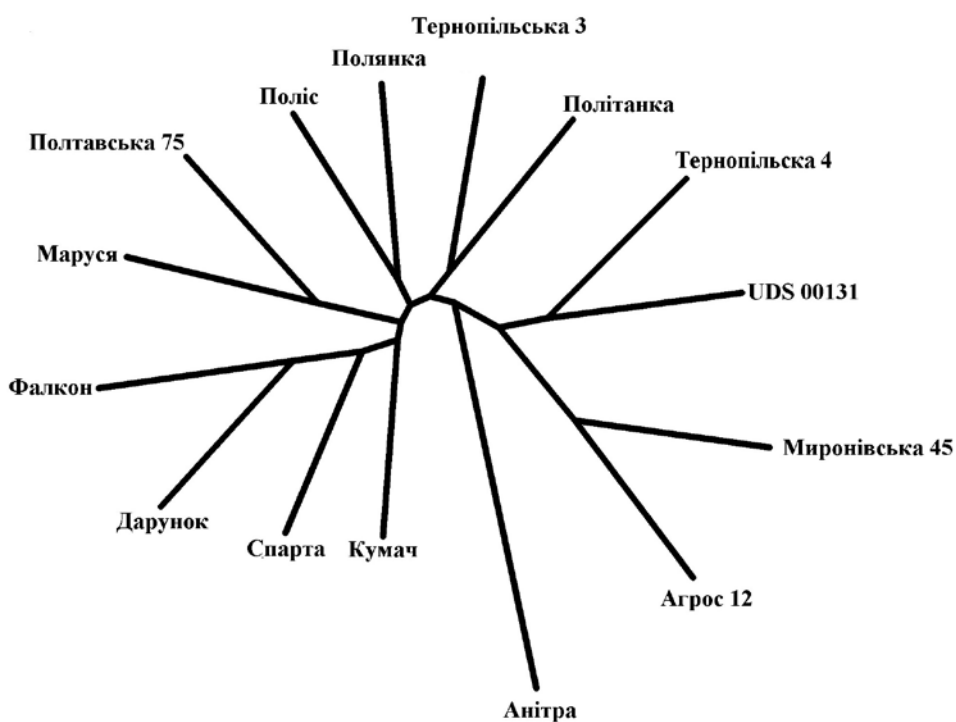


Рис. 2. Дендрограма, побудована після бутстреп-аналізу при 1000 повтореннях.

(Миронівський інститут селекції та насінництва). Сорти вінницької селекції Анітра та Політанка об'єднані у другому кластері та розташовані поруч. Сорти зі Західного регіону України (Тернопільська 3, Тернопільська 4) та карпатський місцевий сорт UDS 00131 групуються разом та характеризуються присутністю алеля 141 п.н. за локусом TPSSR 17. Сорти чернігівської селекції Агрос 12 і Фалкон створені різними оригінаторами і, відповідно, представлені в різних кластерах. Сорти Агрос 12, Миронівська 45, Анітра, Тернопільська 4 об'єднує алель розміром 230 п.н. за локусом TPSSR 50, а пари сортів Агрос 12 – UDS 00131, Агрос 12 – Анітра, Політанка – UDS 00131 алелі 130 п.н. (TPSSR 50), 182 п.н. (TPSSR 28) та 246 п.н. (TPSSR 34), відповідно. Відсутністю алелів порівняно із загальною вибіркою характеризуються пари сортів: Миронівська 45 – Політанка (216 п.н., TPSSR 23) та Агрос 12 – Анітра (160 п.н., TPSSR 29).

Слід відзначити, що дендограми, побудовані при аналізі різних ділянок геному, організмів можуть мати зовсім інші топології. Тому для більш точних висновків про генетичні взаємовідносини між генотипами слід залучати додаткові генетичні методи та будувати узагальнене дерево на основі різних типів маркерів.

Нами була проведена перевірка достовірності топології дендограми сортів конюшини лучної бутстреп-аналізом. Бутстреп-аналіз – один з найпоширеніших методів перевірки достовірності дендограми, який ґрунтується на методах повторних вибірок (resampling) (Лукашов, 2009).

Для оцінки достовірності топології побудованої дендограми був застосований метод бутстреп-аналізу при 1000 повтореннях (рис. 2). Порядок розташування вузлів NJ-дендограми зберігається, але це підтверджується в основному низькими бутстреп-значеннями (9,2 – 61,0 %), що теоретично може призводити до іншої топології дерева взаємовідносин сортів конюшини лучної, й тоді всі можливі дерева будуть рівнозначно ймовірними.

Лише один вузол дендограми характеризуються достовірно високим бутстреп-значенням (>70%) (Лукашов, 2009). Це вузол, на якому розташований сорт Анітра (значення бутстреп – 100%).

Таким чином, складені алельні формули сортів конюшини лучної із залученням мікросателітних ділянок можуть бути використані як

генетичні паспорти, необхідні для оптимізації баз даних та захисту авторських прав селекціонера на сорт. Проведене дослідження дозволило сформуванню бази даних – типування сортів конюшини лучної за SSR локусами. Висновки, зроблені на основі результатів кластеризації сортів конюшини лучної, потребують додаткових досліджень, залучення інших типів маркерів для побудови узагальненого дерева.

ЛІТЕРАТУРА

- Дугарь Ю.Н. ISSR-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2012. – Вип. 2 (26). – С. 98-103.
- Дугарь Ю.Н., Попов В.Н. RAPD-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) разного эколого-географического происхождения // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія. – 2011. – Вип. 13, № 947. – С. 81-86.
- Ким Дж.-О., Мьюллер У., Клекка У.Р., Олдендерфер М.С., Блэшфилд Р.К. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 215 с.
- Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 59-66.
- Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 256 с.
- Саналатий А.В., Солоденко А.Е., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40. – № 4. – С. 31-37.
- Сиволап Ю.М., Топчиева Е.А., Чеботарь С.В. Идентификация и паспортизация сортов мягкой пшеницы методами RAPD- и ssrp-анализа // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 44-51.
- Сиволап Ю.М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. – Одесса: Астропринт, 2011. – 336 с.
- Солоденко А.Е., Саналатий (Трояновская) А.В., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника с помощью микросателлитных маркеров // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 15-19.
- Чеботарь С.В., Сиволап Ю.М. Дифференциация, идентификация и создание базы данных сортов *T. aestivum* L. Украинской селекции на основе STMS-анализа // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 6. – С. 18-27.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЯ

- Рябчун В.К., Богуславський Р.Л. Проблеми та перспективи збереження генофонду рослин в Україні. – Харків, 2002. – 38 с.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moor D.D., Seidman J.G. Current protocols in molecular biology. – New York: John Wiley & Sons, 1987. – P. 4.3.1-4.3.3.
- Berzina I., Zhuk A., Veinberga I., Rashal I., Rungis D. Genetic fingerprinting of Latvian red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties using simple sequence repeat (SSR) markers: comparisons over time and space // Latvian J. Agronomy. – 2008. – № 11. – P. 28-32.
- Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // BioTechniques. – 2004. – V. 36. – P. 214-216.
- Campos-de-Quiroz H., Ortega-Klose F. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers // Euphytica. – 2001. – V. 122. – P. 61-67.
- Dias P.M.B., Julier B., Sampoux J-P., Barre P., Dall'Agnol M. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers // Euphytica. – 2008. – V. 160. – P.189-205.
- Isobe S., Kolliker R., Hisano H., Sasamoto S., Wada T., Klimenko I., Okumura K., Tabata S. Construction of a consensus linkage map for red clover (*Trifolium pratense* L.) // BMC Plant Biol. – 2009. – 9:57.
- Klimenko I., Razgulayeva N., Gau M., Okumura K., Nakaya A., Tabata S., Kozlov N., Isobe S. Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover // Theor. Appl. Genetics. – 2010. – V. 120. – P. 1253-1263.
- Kolliker R., Enkerli J., Widmer F. Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries // Molecular Ecology Notes. – 2006. – № 6. – P. 50-53.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Coulman B.E., Fortin M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA // Euphytica. – 1996. – V. 89. – P. 355-361.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Fortin M.G., Coulman B.E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers // Euphytica. – 1995. – V. 84. – P. 237-246.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Nat. – 1972. – № 106. – P. 283-292.
- Riday H., Krohn A. Genetic map-based location of the red clover (*Trifolium pratense* L.) gametophytic self-incompatibility locus // Theor. Appl. Genetics. – 2010. – V. 121. – P. 761-767.
- Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y., Kaneko T., Sakurai N., Okumura K., Klimenko I., Sasamoto S., Wada T., Watanabe A., Kohara M., Fujishiro T., Tabata S. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.) // DNA Research. – 2005. – V. 12. – P. 301-364.

Надійшла до редакції
22.10.2012 р.

IDENTIFICATION AND CERTIFICATION OF RED CLOVER VARIETIES (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) BY SSR MARKERS

Yu. M. Dugar¹, V. M. Popov²

¹V.V. Docuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)

²V.Ya. Yuriev Plant Production Institute
of National Academy of Agrarian Sciences
(Kharkiv, Ukraine)

Identification and certification of 15 red clover varieties of Ukrainian selection with application microsatellite sequences are done. Unique alleles and allele specific for all genotypes are detected. The dendrogram of clover varieties with neighbor-joining method is done. Possible reasons of grouping in two clusters the studied red clover varieties on the basis of genetic distances Nei are discussed.

Key words: *Trifolium pratense* L., microsatellites, certification, cluster analysis

ДУГАРЬ, ПОПОВ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ
СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)
ПО SSR МАРКЕРАМ**

Ю. Н. Дугарь¹, В. Н. Попов²

¹*Харковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)*

²*Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева
Национальной академии аграрных наук Украины
(Харьков, Украина)*

Проведена идентификация и паспортизация 15 сортов клевера лугового украинской селекции с использованием микросателлитных последовательностей. Выявлены уникальные аллели, а также аллели, характерные для всех генотипов. Построена дендрограмма сортов клевера с помощью ближайших соседей. Обсуждаются возможные причины объединения изученных сортов клевера в два кластера на основании генетических дистанций Nei.

Ключевые слова: *Trifolium pratense* L., микросателлиты, паспортизация, кластерный анализ