

СЕЛЕКЦІЯ І НАСІННИЦТВО ТА БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК:631.52: 633.63:575.113

А.І. БАБ'ЯЖ, молодший науковий співробітник
Інститут біоенергетичних культур НААН України

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ОДНОРІДНОСТІ СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЛР-АНАЛІЗУ

Наведено застосування ПЛР-аналізу для визначення гомогенності інбредної лінії та гетерогенності популяції цукрових буряків на початкових етапах селекції.

Вступ. У сучасній селекції цукрових буряків застосовуються як популяційні матеріали, так і матеріали з певним рівнем інбридингу. Вибір правильного напрямку роботи з вихідним матеріалом залежить від визначення методів його створення. Загальноприйняті селекційні методи передбачають визначення цілої низки морфо-біологічних та господарсько-цінних ознак на рослинах першого та другого року життя. На вказані ознаки, зазвичай, суттєво впливають умови довкілля.

Для нівелювання такого впливу краще використовувати молекулярні маркери – білки та ДНК. Значно розширити уявлення про структурну організацію геному дозволяють саме ДНК-маркери. У зв'язку з цим нині широко використовується метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [1, 2]. Цей метод полягає у циклічному синтезі послідовностей ДНК фланкованих праймерами за допомогою термостабільної полімерази. У процесі ПЛР отримують велику кількість копій однієї послідовності ДНК (ампліфікація). Праймери – це синтетичні короткі фрагменти ДНК (олігонуклеотиди, які складаються з 9-30 нуклеотидів, що комплементарні відповідним ділянкам (сайтам приєднання праймерів) на досліджуваній ДНК [3].

Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму за допомогою ПЛР, ДНК можна виділяти з будь-якої рослинної тканини: проростків, коренів, листків, зародків, ендосперму, пилку та ін. Наприклад, при визначенні лабораторної схожості проростки можна використати для ПЛР-аналізу, що дасть змогу оцінити вихідний матеріал до початку польових робіт. Отже, застосування цього методу дозволяє скоротити матеріальні витрати та час для визначення генетичної однорідності вихідного матеріалу, за рахунок використання його на різних стадіях розвитку рослини.

Метою нашої роботи була оцінка вихідного селекційного матеріалу на однорідність та визначення можливого методу його створення.

Матеріали та методика досліджень. Для дослідів було використано автостерильна популяція цукрових буряків та інбредна лінія глибокого інцухту походженням з сорту Ялтушківський однонасінний.

Виділення ДНК проводили індивідуально, по 30 генотипів з кожної досліджуваної форми, за оптимальною для цукрових буряків методикою з використанням катіонного детергенту ЦТАБ [4].

Реакційна суміш для проведення ПЛР (RAPD-аналізу) об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 1^X буфер для Таq-полімерази; 2-4 мМ MgCl₂; 150 мкМ суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів; 0,5-1 мкМ праймера; 1 одиниця активності Таq-полімерази і 20 нг досліджуваної ДНК; деіонізована вода до 25 мкл. В кожен пробірку нашаровували по 50 мкл мінерального масла (Sigma) та осаджали в центрифугі при 700 g 10 секунд. Пробірки з сумішшю поміщали у програмований термостат «AMPLY 4» (Віокот, Росія) для проведення ПЛР. Реакцію ампліфікації проводили за таких температурних режимів: денатурація – 3 хв. при 94⁰С та 33 цикли, що включали три температурні режими: 1 хв. денатурація при 93⁰С, 2 хв. відпал при 50⁰С та елонгація 2 хв. при 72⁰С.

Основні структурні характеристики та оптимальна температура відпалу праймерів наведено у таблиці 1.

Характеристика використаних RAPD-праймерів

№ п/п	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність 5' 3'	К-ть нуклеотидів, шт.	CG-склад, %
1	P816	CCC AAg ATC C	10	60
2	P817	CCA Cgg gAA g	10	70
3	P824	CAA CAT TCC AAg TAA TCA ACA T	22	32

Після закінчення ПЛР проводили електрофоретичне розділення продуктів в 2 % агарозному гелі з додаванням броміду етидію в 1^X ТБЕ, в умовах постійної напруги 2-6 В/см² гелю протягом 2,5 години. Результати електрофоретичного розподілу продуктів ПЛР фіксували за допомогою системи документування гелів, що складається з транслюмінатора, відеосистеми з цифровою камерою та комп'ютера для аналізу отриманих зображень[4]. Результатом ПЛР є певний набір фрагментів на гелі, або профіль ДНК, на основі якого склали матрицю, в якій реєстрували наявність (1) або відсутність (0) алеля у кожному локусі. На основі отриманих матриць проводили статистичну обробку даних.

Результати досліджень. Для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму форм цукрових буряків було використано три RAPD-праймери (P817, P824, P816) з допомогою яких отримано 43 локуси. За результатами досліджень інбредної лінії виявлено 23 поліморфних локуси. Вищий рівень поліморфізму характерний для автостерильної популяції, серед генотипів якої було виявлено 40 поліморфних локуси (табл. 2), тобто популяція є більш не однорідною за лінію.

Таблиця 2

Поліморфізм RAPD-локусів виявлених у популяції та інбредної лінії цукрових буряків.

Матеріал	Праймер P817			Праймер P824			Праймер P816		
	Всього локусів	З них поліморфних	% поліморфізму	Всього локусів	З них поліморфних	% поліморфізму	Всього локусів	З них поліморфних	% поліморфізму
Інбредна лінія	15	7	43	14	8	57	14	8	57
Автостерильна популяція	15	15	100	14	14	100	14	11	73

Рівень поліморфізму генотипів інбредної лінії коливався від 43 до 57%, тоді як у популяції становив від 73 до 100% в залежності від використаного праймера. Поліморфізм локусів отриманих з використанням праймерів P817 та P824 у популяції становив 100%.

Визначення загальної кількості поліморфних локусів дало змогу провести порівняння рівня поліморфізму в середині популяції та інбредної лінії(табл.3).

Таблиця 3

Середня кількість поліморфних локусів для форм цукрових буряків.

Матеріал	Праймер P817		Праймер P824		Праймер P816	
	локуси	%	локуси	%	локуси	%
Інбредна лінія	6	39,2	5	35,7	2	16,1
Автостерильна популяція	7	46,7	8	57,1	3	23,8

Середня кількість поліморфних локусів у інбредної лінії коливалась від 2 до 6. В середині популяції цей показник становив 3-8 локусів. Середній відсоток поліморфних локусів був значно вищий у популяції (23,8-57,1%), ніж у інбредної лінії, де цей показник коливався у межах 16,1-39,2%. Дані показники підтверджують значну гетерогенність в середині популяції та гомогенність лінії.

Висновки. Проведенні дослідження підтвердили можливість визначення генетичної однорідності вихідного матеріалу за допомогою RAPD-ПЛР аналізу. Праймерами (P817, P824, P816) доведена гомогенність інбредної лінії та гетерогенність популяції, що повністю відповідає попередньо даним характеристикам досліджуваним формам цукрових буряків. Застосування ПЛР-аналізу на початкових етапах вивчення вихідних матеріалів можна рекомендувати для визначення їх однорідності.

Список використаних літературних джерел

1. MA, Z. Q., M. RÖDER, and M. E. SORRELLS, 1996. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39:123-130.
2. В.И. Глазко, И.М. Дунин, Г.В. Глазко, Л.А. Калашникова. Введение в ДНК-технологии. – М.: 2001.
3. В.И. Глазко, Е.В. Шульга, Т.Н. Думань, Г.В. Глазко. ДНК-технология и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. – Белая Церковь : 2001.
4. Роїк М. В. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду BETA L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / Роїк М.В., Сиволап Ю.М., Петюх Г.П., Шаук Л. В., Баб'яж А.І., Білоус Н.В. , 2007. – 27 с.

Аннотація. *Изложено применение ПЦР-анализа для определения гомогенности инбредной линии и гетерогенности популяции сахарной свеклы на начальных этапах селекции.*

Annotation. *The article highlights application of PCR to determine the homogeneity of the inbred lines and population heterogeneity of sugar beet in the initial stages of breeding.*

УДК 635.631.527

К.П. БЕЗНОСЮК, молодший науковий співробітник
Інститут коренеплідних культур НААН України
e-mail: ekaterinaaaa65@mail.ru

ВИХІДНІ ДЖЕРЕЛА ГОСПОДАРСЬКО-ЦІННИХ ОЗНАК ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ МОРКВИ

Наведено результати оцінки вихідних матеріалів моркви у колекційних розсадниках за 2010–2011 роки. Виділено перспективні сортозразки за врожайністю і товарністю коренеплідів, вмістом β -каротину, стійкістю до біотичних і абіотичних факторів середовища.

Вступ. Морква є однією з основних овочевих культур. Вона вважається цілшою рослиною і використовується в харчовій, фармацевтичній та парфумерній промисловості. Це зумовлено її поживними речовинами, смаковими якостями та цінним хімічним складом коренеплідів, який не є постійним і змінюється залежно від спадкових властивостей виду, сорту та умов вирощування [2]. Нажаль за останні роки структура посівних площ моркви зменшилась майже на 20%. У першу чергу це обумовлено низькою врожайністю, яка не задовольняє потреби споживача. Причина цієї проблеми у кліматичних змінах зовнішнього середовища, які спостерігаються за останніх декілька років у Подільсько-Придніпровського краю Лісостепової зони. Особливо ці зміни були помітні у 2010 році, коли висока температура повітря спостерігалася протягом всього періоду вегетації моркви. Враховуючи проблеми сортозразків моркви з низькою адаптацією до стресових умов навколишнього середовища актуальним і перспективним вважається питання створення вихідних джерел з комплексом корисно-продуктивних ознак, які мають високу пристосованість до стресових умов вегетації.

Матеріали та методика досліджень. Польові досліді проводились в умовах Лісостепової зони Подільсько-Придніпровського краю (м. Умань, Черкаська обл.) в Інституті коренеплідних культур НААН протягом 2010 – 2011 років згідно існуючих методик в селекції овочевих рослин [1, 2]. Моркву вирощували за загальноприйнятою технологією для Подільсько-Придніпровського краю Лісостепової зони України. Площа облікових ділянок становив