

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ ЛИНЕЙНОГО МАТЕРИАЛА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

А.М. Свирщевская, С.В. Малышев, О.М. Щербина, Л.В. Милько, А.В. Кильчевский

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

A.Svirshchetskaya@igc.bas-net.by

Область применения микросателлитов, или простых нуклеотидных повторов (SSR) включает идентификацию родства и популяционной принадлежности отдельных особей, эволюционную и экологическую генетику, генетическое картирование. В данной работе SSR-маркеры были использованы для оценки генетического разнообразия линейного материала сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и для установления возможности паспортизации линий этой сельскохозяйственной культуры. Генетическое разнообразие у перекрестноопыляемой сахарной свеклы связано с особенностями ее селекции и оценивается как невысокое. Для создания у нее гетерозисных гибридов необходим линейный материал, который может быть получен биотехнологическими методами и традиционным инбридингом.

Для решения первой задачи в опыты по SSR-маркированию были взяты 29 образцов сахарной свеклы, среди которых 17 линий были получены нами с использованием технологии гиногенеза *in vitro* [1], 10 линий и 2 сорта «Белорусская односемянная 69» и «Белоцерковская односемянная 40» были предоставлены селекционными станциями по сахарной свекле. Генотипы были представлены смесью образцов ДНК 10 растений в случае линейного материала и 20 растений в случае анализа сортов. Полиморфизм микросателлитов, обнаруженный с использованием секвенатора ALFexpress II, был относительно низким. В целом, было детектировано 55 аллелей с применением набора из 15 микросателлитных маркеров [2-5]. Количество аллелей варьировало от 2 в локусе Gcc1 до 8 в локусе Vmb4 и в среднем составило 3.7 аллели на маркер. Среднее значение PIC (индекса информационного содержания полиморфизма) составило 0.526 и изменялось от 0.123 в локусе Vmb2 до 0.834 в локусе Vmb4 (таблица). Neighbor Joining метод кластеризации выявил три основных группы образцов. Первый кластер включал четыре гаплоидных гиногенетических линии, индуцированных *in vitro* от различных семян донорного растения сорта «Белорусская односемянная 69». Второй кластер был сформирован из гомозиготных гиногенетических линий, сформированных на основе сортов «Янаш» и «Белоцерковская односемянная 40», сорта «Белоцерковская односемянная 40» после циклов семенной репродукции. Пять гомозиготных линий, γ -облученных дозами 30 Грэй и 300 Грэй (лаборатории МАГАТЭ, г. Зайберсдорф, Австрия) оказались в том же кластере, что и необлученные исходные гомозиготные линии. Третий кластер включал сорт «Белорусская односемянная 69» и 12 линий различного уровня пloidности - 2x и 4x. Четыре из пяти тетраплоидных линий и пять мужски стерильных диплоидных линий независимо от их различного географического происхождения были обнаружены в одной группе, причем все эти 9 линий были традиционно отселектированными в отличие от созданных путем гиногенеза *in vitro* линий, представляющих два других кластера. Таким образом, применение большого числа (15) микросателлитных маркеров при оценке генетических дистанций между проанализированными генотипами сахарной свеклы позволило составить ясную картину их кластеризации: гомозиготные линии непосредственно после культуры *in vitro*; гомозиготные линии (облученные и необлученные) после нескольких циклов семенной репродукции; линейный материал, отобранный на селекционных станциях, разного уровня пloidности и происхождения после нескольких циклов семенной репродукции.

Для установления возможности паспортизации образцов сахарной свеклы с помощью микросателлитных маркеров в качестве объекта исследования были взяты популяции растений ее диплоидных линий. Каждая линия была представлена 10 образцами ДНК

индивидуальных растений и проанализирована с помощью 7 микросателлитных маркеров (Bmb6, Gcc1, Sb6, Sb7, Sb9, Sb11, Sb15). Сравнивали между собой линии, полученные путем гиногенеза и путем традиционного инбридинга, происходящие от сорта «Ганусовская односемянная 55» и сорта «Белорусская односемянная 69». Генетический паспорт линии можно представить в виде последовательности букв, обозначающих микросателлитные маркеры, с индексами, соответствующими количеству и размеру наблюдаемых аллелей в конкретном локусе. Между двумя линиями, созданными различными способами на основе сорта Ганусовская односемянная 55, отмечены различия в 4 локусах (Gcc1, Sb7, Sb 11, Sb15) из 7 проанализированных. Между двумя гиногенетическими линиями и двумя инбредированными линиями, созданными на основе сорта «Белорусская односемянная 69», различия были выявлены во всех вариантах попарного сравнения, а именно: четыре раза по 5 локусам из 7, один раз – по 4 из 7 и по 6 из 7 проанализированных. Пример паспорта для линии Ган 55 - 9(2) A_{134,146} B_{98,101} C_{162,165} D_{267, 269} E_{133, 136, 139} F_{173, 177} G_{151,157}, для линии Бел 69 -3(5) A₁₄₆ B₉₈ C_{165,168} D_{267, 273} E₁₃₆ F_{171, 177} G₁₄₇. Небольшие различия в размерах аллелей в двух опытах обусловлены использованием разных стандартов молекулярного веса. На основании полученных данных сделан вывод о возможности генетической паспортизации диплоидных линий сахарной свеклы с использованием 7 и более микросателлитных маркеров.

Таблица

Характеристика степени полиморфизма, количества и размера аллелей в наборе микросателлитных локусов, использованных для анализа линейного материала сахарной свеклы

№	Локус	Количество известных аллелей (диапазон размера в п.о.)	Источник цитирования	Количество и размер аллелей, наблюдаемые в опытах, (п.о.)	PIC значение
1	Bmb2	3 (260-300)	Cureton et al. 2002	3 (267, 273, 291)	0.12
2	Bmb3	4 (220-270)	Cureton et al. 2002	4 (252, 257, 263, 265)	0.70
3	Bmb4	5 (212-240)	Cureton et al. 2002	8 (187, 190, 208, 220, 224, 236, 242, 244)	0.83
4	Bmb6	4 (159-191)	Cureton et al. 2002	4 (131, 142, 158, 170)	0.58
5	Bvm1	-	Mörchen et al. 1996	3 (149, 151, 154)	0.53
6	Sb6	8 (144-168)	Richards et al. 2004	3 (159, 162, 165)	0.55
7	Sb7	6 (246-276)	Richards et al. 2004	4 (263, 265, 267, 270)	0.52
8	Sb9	2 (129-132)	Richards et al. 2004	3 (130, 133, 136)	0.40
9	Sb11	5 (169-177)	Richards et al. 2004	4 (165, 167, 169, 173)	0.42
10	Sb13	3 (126-132)	Richards et al. 2004	3 (126, 129, 132)	0.56
11	Sb15	11(135-165)	Richards et al. 2004	4 (144, 148, 154, 164)	0.57
12	Caa1	13 (145-183)	Viard et al. 2002	3 (125, 153, 173)	0.46
13	Ct4	14 (148-161)	Viard et al. 2002	4 (147, 150, 152, 154)	0.66
14	Gcc1	4 (97-125)	Viard et al. 2002	2 (111, 113)	0.48
15	Gtt1	4 (117-126)	Viard et al. 2002	3 (122, 125, 127)	0.50

1. Svirshchevskaya, A.; Dolezel, J. 2000. Production and performance of gynogenetic sugar beet lines. J. Sugar Beet Research (USA) 37(4):117-133.
2. Mörchen M., Cuguen J., Michaelis, G., Hänni, C., Samitou-Laprade, P. 1996. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L.
1. Cureton, A.N.; Burns, M.J.; Ford-Lloyd, B.V.; Newbury, H.J. 2002. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow between sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations. Molecular Ecology Notes 2:402-403.
3. Viard, F., Bernard, J., Desplanque B. 2002. Crop-weed interactions in the *Beta vulgaris* complex at a local scale: allelic diversity and gene flow within sugar beet fields. Theor Appl Genet, 104:688-697.
4. Richards, C. M.; Brownson, M.; Mitchell, S.E.; Kresovich, S.; Panella, L. 2004. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). Molecular Ecology Notes 4:243-245.

АНАЛИЗ ИНТЕНСИВНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ *PINUS SYLVESTRIS* БЕЛОРУССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Е.М. Степанова, Г.Г. Гончаренко

УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины», Гомель, Беларусь
emstepanova@mail.ru

Одними из главных параметров, характеризующих генетические процессы в природных популяциях, являются показатели подразделенности (F_{ST}) и генного потока ($N_e m$). Их величины зависят от сложного взаимодействия микроэволюционных сил и могут серьезно различаться в изолированных или непрерывных популяциях одного вида. Целью нашей работы было определить уровень подразделенности и генного потока в 12 природных популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) на территории Белоруссии и сопредельных государств, расположенных в непрерывной части ареала произрастания *P. sylvestris*.

Определение степени подразделенности и величины генного потока проводилось на основании генетического анализа деревьев *P. sylvestris* из шести природных популяций Беларуси, четырех популяций России, одной популяции Латвии и одной украинской популяции. Каждое дерево было проанализировано по 21 гену посредством метода электрофоретического анализа изоферментов в крахмальном геле.

Величина генного потока ($N_e m$) рассчитывалась двумя методами: 1) количество мигрантов на поколение определялось из соотношения $N_e m = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$, где F_{ST} – коэффициент подразделенности популяций, 2) генный поток вычислялся исходя из частот уникальных аллелей по формуле $\log_{10} N_e m = (\log_{10} p(l) - b) / a$, где $p(l)$ – средняя условная частота уникального аллеля, a и b – коэффициенты [1, 2, 3, 4].

Определенные величины генного потока ($N_e m(F)$, $N_e m(p)$), показателей подразделенности (F_{ST}), а также частот уникальных аллелей ($p(l)$) в белорусских популяциях и в объединенном белорусско-российско-латвийско-украинском массиве представлены в таблице.

Таблица

**Показатели подразделенности и генного потока и у *P. sylvestris*
в популяциях Белоруссии и сопредельных государств**

Популяции	F_{ST}	$N_e m(F)$	$p(l)$	$N_e m(p)$
Белорусские	0.015	16.42	0.0169	10.36
Белорусские+сопредельных государств	0.019	12.91	0.0165	11.40