

УДК 632.38:633/625
© 2010

Л.В. Шаюк

*Інститут цукрових
буряків УААН*

** Науковий керівник —
академік УААН
Ю.М. Сиволап*

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ЛОКУСАМИ У ЛІНІЙ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ*

Досліджено рівень алейного поліморфізму за мікросателітними локусами у чоловічостерильних ліній та запилювачів цукрових буряків.

Створення великої кількості сортів рослин сільськогосподарських культур призводить до ряду проблем. Насамперед, це потреба розробки надійних методів оцінки генетичного різноманіття селекційних матеріалів та захисту авторських прав. У світовій практиці для розв'язання цього завдання залучають методи молекулярного маркування, особливо метод ідентифікації поліморфізму на рівні мікросателітної ДНК. Мікросателіти (МС) — ділянки ДНК, що складаються з tandemно організованих коротких (2—20 пн) послідовностей [3]. Більшість ідентифікованих МС-локусів є варіабельними за довжиною, що зумовлено різною кількістю tandemних послідовностей. Аналіз довжини мікросателітів, як правило, допомагає виявити значну кількість алейних варіантів, а їхнє поширення по всьому геному дає змогу охопити значну його частину. Крім того, варіабельні за довжиною мікросателіти успадковуються за кодомінантним типом, що дає можливість виявляти гетерозиготи. Отже, МС-локуси є зручним інструментом у виявленні молекулярно-генетичного поліморфізму.

В останні роки проведено низку досліджень з пошуку варіабельних за довжиною МС-послідовностей у геномі цукрових буряків і розроблено маркери, що дозволяють дослідити їхній алейний стан [2, 4].

Мета роботи — дослідження алейного стану МС-локусів у ліній цукрових буряків вітчизняної селекції.

Матеріали та методи. До рослинної вибірки входили 8 чоловічостерильних ліній (ЧС-лінії) цукрових буряків (190, 191, 192, 193, 194, 198, 202, 13.9) та 6 запилювачів (247, 314, 364, 393, 395, 402). ДНК виділяли з 3-денних проростків з використанням СТАБ. Вибірка в межах кожної лінії складалась з 35 рослин.

Алейний поліморфізм у ліній цукрових буряків дослідили за 5-ма мікросателітними локусами (МС-локусами): GZM 017, GZM 058, GZM 086, Bvm 3 та Bvm 4. Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) містила компоненти у такій концентрації: 1× буфер для Taq-полімерази, 2 мМ MgCl₂,

150 мкМ суміші дезоксинуклеотид-трифосфатів, 0,5 мкМ праймеру, 1 од. Taq-полімерази та 20 нг досліджуваної ДНК. Реакцію ампліфікації проводили за таких температурних умов: початкова денатурація — 3 хв при 94°C та 33 цикли — 0,5 хв денатурація при 93°C, 0,5 хв відпал при 50—60°C та елонгація 1 хв при 72°C.

Після закінчення ПЛР суміш розділяли у 4%-му агарозному гелі в 1× ТБЕ за допомогою електрофорезу, при постійній напрузі 2—6 В/см² гелю, протягом 3,5 год. Для візуалізації отриманих фрагментів використовували бромистий етидій. Розрахунок розмірів фрагментів проводили за допомогою комп'ютерної програми Electrophoresis Visualization Studio (version 1.05).

Частоту генотипів розраховували як співвідношення генотипу і сукупної вибірки, а частоту алейя — як його співвідношення до сукупної кількості ідентифікованих алейів [1].

Результати та їх обговорення. У результаті дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму 14 ліній цукрових буряків за 5-ма МС-локусами виявлено 28 алейів, тобто, в середньому по 6 алейів на локус. Ідентифіковані алейі рівномірно представлені у цій рослинній вибірці.

Рівень гомо- та гетерозиготності, що ідентифікували у ліній цукрових буряків за МС-локусами, був неоднаковим (рис. 1). Так, для ЧС-лінії 13.9 характерний низький рівень поліморфізму, децю вищий — для ліній 190, 191, 192, 193, 202 та дуже високий — у всіх досліджених запилювачів. Специфіка створення високо-

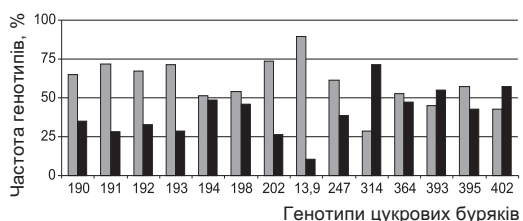


Рис. 1. Рівень гетерогенності, ідентифікований у ліній цукрових буряків за МС-локусами: □ — гомозиготи; ■ — гетерозиготи

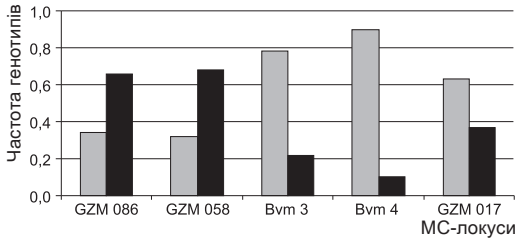


Рис. 2. Розподіл гомозиготних і гетерозиготних генотипів, ідентифікованих для МС-локусів у лінії цукрових буряків: □ — гомозиготи; ■ — гетерозиготи

адаптивних гібридів передбачає використання запилювачами не окремих ліній, а популяції синтетиків, що складаються з кількох ліній. У синтетиків рівень поліморфізму буде вищий, що й підтверджено в наших дослідженнях.

Такий високий рівень гетерозиготності для всіх досліджених ліній отриманий, в основному, за рахунок окремих локусів. Так, за локусами GZM 058 та GZM 086 з більшою частотою

виявляли гетерозиготи, тоді як за локусом GZM 017 частота гомозиготних генотипів дещо перевищувала гетерозиготні, а за локусами Bvm 3 та Bvm 4 значна частина вибірки була гомозиготною (рис. 2).

За отриманим алельним складом ліній цукрових буряків розроблено молекулярно-генетичні формули, у яких зазначали назву МС-локусу та вказували розмір ідентифікованого фрагмента у парах нуклеотидів. Однак оскільки в цілому рівень внутрішньолінійного поліморфізму у цукрових буряків досить високий, наприклад, за МС-локусами GZM 058 та GZM 086 виявляли по 4 алелі з різною частотою у межах однієї лінії, пропонується у кінцевому записі молекулярно-генетичної формули відображати лише алелі з найбільшою частотою. Таку формулу доцільно вносити в нормативні документи при реєстрації ліній цукрових буряків та в подальшому використовувати як один з елементів експертизи системи захисту авторських прав селекціонерів та моніторингу насінневого матеріалу різного походження.

Висновки

За 5-ма МС-локусами для 14 ліній цукрових буряків виявлено 28 алельних варіантів.

Установлено високий рівень їх внутрішньолінійного поліморфізму, особливо у запилювачів, що є очікуваним, враховуючи специфіку створення селекційних матеріалів, та зага-

лом для перехреснозапильної культури. Розроблено молекулярно-генетичні формули ліній цукрових буряків, які відображають назву МС-локусу та розмір алеля у парах нуклеотидів, котрий ідентифіковано з найбільшою частотою.

Бібліографія

1. Вейр Б. Анализ гценетических данных/Б. Вейр. — М.: Мир, 1995. — 400 с.
2. Dürnte J. Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.): dissertation PHD/J. Dürnte. — Universität Gatersleben, 2001. — 110 с.
3. Litt M. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat

within the cardiac muscle actin gene/M. Litt, J. Luty//Am. J. Hum. Genet. — 1989. — № 44. — P. 397—401.

4. Mürchen M. Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L./M. Mürchen, J. Cuguen, G. Michaelis, C. Hänni, P. Saumitou-Laprade//Theor Appl Genet. — 1996. — № 92. — P. 326—333.