

**АНАЛІЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ
СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ З ОЗНАКАМИ
АВТОФЕРТИЛЬНОСТІ ТА АВТОСТЕРИЛЬНОСТІ**

БАБ'ЯЖ А.І., науковий співробітник,

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

ШАЮК Л.В., кандидат біологічних наук,

Український інститут експертизи сортів рослин

Наведено результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму автофертильних та автостерильних форм цукрових буряків. Проаналізовано 149 RAPD-локусів в автофертильних та автостерильних ліній, з яких поліморфними виявились 54%. Встановлено відсутність внутрілінійного поліморфізму серед автофертильних ліній, що може слугувати критерієм наявності цієї ознаки.

Ключеві слова: цукрові буряки, автофертильні форми, поліморфізм, RAPD-локуси

Автостерильність є характерною властивістю виду *Beta vulgaris L.*, яка генетично зумовлена і запобігає самозапиленню. Автофертильність і автостерильність для цукрових буряків є протилежними станами одного процесу – розмноження форм у межах одного виду [1].

Під автофертильністю цукрових буряків розуміють самозапилення, яке відбувається між квітками однієї й тієї самої рослини, або в межах однієї квітки.

Генетику ознаки автофертильності дослідив Ф. Оуен у 60-х роках минулого сторіччя. Фенотипово це виявляється у високому ступені зав'язування насіння при самозапиленні у ряді поколінь, що не відрізняється від такого самого показника при вільному запиленні рослин. Рівень автофертильності у таких рослин настільки високий, що навіть при надмірній

кількості чужого пилку частка перехресного запилення є невисокою [2]. Автофертильність у буряків контролюється геном S^f [1].

Використання ДНК-маркерів дозволяє з високою точністю та у скорочені терміни провести оцінку та добір генотипів, що поєднують певні якості. Аналіз літературних джерел свідчить про відносно малу кількість статей, присвячених питанню молекулярно-генетичного поліморфізму цукрових буряків, порівняно з іншими сільськогосподарськими культурами, такими як пшениця, ячмінь, кукурудза [4].

Метою наших досліджень було вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму ліній цукрових буряків з ознаками автофертильності та автостерильності.

Матеріали та методика дослідження. Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму селекційних матеріалів цукрових буряків відібрали по 30 рослин попередньо визначених трьох автофертильних ліній сьомого й сімнадцятого інцухту та трьох автостерильних ліній О-типу.

ДНК виділяли з пазушних бруньок відібраних матеріалів, індивідуально з кожної рослини за методикою з використанням катіонного детергенту ЦТАБ. Концентрацію ДНК визначали в 0,8 %-ному агарозному гелі відповідно до стандартних розчинів.

Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму використовували модифікацію полімеразної ланцюгової реакції таку як RAPD-метод. Реакцію ампліфікації здійснювали за таких умов: денатурація – 3 хв при температурі 94° С та 33 цикли, з трьома температурними режимами: 1 хв – денатурація при температурі 93° С, 2 хв – відпал при оптимальній температурі для кожного праймера у межах 47 – 55° С та 2 хв елонгація при температурі 72° С [3].

Основні структурні характеристики і оптимальна температура відпалу праймерів наведені у табл. 1.

1. Характеристика використаних RAPD-праймерів

№ з/п	Праймер	Нуклеотидна послідовність 5' 3'	Кількість нуклеотидів, шт.	CG- склад, %	Температура відпалу, °C
1	P815	ggC ATC ggC C	10	80	55
2	P816	CCC AAg ATC C	10	60	50
3	P817	CCA Cgg gAA g	10	70	50
4	P818	TCA gAg CgC C	10	70	50
5	P819	gTC TCg TCg g	10	70	50
6	P820	gTg TAg ggC g	10	70	50
7	P821	ggC CTT CAg g	10	70	55
8	P822	gCT CTC ACC g	10	70	55
9	P823	CATCCTACTTTCTTCGTT	18	39	50
10	P824	CAA CAT TCC AAg TAA TCA ACA T	22	32	50

Після закінчення ПЛР проводили електрофоретичне розділення продуктів у 2 %-ному агарозному гелі з додаванням броміду етидію в 1^x ТБЕ при постійній напрузі 2-6 В/см гелю протягом трьох годин [3].

На основі отриманих електрофоретичних спектрів побудовано матрицю, в якій присутність/відсутність алеля у кожного окремого локусу відображалась як 1/0. За матрицею обраховували відсоток поліморфних локусів та індекс поліморфності локусу.

Результати досліджень та їх обговорення. Молекулярно-генетичний поліморфізм автофертильних та автостерильних ліній цукрових буряків дослідили з використанням 10 RAPD-праймерів. У результаті отримано 149 локусів, 76 з яких виявились поліморфними. Рівень поліморфізму становив 54 %. Масові дослідження займають багато часу і є затратними, тому доцільно звернути увагу на аналіз з конкретними праймерами, які виявляють високий рівень поліморфізму. Так, найвищий рівень поліморфізму 71 % отримали з використанням праймерів P 822 та P 824, які визначили 10 поліморфних локусів з 14. З праймерами, що виявляють низький рівень поліморфізму проводити аналізи недоцільно. Найнижчим цей показник був для P 819 – 35 %. Хоча з його використанням було досліджено 20 локусів, однак поліморфними виявились

лише 7. Індекс поліморфності локусу для дослідженої вибірки праймерів коливався у межах від 0,25 до 0,31 (табл. 2).

2. Поліморфізм RAPD-локусів виявлених у автофертильних та автостерильних ліній цукрових буряків

№ з/п	Праймер	Всього локусів	З них поліморфних	% поліморфізму	Індекс поліморфності локусу
1	P 815	17	8	47	0,3
2	P 816	14	7	50	0,31
3	P 817	15	8	53	0,3
4	P 818	14	9	64	0,3
5	P 819	20	7	35	0,25
6	P 820	12	5	42	0,3
7	P 821	16	10	62	0,3
8	P 822	14	10	71	0,3
9	P 823	13	6	46	0,31
10	P 824	14	10	71	0,3
		149	76	54*	0,3*

*- Середнє значення.

Більшість з використаних праймерів дозволяють виявляти поліморфізм від 50% до 71%. Слід відзначити, що такий високий для лінійного матеріалу рівень поліморфізму і як наслідок така велика частка поліморфних локусів отримана, в основному, за рахунок автостерильних О-типів.

Як видно на рисунку, поліморфізм між автофертильними формами незначний і його зовсім не спостерігали всередині ліній № 1 I₇, (перший та другий зразки) та № 3 I₁₇ (п'ятий, шостий та сьомий зразки). Однак для рослин лінії № 2 I₇ (третій та четвертий зразки на рисунку) з допомогою праймера P 816 виявлено поліморфні фрагменти. Серед двох зразків показаних на рисунку третій зразок є типовим для цієї лінії, а четвертий – ні. Відповідно електрофоретичним спектрам ампліконів, отриманих з допомогою інших

праймерів, внутрілінійного поліморфізму для автофертильних ліній не виявлено.

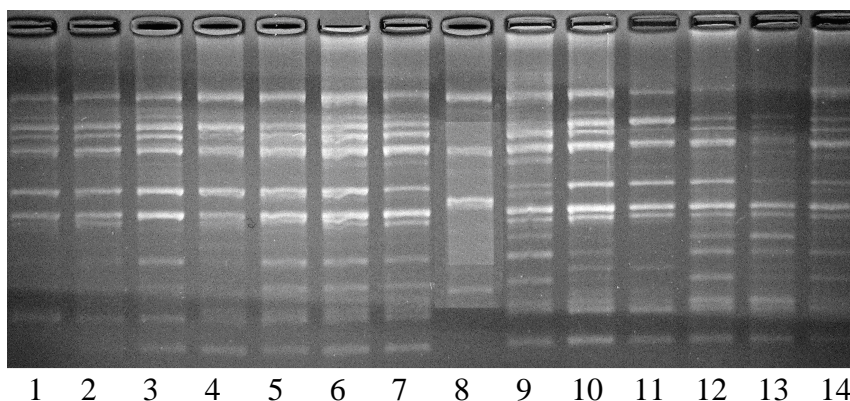


Рис. Електрофоретичний спектр ампліконів, отриманих за допомогою праймера Р 816 для автофертильних та автостерильних форм цукрових буряків.

1-7 – автофертильні форми (1, 2 - № 1 I₇, 3, 4; - № 2 I₇, 5, 6, 7 - № 3 I₁₇), 8 – маркер молекулярної маси, 9-14 – автостерильні О-типи (9 – №1; 10, 11 - №2; 12, 13, 14 - №3)

Враховуючи отримані результати, специфіку ознаки автофертильності та рівень інцуктованості дослідженого лінійного матеріалу можна припустити, що наявність внутрілінійного поліморфізму автофертильної лінії є наслідком механічного внесення до вибірки генотипу іншої лінії.

Отже, відсутність внутрілінійного поліморфізму у автофертильних ліній може слугувати критерієм наявності ознаки автофертильності і навпаки високий рівень внутрілінійного поліморфізму у автостерильних ліній О-типу – свідчить про відсутність ознаки автофертильності. Для масових аналізів селекційних матеріалів доцільно використовувати лише праймери, що дозволяють виявити найвищий рівень поліморфізму.

Висновки. За результатами дослідження 149 RAPD-локусів у автофертильних та автостерильних ліній цукрових буряків, поліморфними виявились 76, що становить 54%. Більшість поліморфних локусів ідентифіковано для автостерильних О типів, при цьому поліморфізм виявлено як між різними лініями, так і всередині ліній. Для автофертильних ліній

характерний вийняtkово міжлінійний поліморфізм, що може слугувати критерієм наявності ознаки автофертильності. Для дослідження селекційних матеріалів достатньо використовувати лише праймери Р 822 та Р 824, що дозволяють виявляти найбільшу частку поліморфних локусів – 71 %. Внутрілінійний поліморфізм у автофертильних форм за допомогою праймера Р 816 було виявлено для однієї рослини. Враховуючи те, що використані у дослідженнях автофертильні лінії мали високий ступінь гомозиготності, виявлений поліморфний генотип можна розцінювати як забруднення.

Аналізуючи одержані результати можна стверджувати про можливість визначення автофертильних/автостерильних матеріалів за наявністю/відсутністю внутрілінійного поліморфізму.

Список літератури

1. Балков І.Я. Проблеми одержання та використання самофертильних ліній цукрових буряків. / І.Я. Балков, М.О. Корнеєва / Збірник наукових праць. – К.: Аграрна думка. – 1997.
2. Роїк М.В. Генетичний контроль і фенотипові прояви ознаки самосумісності – самонесумісності у цукрових буряків. / М.В. Роїк, М.О. Корнеєва / Збірник наукових праць. – К.: ІЦБ УААН. – 2003, Випуск 5. С. 18-27.
3. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Beta L.* з допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Методичні рекомендації / [М.В. Роїк, Ю.М. Сиволап, Г.П. Петюх, та ін.] – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2007. – 27 с.
4. Сиволап Ю.М. Геном рослин і «Молекулярна селекція» / Ю.М. Сиволап / Селекція і насінництво. – 2008. Вип. 96.– С. 34 – 42.

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА
СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С
ПРИЗНАКАМИ АВТОФЕРТИЛЬНОСТИ И АВТОСТЕРИЛЬНОСТИ**

БАБЬЯЖ А. И., ШАЮК Л. В.

Представлены исследования молекулярно-генетического полиморфизма автофертильных и автостерильных форм сахарной свеклы. Проанализировано 149 RAPD-локусов в автофертильных и автостерильных линиях, из них полиморфными оказались 54%. Установлено отсутствие внутрелинейного полиморфизма автофертильных линий, что может быть критерием присутствия данного признака.

Ключевые слова: сахарная свекла, автофертильные формы, полиморфизм, RAPD-локусы

**ANALYSIS OF MOLECULAR GENETIC POLYMORPHISM OF SUGAR
BEET BREEDING MATERIAL WITH SIGNS OF SELF-FERTILITY AND
SELF-STERILITY**

BABYAZH A., SHAYUK L.

The article describes the study of molecular and genetic polymorphism of self-fertile and self-sterile forms of sugar beet. 149 RAPD-locus in self-fertile and self-sterile lines were analyzed, and 54% of them were polymorphic. The absence of interlinear of polymorphism self-fertile lines that may be a criterion for the presence of this trait was found.

Key words: sugar beet, self-fertility forms, polymorphism, RAPD-locus.