

<sup>1</sup>Головань Л.В., к. сільск.-госп. н., доцент, <sup>1</sup>Чуприна Ю.Ю., <sup>2</sup>Близнюк О.М., д.техн.н, професор, <sup>2</sup>Масалітіна Н.Ю., к.техн.н, доцент, <sup>2</sup>Белінська А.П., к.техн.н., доцент, <sup>2</sup>Белих І.А., к.б.н, доцент

## ОЦІНКА ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ РОДУ *VIGNA SAVI* З ВИКОРИСТАННЯМ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ – ISSR МАРКЕРІВ

<sup>1</sup>Державний біотехнологічний університет", Харків

<sup>2</sup>Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", Харків

**Ключові слова:** вигна, генофонд, амплікони, поліморфізм, маркери, ДНК, ISSR, локус, походження, еволюція.

Світові генетичні ресурси рослин є основним джерелом покращення сільськогосподарських культур на найближчі десятиліття. Генофонд рослин має прихований ресурс нових генів, або їх поєднань, у тому числі – селекційно-важливих ознак. Вивчення потенціалу рослинного генофонду з основним біологічним та господарським ознакам дозволяє розширити генетичну базу культур для успішної реалізації селекційних програм різного напрямку. Рід Вигна (*Vigna*) нараховує близько 200 видів, які вирощуються в теплих регіонах планети. Центри походження видів знаходяться в Африці, але маш, урд, адзукі та рисова квасоля мають азіатське походження [1, 2]. Колекція нараховує 20 зразків, які належать до 7 видів роду *Vigna*: *V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal (вигна аконитоліста, мотт) – 3 зразки, *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (адзукі) – 4, *V. radiata* (L.) R. Wilczek (маш) – 4, *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi (вигна рисова) – 4, *V. unguiculata* (L.) Walp. (китайська) – 5. В основному, це місцеві сорти, біля 10 % – селекційні сорти та 1% складають форми, які ростуть в природі.

Багатогранне використання культивованих видів роду *Vigna* сприяло їх поширенню по всій території тропічних, субтропічних та помірних зон земної кулі. Вони є економічно важливими культурами у багатьох країнах, що розвиваються. Аналіз географічного показав, що більшість зразків надійшли від ареалів світового землеробства та формотворення культур. більшість зразків *V. radiata*, *V. mungo*, *V. aconitifolia*, *V. trilobata*, *V. umbellata* отримано з Індії та Пакистану, *V. angularis* – зі Східної Азії та Китаю, *V. unguiculata* – східної Африки (Ефіопія, Кенія), *V. unguiculata* – з Китаю [2, 3]. Однак конкретне місце одомашнення цієї культури точно не було встановлено, і в численних джерелах літератури можна зустріти різні думки вчених з питань походження вигни та центрів її різноманітності [3]. Останнім часом, використовуючи методи молекулярної генетики (RAPD, AFLP та інших) було підтверджено, що північна частина Африки є центром походження окультуреної, оскільки, дикі типи Західної Африки більш близькі до культурних форм, ніж дикі типи Східної та Південної Африки [4–6]. Варто відмітити, що види вигни мають значний внутрішньовидовий поліморфізм. У зразків відмічена сильна мінливість морфологічних та господарсько-цінних ознак [7]. Такий широкий розмах варіативної мінливості обумовлений місцями культивування зразків, різними екологічними умовами (рівнини, гори, клімат).

Розвиток науки сприяв появі біотехнологічних методів, що дозволяють виявити відмінності безпосередньо в генетичному матеріалі, що дало великий стрибок у дослідженні структурно-функціональної організації геномів різних рослин, зокрема і роду

*Vigna*. Останнім часом здійснено багато наукових проектів щодо дослідження характеру генетичного розмаїття роду *Vigna*, вивчено філогенетичні взаємовідносини, а також шляхи реалізації генетичної інформації у фенотипі, використання генетичного моніторингу у селекції та розвитку стратегії кріоконсервації. Ці напрями були реалізовані завдяки використанню молекулярних технологій [3, 5, 8].

Однак ситуація, що склалася в цій галузі досліджень, залишає безліч ще не вирішених на даний момент систематичних та філогенетичних питань, генетичні та молекулярні дослідження яких дозволять надалі скласти правильне уявлення про еволюційний розвиток роду *Vigna*.

Метою роботи є аналіз еколого-географічного різноманіття зразків вигни колекції кафедри екології та біотехнології з використанням молекулярних маркерів, та дослідження потенційних можливостей використання даної культури в екологічній селекції для вирощування в кліматичних зонах нашої країни.

### Матеріал та методика досліджень

Об'єктом досліджень слугували 20 зразків зернобобових культур, які відносяться до роду *Vigna* (табл. 1). Вихідний матеріал був представлений Національним центром генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРЦУ). Рід *Vigna* був представлений підродом *Vigna* (15 зразків) і *Ceratotropis* (5 зразків). Аналізовані зразки підроду *Ceratotropis* були відібрані з трьох секцій: *Ceratotropis* – вид *V. radiata*; *Aconitifolia* – вид *V. aconitifolia*; *Angularis* – вид *V. angularis* та *V. umbellata*. Підвид *Vigna* був представлений секцією *Catiang*: вид *V. unguiculata* з підвидом *unguiculata*.

Таблиця 1 – Вихідний матеріал роду *Vigna Savi*

№ національного каталогу	Зразок	Країна походження
<i>V. radiata</i>		
UD1000006	Місцевий 4	Україна
UD1000015	Mungbohne	Німеччина
UKR001:00037	–	Україна
UKR001:00039	–	Узбекистан
<i>V. aconitifolia</i>		
UD1000033	–	Індія
UD1000019	–	Афганістан
UD1000021	–	Росія
<i>V. angularis</i>		
UD1000005	Шянь-ли	Росія
UD1000007	–	Китай
UD1000014	<i>Akatsukida vagon</i>	Японія
UD1000009	<i>Rotobuku Adsuki</i>	Японія
<i>V. umbellata</i>		
UD1000052	–	Індонезія
UD1000053	–	Індонезія
UD1000076	–	США
UD1000016	–	США
<i>V. unguiculata</i>		
UKR001:00040	–	Україна
UD1000043	Людміла	Україна
UD1000044	Гібрид 7	Україна
UD1000045	Удавчик	Україна
UKR001:00048	Соя овочева	Туркменістан

Поліморфізм ДНК зразків вигни вивчали з використанням праймерів до міжмікросателітних послідовностей (табл. 2) (University of British Columbia, Канада).

Таблиця 2 – Нуклеотидні послідовності ISSR маркерів

Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' ...3'	Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' ...3'
ISSR 2	(CA) <sub>8</sub> AG	UBC 807	(AG) <sub>8</sub> T
ISSR 810	(GA) <sub>8</sub> T	UBC 810	(GA) <sub>8</sub> T
ISSR 825	(AC) <sub>8</sub> T	UBC 826	(AC) <sub>8</sub> C
ISSR 834	(AG) <sub>8</sub> CTT	UBC 842	(GA) <sub>8</sub> CTG
ISSR 842	(GA) <sub>8</sub> CTG	UBC 846	(CA) <sub>8</sub> CT
UBC 2	(CA) <sub>8</sub> AG	UBC 857	(AC) <sub>8</sub> AG

ДНК виділяли із суміші 10 зрілих насінин кожного зразка за допомогою набору для виділення ДНК «Diatom DNA Prep100». Для цього використовували лікуючий реагент з гуанідінхлоридом для сольобізації клітинного дебрису та денатурації клітинних наклеаз. У присутності лікуючого реагенту ДНК сорбували на сілка-сорбенту, відмивали від білків та солей спиртовим розчином. Виділення ДНК проводили відповідно до протоколу, який запропоновано в інструкції до набору «Diatom DNA Prep100». Ампліфікацію ДНК проводили з використанням наборів для ПЛР GenePak™ PCR Core. Пробірки містили ліофілізовані сухі реакційні суміші, готові для проведення ПЛР, до них додавали 20 нг виділеної ДНК зразків вигни, 0,2мкМ праймера, потім реакційну суміш доводили до 20 мкл розчинником з набору для ПЛР. ПЛР проводили на чотирьохканальному програмованому термоциклері ТП4-ПЦР-01-Терцик за наступних умов: 1 цикл – початкова денатурація ДНК при 94 °С – 5 хв., 45 циклів ампліфікації за наступних умов для кожного циклу: 94 °С – 1 хв., відпал – 36 °С – 1 хв., елонгація – 72 °С – 2 хв., 1 цикл – фінальна елонгація, 72 °С – 7 хв. При даних умовах результати ампліфікації відтворювалися. Кожен аналіз проводився у 2-х кратній повторності.

Електрофорез продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 1,5 % 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 Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, 0,0031 М ЕДТА (рН 8,3). Електрофорез проводили у горизонтальному приладі Hoefer SuperSub100. Як маркер для визначення розмірів ампліфікованих фрагментів використовували 1 kb DNA leader та рUC19/Msp 1. Візуалізацію результатів аналізу здійснювали за допомогою транслюмінатора ТСР-20 МС з послідуочим фотографуванням гелів в Уф-променях. Визначення кількості та розмірів продуктів ампліфікації проводили за допомогою програмного пакету “TotalLab TL120” (<http://www.totallab.com>) демоверсія. За результатами аналізу були створені бінарні матриці по кожному праймеру, в яких було відмічено «присутність» (1) чи «відсутність» (0) фрагментів з однаковою молекулярною масою на електрофореграмі. Кожен компонент розглядався як окремий генетичний локус. Рівень поліморфізму для кожного праймеру визначали як частку поліморфних локусів від загальної кількості локусів на одні праймер, виражений у відсотках. Внутрішньопопуляційний та міжвидовий поліморфізм вигни за ДНК маркерами розраховували як частку виявлених локусів у певного зразка від загальної кількості ідентифікованих локусів, виражених у відсотках.

Аналіз генетичного різноманіття проводили обчисленням генетичних дистанцій за Nei, Li [9, 10]. Кластеризацію та побудову дендрограм, що показує філогенетичні зв'язки між вивченими зразками квасолі, проводили методом NJ (близьких сусідів) за

допомогою пакету 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 досліджень

Молекулярно-генетичний аналіз зразків вигни дозволив ідентифікувати 145 ISSR-локусів, серед яких 114 були поліморфними (78,6 %). Продукти ампліфікації ДНК різнилися за розміром та кількістю фрагментів. Максимальний рівень поліморфізму відмічено при використанні праймеру UBC 842 (100,0 %), а мінімальний – UBC 846 (50,0 %) (табл. 3). Кількість ампліфікованих локусів з використанням різних праймерів варіювала від 4 (UBC 846) до 17 (ISSR 834). Рівень поліморфізму зразків використовуваних при проведенні ISSR аналізу склав 78,6 %.

Таблиця 3 – Молекулярно-генетичний поліморфізм зразків вигни, виявлений з використання ISSR аналізу

Праймер	Кількість виявлених ампліконів, шт.	Кількість поліморфних ампліконів, шт.	Рівень поліморфізму, %	Розмір ампліконів, п.н.
ISSR 2	12	10	83,3	250-876
ISSR 810	16	13	81,3	374-871
ISSR 825	10	7	70,0	354-756
ISSR 834	21	17	81,0	278-1247
ISSR 842	9	5	55,6	357-845
UBC 2	15	10	66,7	267-951
UBC 807	11	9	81,8	224-901
UBC 810	7	5	71,4	421-876
UBC 826	14	13	92,9	247-1189
UBC 842	10	10	100,0	304-894
UBC 846	8	4	50,0	250-678
UBC 857	12	11	91,7	369-1523
<b>Всього</b>	<b>145</b>	<b>114</b>	<b>78,6</b>	–

З використанням праймера ISSR 834 у досліджуваних видів вигни ідентифіковано 17 локусів розміром ~278 – 1247 п.н. Один фрагмент (~394 п.н.) був монорфний і виявлявся у всіх колекційних зразків. У зразка UD1000016 виявлено унікальний локус довжиною 414 п.н. (рис. 1).

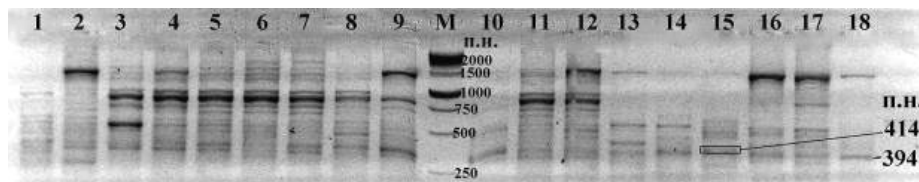


Рисунок – 1 Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК дослідних зразків вигни з праймером ISSR 834  
Цифрами позначено монорфні та унікальні фрагменти, п.н.

В результаті проведених досліджень детектовано 31 монорфний локус для всіх досліджуваних зразків вигни. Зокрема, за праймером ISSR 2 виявлений фрагмент

розміром 523 п.н., за ISSR 810 – 425 та 501 п.н., за ISSR 825 – 387 та 582 п.н., за ISSR 834 – 394, 654, 1025 та 1145 п.н., за ISSR 842 – 402 та 658 п.н., за UBC 2 – 320, 687 та 902 п.н., за UBC 807 – 369, 587 та 789 п.н., за UBC 810 – 521 та 857 п.н., за UBC 826 – 456, 578, 758 та 1056 п.н., за UBC 842 – 523 та 756 п.н., за UBC 846 – 496 та 647 п.н., за UBC 857 – 420, 875, 1145 та 1367 п.н.

Також у деяких зразків були виявлені унікальні амплікони, присутні тільки в одному генотипі. Так, генотип Mungbohne має унікальний локус довжиною 787 п.н., генотип Шянь-ли – ідентифіковано унікальний локус довжиною 1017 п.н., у генотипу Akatsukida wagon ідентифіковано два унікальні локуси з довжиною ~654 і 985 п.н., у зразка Rotobuku Adsuki виявлено унікальний локус довжиною 514 п.н., у зразка UKR001:00040 ідентифіковано унікальний локус довжиною 524 п.н.

Виявлені в результаті ISSR аналізу мономорфні фрагменти (амплікони) є консервативними ділянками ДНК, які свідчать про єдність походження досліджуваних видів вигни. Унікальні локуси свідчать про генетичну дивергенцію цих видів і про значний поліморфізм геному вигни на міжвидовому рівні. Ідентифіковані унікальні і мономорфні локуси можуть розглядатись як родо- і видоспецифічні маркери, а також маркери певних генотипів. Це дозволяє використовувати їх для генотипування, паспортизації сортів, вивчення філогенетичних відносин в межах роду *Vigna*. Дані локуси можуть бути секвеновані і задіяні для розробки більш специфічних SCAR-маркерів, що з успіхом було продемонстровано для інших культур [8, 11, 12], а також для деяких видів вигни, представлених різними еколого-географічними групами [2].

ISSR-аналіз мінливості колекційних зразків вигни показав різний рівень поліморфізму ДНК залежно від особливостей генотипу, який в середньому становив 62,9 %. Результати аналізу представлені в табл. 4. Найбільшою поліморфністю в досліджуваній колекції характеризувались зразки UD1000053 і UD1000016, в генотипі яких ідентифіковано, відповідно, 136 і 130 локусів із 145 можливих. При цьому рівень поліморфізму даних зразків становив, відповідно, 93,8 та 89,7 %. Мінімальний поліморфізм ДНК за результатами ISSR-аналізу, який становив 32,7 %, відмічено у популяції UKR001:00037. При ампліфікації ДНК даного зразка з різними ISSR-праймерами виявлено 59 локусів із 145. Рівень поліморфізму інших зразків вигни становив 40,7 – 86,2 %, при цьому кількість ідентифікованих фрагментів дорівнювала 59 – 125 на генотип [1, 7, 13].

Визначений рівень популяційного поліморфізму ДНК може бути підтвердженням значної мінливості у відповідних зразків вигни, а також демонструє ступінь їх генетичної дивергенції, яка є наслідком як природних еволюційних процесів, що відбуваються в популяціях вигни, так і дії селективного добору.

В літературних даних при використанні 24 ISSR праймерів для аналізу різноманітності, генотипування та оцінки видових взаємин у азіатських форм вигн з Індійського субконтиненту ідентифікували 396 фрагментів, у середньому по 16,5 продуктів на праймер. Було встановлено, що дикі форми *V. mungo* та *V. radiata* згруповані ближче до своїх культивгенів. Між аналізованими видами було виявлено помірний потік генів та генетична диференціація. Аналіз молекулярної дисперсії, проведений для групи (mungo–radiata) в трьох різних комбінаціях, показав, що майже половина варіації існує всередині популяцій, тоді як половина, що залишилася, рівномірно розподілена між видами і між популяціями всередині видів.

Було досліджено можливість використання поліморфізмів ДНК з проміжними повтореннями послідовностей (ISSR) для розрізнення таксонів у межах роду *Vigna*. Десять праймерів, більшість яких містять повтор aGA або CA, генерували продукти ампліфікації, які відрізнялися для досліджених таксонів. Поліморфізм ISSR, що про-

дукується 15 праймерами, був дуже ефективний для розрізнення таксонів на рівні видів або нижче. У *Vigna unguiculata* проаналізованих приєднань сформували згуртовану групу. Ми пов'язуємо цю втрату лише із швидкістю еволюції вивчених послідовностей.

Таблиця 4 – Поліморфізм ДНК колекційних зразків вигни, встановлений за результатами ISSR аналізу

Генотип	ISSR		
	кількість виявлених ампліконів		рівень поліморфізму, %
	сумарна у всіх видів, шт.	у певного зразка, шт	
Місцевий 4	145	75	51,7
Mungbohne	145	84	57,9
UKR001:00037	145	54	37,2
UKR001:00039	145	69	47,6
UD1000033	145	74	51,0
UD1000019	145	59	40,7
UD1000021	145	68	46,9
Шянь-ли	145	96	66,2
UD1000007	145	125	86,2
Akatsukida vagon	145	116	80,0
Rotobuku Adsuki	145	98	67,6
UD1000052	145	74	51,0
UD1000053	145	136	93,8
UD1000076	145	98	67,6
UD1000016	145	130	89,7
UKR001:00040	145	104	71,7
Людміла	145	67	46,2
Гібрид 7	145	89	61,4
Удавчик	145	124	85,5
Соя овочева	145	84	57,9
<b>Середнє:</b>			<b>62,9</b>

**Висновки.** За результатами оцінки поліморфізму ДНК вигни з використанням молекулярно-генетичних маркерів встановлено, що залучені в дослідження види вигни характеризуються високим рівнем поліморфізму ДНК, який в середньому становив 78,6 %. Ідентифіковано 145 локусів, серед яких 31 унікальний, притаманних певному зразку, і 31 мономорфний, характерних для всіх зразків. Мономорфні локуси є консервативними ділянками ДНК, які свідчать про спільне походження залучених в роботу видів вигни, і можуть бути використані як родо- і видоспецифічні маркери. Унікальні локуси свідчать про генетичну дивергенцію досліджуваного матеріалу і можуть слугувати маркерами певних зразків. Встановлено середній рівень внутрішньопопуляційного поліморфізму ДНК вигни (37,2–93,8 %, залежно від генотипу), що свідчить про існування значної мінливості у досліджуваних зразків вигни. Він показує високий рівень генетичної дивергенції видів вигни і свідчить на користь поліфілетичної теорії їх походження.

#### Література

1. Abbas, G., et al. Genetic confirmation of mungbean (*Vigna radiata*) and mashbean (*Vigna mungo*) interspecific recombinants using molecular markers. // *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6, P. 1107.

2. Anderson J.A., Churchill G.A., Autrique J.E., Tanksley S.D. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. // *Genome*. 1993. Vol. 36, P. 181–186. doi:10.1139/g93-024.
3. Aqsa Tabasum, Amjad Hameed & Muhammad Jawad Asghar. Exploring the Genetic Divergence in Mungbean (*Vigna radiata* L.) Germplasm Using Multiple Molecular Marker Systems. // *Molecular Biotechnology*. 2020. Vol. 62, P. 547–556.
4. Fang JG, Chao CCT, Roberts PA, Ehlers JD Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. // *Genet Resour Crop Evol*. 2007. Vol. 54. P. 1197–1209.
5. Gupta S. K., Bansal R. & T. Gopalakrishna Development of intron length polymorphism markers in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and their transferability to other *Vigna species* // *Molecular Breeding*. 2012. Vol. 30, P. 1363–1370.
6. Gupta S.K., Gopalakrishna T. (2010) Development of unigene-derived SSR markers in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their transferability to other *Vigna species*.// *Genome*. 2010. Vol. 53., P. 508–523. doi:10.1139/G10-028.
7. Harsukh Popatbhai Gajera, Rinkal Kishorbhai Domadiya, Sunil Vrajlal Patel & Baljibhai Arjanbhai Golakiya. Appraisal of RAPD and ISSR markers for genetic diversity analysis among cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes. // *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2014. Vol. 17, P. 79–88.
8. Hepper D.R., Wanfulmi S., Shailendra G&S, Rama R. Analysis of genetic variation using ISSR and the development of SCAR marker in synthetic autotetraploids of *Vigna mungo* (L.) // *Vegetos*. 2019. Vol. 32, P. 48–57.
9. Naima Ghalmi, Marie Malice, Jean-Marie Jacquemin, Sidi-Mohamed Ounane, Leila Mekliche & Jean-Pierre Baudoin. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. // *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2010. Vol. 57, P. 371–386.
10. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol. 76, Iss. 10. P. 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
11. Pei Xu, Xiaohua Wu, Baogen Wang, Yonghua Liu, Dehui Qin, Jeffery D. Development and polymorphism of *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* microsatellite markers used for phylogenetic analysis in asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis* (L.) Verdc. // *Molecular Breeding*. 2010., Vol. 25, P. 675–684.
12. Ruchi Vir, Tabassum Jehan, K. V. Bhat & S. Lakhanpaul. Genetic characterization and species relationships among selected Asiatic *Vigna Savi*. // *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2010. Vol. 57, P. 1091–1107.
13. Shu Y., Li Y., Zhu Y., Zhu Z., Lv D., Bai X., Cai H., Ji W., Guo D Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean. // *Theor Appl Genet*. 2010. Vol. 121., P. 1–8. doi:10.1007/s00122-010-1285-x.

#### Bibliography (transliterated)

1. Abbas, G., et al. Genetic confirmation of mungbean (*Vigna radiata*) and mashbean (*Vigna mungo*) interspecific recombinants using molecular markers. // *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6, P. 1107.
2. Anderson J.A., Churchill G.A., Autrique J.E., Tanksley S.D. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. // *Genome*. 1993. Vol. 36, P. 181–186. doi:10.1139/g93-024.
3. Aqsa Tabasum, Amjad Hameed & Muhammad Jawad Asghar. Exploring the Genetic Divergence in Mungbean (*Vigna radiata* L.) Germplasm Using Multiple Molecular Marker Systems. // *Molecular Biotechnology*. 2020. Vol. 62, P. 547–556.

4. Fang JG, Chao CCT, Roberts PA, Ehlers JD Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. // Genet Resour Crop Evol. 2007. Vol. 54. P. 1197–1209.
5. Gupta S. K., Bansal R. & T. Gopalakrishna Development of intron length polymorphism markers in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and their transferability to other *Vigna species* // Molecular Breeding. 2012. Vol. 30, P. 1363–1370.
6. Gupta S.K., Gopalakrishna T. (2010) Development of unigene-derived SSR markers in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their transferability to other *Vigna species*.// Genome. 2010. Vol. 53., P. 508–523. doi:10.1139/G10-028.
7. Harsukh Popatbhai Gajera, Rinkal Kishorbhai Domadiya, Sunil Vrajlal Patel & Baljibhai Arjanbhai Golakiya. Appraisal of RAPD and ISSR markers for genetic diversity analysis among cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes. // Journal of Crop Science and Biotechnology. 2014. Vol. 17, P. 79–88.
8. Hepper D. R., Wanfulmi S., Shailendra G&S, Rama R. Analysis of genetic variation using ISSR and the development of SCAR marker in synthetic autotetraploids of *Vigna mungo* (L.) // Vegetos. 2019. Vol. 32, P. 48–57.
9. Naima Ghalmi, Marie Malice, Jean-Marie Jacquemin, Sidi-Mohamed Ounane, Leila Mekliche & Jean-Pierre Baudoin. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. // Genetic Resources and Crop Evolution. 2010. Vol. 57, P. 371–386.
10. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76, Iss. 10. P. 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269.
11. Pei Xu, Xiaohua Wu, Baogen Wang, Yonghua Liu, Dehui Qin, Jeffery D. Development and polymorphism of *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* microsatellite markers used for phylogenetic analysis in asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis* (L.) Verdc. // Molecular Breeding. 2010., Vol. 25, P. 675–684.
12. Ruchi Vir, Tabassum Jehan, K. V. Bhat & S. Lakhanpaul. Genetic characterization and species relationships among selected Asiatic *Vigna Savi*. // Genetic Resources and Crop Evolution. 2010. Vol. 57, P. 1091–1107.
13. Shu Y., Li Y., Zhu Y., Zhu Z., Lv D., Bai X., Cai H., Ji W., Guo D Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean. // Theor Appl Genet. 2010. Vol. 121., P. 1–8. doi:10.1007/s00122-010-1285-x.

УДК 577.21:631.575.22:635.654

<sup>1</sup>Головань Л.В., к. г.-г. н., доцент, <sup>1</sup>Чуприна Ю.Ю., <sup>2</sup>Близнюк О.М., д.техн.н, професор,  
<sup>2</sup>Масалітіна Н.Ю., к.техн.н, доцент, <sup>2</sup>Белінська А.П., к.техн.н., доцент,  
<sup>2</sup>Белих І.А., к.б.н, доцент

### ОЦІНКА ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ РОДУ *VIGNA SAVI* З ВИКОРИСТАННЯМ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ – ISSR МАРКЕРІВ

Світові генетичні ресурси рослин є основним джерелом покращення сільськогосподарських культур на найближчі десятиліття. Генофонд рослин має прихований ресурс нових генів, або їх поєднань, у тому числі – селекційно-важливих ознак. Вивчення потенціалу рослинного генофонду з основним біологічним та господарським ознакам дозволяє розширити генетичну базу культур для успішної реалізації селекційних програм різного напрямку. Рід Вигна (*Vigna*) нараховує близько 200 видів, які вирощуються в теплих регіонах планети. Центри походження видів знаходяться в Африці, але маш,



урд, адзуки та рисова квасоля мають азіатське походження. Колекція нараховує 20 зразків, які належать до 7 видів роду *Vigna*: *V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal (вигна аконитолиста, мотт) – 3 зразки, *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (адзуки) – 4, *V. radiata* (L.) R. Wilczek (маш) – 4, *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi (вигна рисова) – 4, *V. unguiculata* (L.) Walp. (китайська) – 5. В основному, це – місцеві сорти, біля 10 % – селекційні сорти та 1% складають форми, які ростуть в природі.

Багатогранне використання культивованих видів роду *Vigna* сприяло їх поширенню по всій території тропічних, субтропічних та помірних зон земної кулі. Вони є економічно важливими культурами у багатьох країнах, що розвиваються. Аналіз географічного показав, що більшість зразків надійшли від ареалів світового землеробства та формотворення культур. Більшість зразків *V. radiata*, *V. mungo*, *V. aconitifolia*, *V. trilobata*, *V. umbellata* отримано з Індії та Пакистану, *V. angularis* – зі Східної Азії та Китаю, *V. unguiculata* – східної Африки (Ефіопія, Кенія), *V. unguiculata* – з Китаю. Однак конкретне місце одомашнення цієї культури точно не було встановлено, і в численних джерелах літератури можна зустріти різні думки вчених з питань походження вигни та центрів її різноманітності. Останнім часом, використовуючи методи молекулярної генетики (RAPD, AFLP та інших) було підтверджено, що північна частина Африки є центром походження окультуреної, оскільки, дикі типи Західної Африки більш близькі до культурних форм, ніж дикі типи Східної та Південної Африки. Варто відмітити, що види вигни мають значний внутрішньовидовий поліморфізм. У зразків відмічена сильна мінливість морфологічних та господарсько-цінних ознак. Такий широкий розмах варіативної мінливості обумовлений місцями культивування зразків, різними екологічними умовами (рівнини, гори, клімат).

За результатами оцінки поліморфізму ДНК вигни з використанням молекулярно-генетичних маркерів встановлено, що залучені в дослідження види вигни характеризуються високим рівнем поліморфізму ДНК, який в середньому становив 78,6 %. Ідентифіковано 145 локусів, серед яких 31 унікальний, притаманних певному зразку, і 31 мноморфний, характерних для всіх зразків. Мономорфні локуси є консервативними ділянками ДНК, які свідчать про спільне походження залучених в роботу видів вигни, і можуть бути використані як родо- і видоспецифічні маркери. Унікальні локуси свідчать про генетичну дивергенцію досліджуваного матеріалу і можуть слугувати маркерами певних зразків. Встановлено середній рівень внутрішньопопуляційного поліморфізму ДНК вигни (37,2–93,8 %, залежно від генотипу), що свідчить про існування значної мінливості у досліджуваних зразків вигни. Він показує високий рівень генетичної дивергенції видів вигни і свідчить на користь поліфілетичної теорії їх походження.

**Ключові слова:** вигна, генофонд, амплікони, поліморфізм, маркери, ДНК, ISSR, локус, походження, еволюція

Головань Л.В., к.сільск.-хоз. н., доцент, Чуприна Ю.Ю., Близнюк О.Н., д.техн.н, професор, Масалитина Н.Ю., к.техн.н, доцент, Белинская А.П., к.техн.н, доцент, Белых И.А., к.біол.н., доцент

### ОЦЕНКА ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РОДА *VIGNA SAVI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ – ISSR МАРКЕРОВ

Мировые генетические ресурсы растений являются основным источником улучшения сельскохозяйственных культур в ближайшие десятилетия. Генофонд растений имеет скрытый ресурс новых генов или их сочетаний, в том числе – селекционно важных признаков. Изучение потенциала растительного генофонда по основным биологическим и хозяйственным признакам позволяет расширить генетическую базу куль-

тур для успешной реализации селекционных программ разного направления. Род Вигна (*Vigna*) насчитывает около 200 видов, выращиваемых в тёплых регионах планеты. Центры происхождения видов находятся в Африке, но маш, урд, адзуки и рисовая фасоль имеют азиатское происхождение. Коллекция насчитывает 20 образцов, относящихся к 7 видам рода *Vigna*: *V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal (изгнание аконитолиста, мотт) – 3 образца, *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (адзуки) – 4, *V. radiata* (L.) R. Wilczek (маш) – 4; *V. unguiculata* (L.) Walp. (китайская) – 5. В основном, это – местные сорта, около 10 % – селекционные сорта и 1% составляют формы, растущие в природе.

Многогранное использование культивируемых видов рода *Vigna* способствовало их распространению по всей территории тропических, субтропических и умеренных зон земного шара. Они являются экономически важными культурами во многих развивающихся странах. Географический анализ показал, что большинство образцов поступило от ареалов мирового земледелия и формообразования культур. Большинство образцов *V. radiata*, *V. mungo*, *V. aconitifolia*, *V. trilobata*, *V. umbellata* получено из Индии и Пакистана, *V. angularis* – из Восточной Азии и Китая, *V. unguiculata* – восточной Африки (Эфиопия, Кения), *V. unguiculata* – из Китая. Однако конкретное место одомашнивания этой культуры точно не было установлено, и в многочисленных источниках литературы можно встретить разные мнения учёных по происхождению вигны и центров ее разнообразия. В последнее время, используя методы молекулярной генетики (RAPD, AFLP и др.) было подтверждено, что северная часть Африки является центром происхождения окультуренной вигны, поскольку дикие типы Западной Африки более близки к культурным формам, чем дикие типы Восточной и Южной Африки. Следует отметить, что виды вигны имеют значительный внутривидовой полиморфизм. У образцов отмечена сильная изменчивость морфологических и хозяйственно-ценных признаков. Такой широкий размах вариативной изменчивости обусловлен местами культивирования образцов, разными экологическими условиями (равнины, горы, климат).

По результатам оценки полиморфизма ДНК вигны с использованием молекулярно-генетических маркеров установлено, что вовлечённые в исследования виды вигны характеризуются высоким уровнем полиморфизма ДНК, который в среднем составлял 78,6%. Идентифицировано 145 локусов, среди которых 31 уникален, присущ определённому образцу, и 31 мономорфный, характерных для всех образцов. Мономорфные локусы являются консервативными участками ДНК, свидетельствующими о совместном происхождении вовлеченных в работу видов вигны, и могут быть использованы как родо- и видоспецифические маркеры. Уникальные локусы свидетельствуют о генетической дивергенции изучаемого материала и могут служить маркерами определённых образцов. Установлен средний уровень внутривидового полиморфизма ДНК вигны (37,2–93,8 %, в зависимости от генотипа), что свидетельствует о существовании значительной изменчивости изучаемых образцов вигны. Он показывает высокий уровень генетической дивергенции видов вигны и свидетельствует в пользу полифилетической теории их происхождения.

**Ключевые слова:** изгнание, генофонд, ампликоны, полиморфизм, маркеры, ДНК, ISSR, локус, происхождение, эволюция

Golovan L.V., Chuprina Yu.Yu., Bliznjuk O.N., Masalitina N.Yu., Belinska A.P.,  
Bielykh I.A.

#### ASSESSMENT OF ECOLOGICAL AND GENETIC DIVERSITY OF THE GENUS *VIGNA SAVI* USING BIOTECHNOLOGICAL METHODS - ISSR MARKERS

The world's genetic resources of plants are the main source of improving crops for decades to come. The gene pool of plants has a hidden resource of new genes, or their combi-

nations, including - selection-important features. The study of the potential of the plant gene pool with the main biological and economic characteristics allows to expand the genetic base of crops for the successful implementation of breeding programs in various areas. The genus *Vigna* has about 200 species that are grown in warm regions of the planet. The centers of origin of the species are in Africa, but mung beans, urd, azuki and rice beans are of Asian origin. The collection includes 20 specimens belonging to 7 species of the genus *Vigna*: *V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal (willow aconitolista, mott) – 3 specimens, *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (adzuki) – 4, *V. radiata* (L.) R. Wilczek (mash) – 4, *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi (vigna rice) – 4, *V. unguiculata* (L.) Walp. (Chinese) – 5. These are mainly local varieties, about 10 % are breeding varieties and 1% are forms that grow in nature.

The multifaceted use of cultivated species of the genus *Vigna* contributed to their spread throughout the tropical, subtropical and temperate zones of the globe. They are economically important crops in many developing countries. Geographical analysis showed that most of the samples came from the areas of world agriculture and crop formation. most samples of *V. radiata*, *V. mungo*, *V. aconitifolia*, *V. trilobata*, *V. umbellata* were obtained from India and Pakistan, *V. angularis* – from East Asia and China, *V. unguiculata* – East Africa (Ethiopia, Kenya), *V. unguiculata* – from China. However, the exact place of domestication of this culture has not been established, and in numerous sources of literature can be found different opinions of scientists on the origin of cowpea and the centers of its diversity. Recently, using the methods of molecular genetics (RAPD, AFLP and others) it was confirmed that the northern part of Africa is the center of origin of the cultured, because the wild types of West Africa are closer to cultural forms than the wild types of East and South Africa. It should be noted that the species of cowpea have a significant intraspecific polymorphism. The samples showed strong variability of morphological and economically valuable features. Such a wide range of variable variability is due to the places of cultivation of samples, different environmental conditions (plains, mountains, climate).

According to the results of the evaluation of the DNA polymorphism of cowpea using molecular genetic markers, it was found that the species of cowpea involved in the study are characterized by a high level of DNA polymorphism, which averaged 78.6 %. 145 loci were identified, including 31 unique, specific to a particular sample, and 31 monomorphic, characteristic of all samples. Monomorphic loci are conserved regions of DNA that indicate the common origin of the species of cowpea involved in the work, and can be used as genus and species-specific markers. Unique loci indicate genetic divergence of the studied material and can serve as markers of certain samples. The average level of intrapopulation polymorphism of cowpea DNA (37.2–93.8 %, depending on the genotype) was established, which indicates the existence of significant variability in the studied samples of cowpea. It shows a high level of genetic divergence of cowpea species and testifies in favor of the polyphyletic theory of their origin.

**Keywords:** pasture, gene pool, amplicons, polymorphism, markers, DNA, ISSR, locus, origin, evolution