

the proportion of polymorphic bands, the resolving power (Rp), the discrimination power (D), the discriminating power (D_L), the polymorphism information content (PIC), the marker index (MI) and the number of non-differentiated pairs (ND) were calculated. **Results.** The informativeness indices were calculated for each primer based on the frequency of individual bands and banding patterns. This was followed by correlation analysis of the indices. A very strong relationship was found between D_L and ND, and between MI and proportion of polymorphic amplicons ($p < 0.001$). There were also high or moderate significant correlations between other parameters, with the exception of PIC. The estimated number of non-differentiated pairs and that determined experimentally were very close for all primers. **Conclusions.** All of the informativeness indices, except PIC, describe the efficiency of PCR-based markers in some way. The comparison of different markers showed that the most informative was the discriminating power. It can be used successfully to select the primers for genetic diversity assessment, while the confusion probability (C) can be used to determine the minimal set of primers necessary to discriminate between the genotypes in a sample of N accessions.

Key words: discriminating power (D_L), informativeness indices of markers, PCR-based markers.

УДК 577.21:633.852

БАЄР Г.Я.², БОЙЧУК Ю.М.², ПРКО Я.В.², КОРХОВИЙ В.І.², РАХМЕТОВ Д.Б.¹, ЄМЕЦЬ А.І.², БЛЮМ Я.Б.²

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

² Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: galinabayer@mail.ru

ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ РИЖІЮ ПОСІВНОГО (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) ЗА ДОПОМОГОЮ ISSR-АНАЛІЗУ

Інтерес до біопалива спонукав дослідників критично оцінити альтернативні джерела сировини для виробництва біодизелю. Один із способів подолати попит на олії – використання нетрадиційних олійних рослин. До таких рослин, що не використовуються широко в харчовій промисловості, належить *Camelina sativa* (L.) CRANTZ (рижій посівний) родини Brassicaceae, який є найбільш перспективною в цьому відношенні культурою. Ще на початку ХХ століття рижій вирощувався на невеликих площах в Україні, Росії, Європі, головним чином з метою отримання олії для освітлення та фарбування. Однак протягом тривалого часу ця культура вважалася бур'яном, що засмічує посіви льону. Поновлення інтересу до *C. sativa* в якості сировини для отримання біопалива пов'язане з його посухостійкістю і невибагливістю до родючості ґрунтів. Рижій, як скоростигла культура, вирізняється коротким вегетаційним періодом, високою адаптаційною здатністю до абіотичних стресових факторів, стійкістю до хвороб та шкідників [1, 2]. У відділі нових культур НБС ім. М.М. Гришка НАН України створено цінний генофонд рижію [3]. До того ж важливість *C. sativa* для виробництва біодизеля вже добре доведено [4]. Олія та

біодизель з рижію були використані в якості палива у випробуваннях двигуна з багатобіаючими результатами [4, 5]. Незважаючи на свій потенціал щодо отримання олії, на цей час інформація про стан генофонду цього виду, особливо новостворених сортозразків, залишається досить обмеженою.

Зі збільшенням кількості нових подібних або тісно пов'язаних сортів рижію все актуальнішим стає процес реєстрації створеного сорту, його сертифікації та захисту авторських прав селекціонерів. Молекулярні маркери відрізняються високим рівнем поліморфізму між сортами і можуть ефективно використовуватися для оцінки загальних генетичних характеристик рослин [6]. Тому метою нашої роботи було за допомогою ISSR-аналізу вивчити генетичну мінливість і диференціацію деяких форм та сортів *C. sativa*, зробити їх генетичне профілювання.

Матеріали і методи

Для ISSR-аналізу використовували 8 форм та 4 сорти рижію посівного (*Camelina sativa*) з колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка, насіння яких висівали в ґрунт в умовах культуральної кімнати. ДНК екстрагували з 10-денних проростків за допомо-

гою ЦТАБ [7]. Для аналізу використовували 7 олігонуклеотидних праймерів до мікросателітних послідовностей (табл. 1). Праймери було синтезовано на приладі АВ 3400 DNA Synthesizer у ЦККП «Гентест» (Інститут харчової 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 dNTP, 2,5 одиниці Taq-полімерази (Хелікон, Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США) за наступною схемою: початкова денатурація при 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.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркери (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, «Fermentas» (Литва), та 1Kb Plus DNA Ladder,

«Invitrogen» (США). Рівень поліморфізму оцінювали для кожного праймера у відсотках як відношення кількості поліморфних ПЛР-локусів до загальної кількості детектованих ПЛР-локусів за формулою:

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

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

Для визначення генетичних взаємовідносин між досліджуваними зразками розраховували генетичні дистанції за Неєм [8], матрицю яких в подальшому було використано для побудови дендрограми за незваженим парногруповим методом з арифметичним усередненням (UPGMA) за допомогою комп'ютерної програми «TREE 4.5».

Результати та обговорення

У результаті проведеного ISSR-аналізу 8 форм та 4 сортів рижю посівного було виявлено 68 локусів (ампліконів), 52 (76%) з яких виявились поліморфними (рис. 1).

Таблиця 1. Праймери, що були використані в роботі для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму серед генотипів рижю посівного

Праймер	5'→3' послідовність	Розмір фрагментів, пн.
ISSR-3	(CT) ₈ TG	350–2000
ISSR-4	(CA) ₅ GT	300–900
ISSR-16	(AG) ₇ GT	150–700
ISSR-18	(ACTG) ₅	350–2000
Cv05	(AC) ₈ TG	250–1400
Cv25	(AC) ₈ CA	450–3000
Cv62	(AG) ₈ CA	250–1000

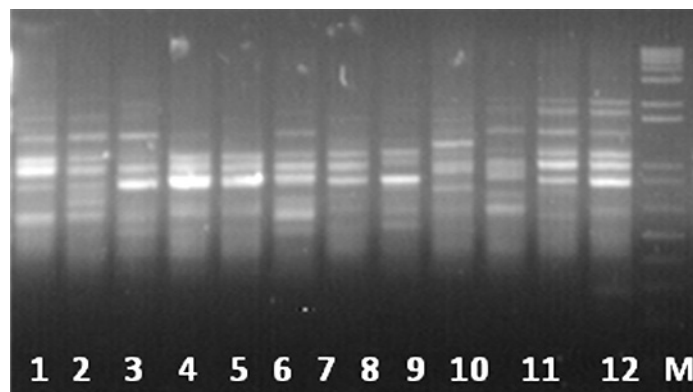


Рис. 1. Результати ампліфікації ДНК сортозразків рижю з праймером Cv25 (1– сорт Перемога; форми: 2 – ФЕОРЖЯФ-5; 3 – ФЕОРЖЯФД; 4 – ФЕОРЖЯФЧП; 5 – ФЕОРЖЯФ-4; 6 – ФЕОРЖЯФ-2; 7 – ФЕОРЖЯФЕ-1; 8 – ФЕОРЖЯФ-3; 9 – ФЕОРЖЯФЧ; сорти: 10 – Колондайк; 11 – Міраж; 12 – Свро-12; М – ДНК-маркер)

Більшість фрагментів мали довжину в межах 400–2000 п. о. Найбільшу кількість ампліфікованих фрагментів після проведення ПЛР спостерігали при використанні праймерів Cv05 і Cv25, що раніше були запропоновані для мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та *C. pyrenoidosa* [9]. Дані праймери виявилися досить ефективними і для вивчення генетичної різноманітності *C. sativa* (табл. 2).

Середня кількість ПЛР-фрагментів на праймер склала – 9,7. У результаті ампліфікації з праймером ISSR-4 виявили найбільшу кількість поліморфних локусів – 100%. Для досліджуваних генотипів виявлено 9 унікальних локусів, а саме: у сорту Клондайк – 4 локуси; у форм: ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧП; ФЕОРЖЯФ-4; ФЕОРЖЯФЧ; Міраж – по одному унікальному локусу. За сумарними даними ПЛР-аналізу

проведено розрахунок генетичних дистанцій та кластеризацію зразків, що досліджувались. Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,100 до 0,450. Виявилось, що найбільш генетично гетерогенними були форма ФЕОРЖЯФ-2 та сорт Перемога, які до того ж мали найбільші значення генетичної відстані. В той же час найменша генетична відстань була зафіксована між формою ФЕОРЖЯФ-3 та сортом Євро-12. В цілому досліджувані зразки доволі чітко різняться між собою, що засвідчує непогані диференціюючі властивості використаних праймерів під час проведення ISSR-аналізу, а отримані результати підтверджують можливість використання цього виду аналізу як ефективного експрес-методу для вивчення генетичного поліморфізму та генотипування сортозразків.

Таблиця 2. Ефективність праймерів при аналізі рослин *Camelina sativa*

Праймер	Загальна кількість локусів, шт	Поліморфні локуси, шт	Поліморфізм, %
ISSR-3	7	4	57,14
ISSR-4	7	0	100,0
ISSR-16	8	4	50,0
ISSR-18	7	5	71,0
Cv05	14	11	76,8
Cv25	14	13	92,8
Cv62	11	8	72,7
Всього:	68	52	76,5

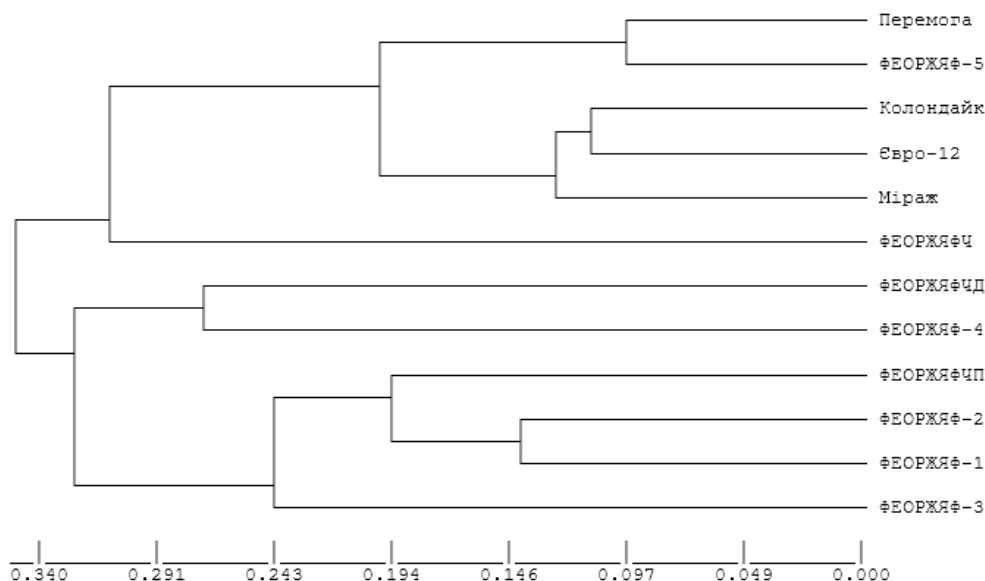


Рис. 2. Дендрограма, що демонструє взаємовідносини між дослідженими зразками *Camelina sativa* за даними ISSR-аналізу

Проведений кластерний аналіз дозволив наочно продемонструвати характер генетичної диференціації зразків рижію посівного (рис. 2). Побудована дендрограма містить два великі кластери, перший – складається з двох субкластерів, в які об'єдналися зразки селекції Національного ботанічного саду: ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4 та ФЕОРЖЯФЧП, за винятком форми ФЕОРЖЯФЧД, що має походження з Данії. Другий великий кластер об'єднав сорти: Перемога, ФЕОРЖЯФ-5, Клондайк, Євро-12 та Міраж.

Висновки

За допомогою ISSR-аналізу проаналізовано 12 генотипів *C. sativa*, досліджено генетичну мінливість та їх диференціацію. В цілому рівень генетичного поліморфізму рижію посівного становив 76,5%. Досліджувані зразки

доволі чітко різняться між собою, що засвідчує непогані диференціюючі властивості використаних під час проведення ISSR-аналізу праймерів, а отримані результати підтверджують можливість використання цього виду аналізу як ефективного експрес-методу оцінки генетичного поліморфізму у *C. sativa*. На основі варіабельності міжмікросателітних послідовностей у досліджених зразків рижію визначено ступінь генетичних відмінностей і побудована дендрограма, що наочно демонструє взаємовідносини між ними. Унікальні ПЛР-фрагменти були виявлені у 6 генотипів. Отримані результати можуть бути використані в селекційних програмах для генетичної ідентифікації сортів, захисту авторських прав і для контролю за поширенням перспективного селекційного матеріалу.

Література

1. Putnam D., Budin J., Field L., Breene W. Camelina: a promising low-input oilseed. In New crops. Edited by: Janick J., Simon J.E. – New York: Wiley, 1993. – P. 314–322.
2. Gehringer A., Friedt W., Luhs W., Snowdon R.J Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*) // Genome. – 2006. – 49. – P. 1555–1563.
3. Рахметов Д., Самойленко И. Рыжей – альтернативная масличная культура // Зерно, «Новый друк». – 2012. – № 2 (70). – С. 50–56
4. Frohlich A., Rice B. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production // Ind. Crop. Prod. – 2005. – 21. – P. 25–31.
5. Bernardo A., Howard-Hildige R., O'Connell A., Nichol R., Ryan J., Rice B., Roche E., Leahy J.J: Camelina oil as a fuel for diesel transport engines // I nd. Crop. Prod. – 2003. – 17. – P. 191–197.
6. Sofalianye O., Chaparzadeh N., Dolati M. Genetic diversity in spring wheat landraces from northwest of Iran assessed by ISSR markers // Not. Bot. Hort. Agrobot. – 2009. – N 37 (2). – P. 252–256.
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. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – 76. – P. 5269–5273.
9. Songdong S. Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* // Chin. J Ocean. Limn. – 2008. – 26, N 4. – P. 380–384.

BAYER G.YA.², **BOICHUK YU.M.**², **PIRKO YA.V.**², **KORKHOVOY V.I.**², **RAKHMETOV D.B.**¹, **YEMETS A.I.**², **BLUME YA.B.**²

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

² Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: galinabayer@mail.ru

ANALYSIS OF BREEDING FALSE FLAX (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) MATERIAL WITH ISSR MARKERS

Aims. The aim of investigation is the applicability of ISSR markers for uncovering polymorphism to study the relationships between *C. sativa* genotypes. **Methods.** Twelve genotypes were analyzed using seven 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 *C. sativa* is 76.5%. The unique fragments have been revealed in 6 genotypes. The studied genotypes were divided in two clusters. **Conclusions.** It was shown that ISSR

analysis is the useful method for fingerprinting and determination of relationships between the different *C. sativa* genotypes. The results can be used in breeding programs for the genetic identification of cultivars for copyright protection and to control the spread of promising breeding material.

Key words: *Camelina sativa*, ISSR-PCR, polymorphism, genetic distances.

УДК 633.11:575

ЗАЙЦЕВА Г.П., АКИНИНА Г.Е., ТВЕРДОХЛЕБ Е.В., ДУГАРЬ Ю.Н., ПОПОВ В.Н.

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН,

Украина, 61060, г. Харьков, пр. Московский 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *Lr* ГЕНОВ В СОРТАХ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Бурая, или листовая, ржавчина, одна из основных болезней пшеницы (*Triticum aestivum* L.), возбудителем которой является гриб *Puccinia triticina* Erikss., может приводить к потерям урожая, а также к снижению качества зерна. Устойчивость к бурой ржавчине мягкой пшеницы является предпосылкой для получения стабильно высоких урожаев.

В настоящее время идентифицировано более 70 *Lr*-генов, 67 из них картированы относительно разных ДНК-маркеров [1]. В частности, *Lr10* локализован на коротком плече хромосомы 1А и не является широко эффективным, однако может играть позитивную роль в сочетании с другими генами устойчивости [2]. *Lr34* картирован на хромосоме 7D, относится к числу наиболее высокоэффективных генов устойчивости к бурой ржавчине. *Lr20* расположен на длинном плече хромосомы 7А. Источником гена *Lr26* является рожь (*Secale cereale* L.), он находится на коротком плече хромосомы 1RS. Гены *Lr24* и *Lr19* привнесены в мягкую пшеницу от *Agropyron elongatum* (Host) Beauv.

К настоящему времени осуществлено множество переносов полезных генов от дикорастущих сородичей пшеницы в геном мягкой пшеницы, однако, лишь небольшое число генов можно использовать в селекционных целях. Создавать сорта пшеницы, сочетающие несколько олигогенов, или специфическую и неспецифическую устойчивость, легче при использовании молекулярных маркеров генов. Они являются мощным инструментом, позволяющим пирамидировать гены (marker assisted selection – MAS breeding programs). Кроме того, несколько генов устойчивости можно идентифицировать совместно посредством тестирования на присутствие молекулярных маркеров. Определить гены

устойчивости с помощью молекулярных маркеров возможно на ранних стадиях развития растения (семена и проростки). К настоящему времени известны ДНК-маркеры, сцепленные с генами устойчивости *Lr9* [7], *Lr24* [3], *Lr29*, *Lr25* [5], *Lr35* [4] и *Lr39* [6].

Целью наших исследований являлась идентификация *Lr*-генов в сортах озимой мягкой пшеницы украинской селекции с использованием ДНК-маркеров.

Материалы и методы

Сорта и линии пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.), были предоставлены Национальным центром генетических ресурсов растений Украины. Нами были проанализированы сорта и линии, созданные в Институте растениеводства им В.Я. Юрьева НААН (далее ИП), сорта Селекционно-генетического института НААН, г. Одесса (СГИ) и Мироновского института пшеницы им. В.М. Ремесло НААН, г. Киев (МИП). Из каждого учреждения было отобрано по 19 сортов (перечень сортов представлен в таблице). В качестве контроля использовали образцы с известными *Lr* генами. Для изучения генетического разнообразия сортов были выбраны 4 микросателлитных локуса сцепленных с *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr34* [8]. ДНК выделяли из смеси пяти семян набором реагентов для выделения ДНК из биологического материала DiatomDNAPrep100 (Неоген). Наличие *Lr* генов изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе Терцик (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 5 мкл ДНК и 1 мкМ каждого праймера. Для амплификации использовали следующую программу: 94 °С –