РОЗДІЛ І. ГЕНЕТИКА, ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА ПРИКЛАДНА БОТАНІКА

УДК 631.524.7:633.854.78

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЦЕССИВНЫХ ГЕНОВ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И ДНК-МАРКЕРОВ В СЕМЕНОВОДСТВЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Ведмедева К.В., Толмачев В.В., *Солоденко А.Е.

Институт масличных культур НААН

70417, Украина, Запорожская область, Запорожский район, с. Солнечное ул. Весенняя, 1

**Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения*

65036,Украина, Одесса, Овидиопольская дорога, 3

vedmedeva_k@mail.ru

Показан спектр разнообразия морфологических маркерных признаков подсолнечника. Рассмотрена проблема маркированиия генотипов подсолнечника рецессивными генами с морфологическим проявлением и микросателитов ДНК (SSR). Предложен набор морфологических маркеров и микросателитов ДНК для маркирования селекционных линий. Приводится список генов морфологических маркерних признаков подсолнечника. Обсуждается использование морфологических маркеров в практике семеноводства подсолнечника.

Ключевые слова: микросателитный локус, рецессивый ген, электрофорез.

ВИКОРИСТАННЯ РЕЦЕСИВНИХ ГЕНІВ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК І ДНК-МАРКЕРІВ У НАСІННИЦТВІ СОНЯШНИКА

Ведмедева К.В., Толмачев В.В., *Солоденко А.Е.

Інститут олійних культур НААН

70417, Україна, Запорізька область, Запорізький район, с. Сонячне, вул. Весняна, 1

**Селекційно-генетичний інститут - Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення*

65036,Україна, Одеса, Овідіопольська дорога, 3

vedmedeva_k@mail.ru

Показаний спектр різноманітності морфологічних маркерних ознак соняшника. Розглянуто проблему маркування генотипів соняшника рецесивними генами з морфологічним проявом і мікросателітів ДНК (SSR). Запропоновано набір морфологічних маркерів і мікросателітів ДНК для маркування селекційних ліній. Наводиться список генів морфологічних маркерних ознак соняшника. Обговорюється використання морфологічних маркерів у практиці насінництва соняшника.

Ключові слова: мікросателітний локус, рецесивний ген, електрофорез.

USEING RECESSIVE GENES OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND DNA MARKERS IN SUNFLOWER SEED FARMING

Vedmedeva K.V., Tolmachev V.V., *Solodenko A.E.

Institute of Oil Crops NAAS,

70417, Ukraina, Zaporozhye, Solnechnyy, st.Institutskaya, 1

**Plant Breeding and Genetics Institute - National Center of Seed and sortoizucheniya,*

65036, Ukraina, Odessa, Ovidiopolskaya doroga, 3

vedmedeva_k@mail.ru

Particular genetics of sunflower is studied worse than genetics of some other crops. Until recently genetic maps of higher plants were mostly based on morphological and biochemical sings. Now these maps are being filled up rapidly with the DNA markers with the help of new molecular methods such as analysis of the

products of PSR (polymerase sequence repeat) and SSR (simple sequence repeats) that helps to get stable codominant markers as long as any part of the plant including seed is being used.
The aim of our research was to find recessive genes of morphological sings and DNA markers of sunflower that were effective for purity control in the different stages of seed-growing of this crop.
Breeding lines and species of basic sunflower collection and genetical collection of sunflower of the Institute of oilseed crops were taken as the material for the research .
It was carried out the study of the genetical polymorphism on the little group of the selection valuable lines from basic collection. The method of microsatellite DNA amplification was used.
Marking of hybrid parent lines with monogenic recessive morphological sings is important and even critical condition for genetic purity control of the lines from our point of view. The main requirements for the sings that are used as markers are clear visual distinguishability, the manifestation before or at the beginning of the flowering, the absence of negative pleiotropic effect on economically valuable sings, the full penetrance, zero or little modification variability. The long-term observation of collection species and their study allowed to make the base of biometrical changes and phenological observations of sunflower lines.
Unfortunately, nowadays monogenic recessive markers are not used nearly at all in the breeding process.
In the same time ability for using heteromorphous morphological sings as markers are limited because of the ones' lack. Reliability improvement of the identification of breeding species and providing genetic purity control of inbreeding lines and hybrid level is possible within DNA markers use.
Our experience of practical seed-growing of parent lines of commercial sunflower hybrids allows to state that the combination of molecular genetical markers and genes of morphological sings markers allows high reliability genetical purity control of parent lines and providing commercial genotypes identity for copyright protection.
Amplification profiles of microsatellite DNA of five sunflower lines from the Institute of the oilseed crops (ZL-22, ZL -102, ZL -103, ZL -165, ZL -169) on 8 loci (ORS78, ORS509, ORS595, ORS815, ORS3, ORS4; Na1796 , Na1608) were studied In the Southern biotechnological centre of NAAS. At the beginning stage individual plants sample was analysed to determine genetic purity. Three microsatellite loci showed investigated lines polymorphism.
Each genotype has its unique allele combination that allows to write down identification genotype formula that includes information of loci and according alleles. To differentiate a line from the set one should only study three polymorphous loci.
To get identification formula able to differ investigated genotype from wide set of world breeding forms the number of analised microsatellite loci should be increased up to 15-20.
The DNA-typing allows us to determine lot quality of seed before sowing and to cull those do not agree with typical and hybrid level. The molecular genetic markers to a high accuracy marking genotype could be effectively used for genetic purity control in lines reproduction nursery and in progeny evaluation nursery.
The problem of marking sunflower genotypes using received data could be solved by using at least 13 recessive genes of morphological sings and 8 microsatellite DNA.
Complex use of recessive morphological sings and sunflower DNA markers allows increasing objectivity of identity value of breeding material and effectiveness of different stages of seed growing.

Key words: microsatellite locus, recessive gene, electrophoresis.

ВВЕДЕНИЕ

Частная генетика подсолнечника изучена недостаточно в сравнении с генетикой некоторых других культур (например, гороха, кукурузы, сои, томатов) [1, 2].

До недавнего времени генетические карты высших растений были основаны почти исключительно на морфологических и биохимических признаках. Эти карты быстро дополняются на основе ДНК маркеров, с помощью новых молекулярных методов [3].

Анализ продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) является одним из наиболее оптимальных по временным и материальным затратам методов оценки молекулярно-генетического полиморфизма. Возможность программируемого контроля реакции и оперирования большим количеством образцов позволяет проводить анализ разнообразного селекционного материала. Исследование микросателлитной ДНК (SSR - simple sequence repeats) позволяет получать стабильные кодоминантные маркеры при условии использования любой части растения, в том числе и семянки. Набор аллелей SSR-локусам является уникальной характеристикой генотипов подсолнечника, что дает возможность записать для каждого из них идентификационную формулу [4], дифференцировать генотипы селекции основных центров создания генетического материала этой культуры в Украине, определять типичность инбредных линий и уровень гибридности простых гибридов [5].

Аргентинские ученые изолировали и охарактеризовали 170 полиморфных микросателитных локусов ДНК-подсолнечника [6]. Эти работы позволили установить частоту нахождения различных локусов в геноме подсолнечника и использовать их для идентификации генотипов [7]. Коллективом ученых ВНИИМК был проведен кластерный анализ по 9 SSR локусам и паспортизованы 17 инбредных линий подсолнечника [8].

Целью нашего исследования является поиск рецессивных генов морфологических признаков и ДНК маркеров подсолнечника, эффективных для контроля генетической чистоты на различных этапах семеноводства этой культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для изучения служили селекционные линии и образцы базовой коллекции подсолнечника и генетической коллекции подсолнечника Института масличных культур НААН. Генетическая коллекция зарегистрирована в Национальном центре генетических ресурсов растений Украины (св-во №43), включает 71 образец из 12 стран. Базовая коллекция зарегистрирована совместно с Институтом растениеводства им. В.Я. Юрьева (св-во №58), включает 1091 образец из 18 стран.

Методами работы с коллекцией являются: анализ многолетних наблюдений над отдельными образцами и признаками, а также генетический анализ наследования отдельных признаков. В данном исследовании обобщена информация о наследовании потенциальных маркерных признаков в отдельных линиях. Сформирована коллекция линий доноров морфологических маркерных признаков.

На небольшой группе селекционно-ценных линий, включенных в базовую коллекцию, проведено изучение генетического полиморфизма. Использовали метод амплификации микросателлитной ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Маркирование родительских линий гибридов моногенными рецессивными морфологическими признаками является, на наш взгляд, важным и даже решающим условием контроля генетической чистоты линий при неизбежных нарушениях норм пространственной изоляции из-за насыщенности севооборотов при современной системе растениеводства посевами товарного подсолнечника. В практике семеноводства линий и гибридов подсолнечника моногенные морфологические признаки незаменимы для контроля генетической чистоты при размножении линии на больших (десятки гектаров) площадях, а также в работе с большими (десятки тонн) объемами семян. Кроме того, они эффективны для контроля чистоты линий на участках гибридизации и обеспечения 100%-гибридности полученных семян. Основными требованиями, предъявляемыми к признакам как маркерам, являются: четкая визуальная отличимость, проявление до цветения или в начале фазы цветения, отсутствие отрицательного плейотропного влияния на хозяйственно-ценные признаки, 100% пенетрантность, отсутствие или незначительная модификационная изменчивость. Многолетнее наблюдение за коллекционными образцами и их изучение позволило создать базу данных биометричечких измерений и фенологических наблюдений за линиями подсолнечника. Результаты генетической работы с наследованием отдельных признаков также были обобщены и указаны в зарегистрированной в Национальном центре генетических ресурсов растений Украины генетической коллекции. Перечень генов морфологических признаков и линий их источников приведен в таблице 1.

В настоящее время, к сожалению, моногенные рецессивные маркеры практически не используются в селекционном процессе. Например, среди всех гибридов оригинальной украинской селекции рецессивными морфологическими признаками маркированы: отцовская форма гибридов Запорожский 26 и Запорожский 28 (ген лимонной окраски язычковых цветков), материнская форма гибрида Смак (оранжевая окраска язычковых цветков), а также отцовская форма высокоолеинового гибрида Одор (ген оранжевой окраски

язычковых цветков). Линии одесской селекции ОД973, Од2080 имеют хорошо отличимую светло-желтую окраску язычковых цветков.

Таблица 1 - Коллекция доноров моногенных морфологических маркерных признаков подсолнечника

Название признака	Ген (обозначение)	Источник (образец, линия)	Авторы публикаций
Признаки, влияющие на весь морфотип растения			
Светло-коричневая окраска листьев	*lb*	I_nК-3159	Ведмедева Е.В., Толмачёв В.В., 1999
Желтая точка роста	*y*	I_nLК-254	*E.A.Hockett, P F Knowles*, 1970
Признаки листа и стебля			
Белеющие нижние листья	*wl*	Сл-1260	Ведмедева Е.В., Толмачёв В.В., 1999
Деградация верхушки листовой пластинки	*rtl*	К-2238	Ведмедева Е.В., Толмачёв В.В., 1999
Ложкообразная листовая пластинка	*sp*	К1907	Kovacek, 1980
Выросты листовой пластинки на черешке	*dl*	Сл2371	Демурин Я.Н., Толмачёв В.В., 1986
Желтый стебель	*ys*	ЛГ-4	Бочкарёв Н.И. и др., 1991
Эректоидный черешок	*er*	К-562	Стоянова И., Петров П, Иванов П., 1985
Признаки обертки корзинки			
Рассечённые листочки обёртки	*slb*	Сл-2290	Толмачёв В.В., 1998
Признаки, обнаруживаемые во время цветения			
Лимонные краевые цветки	*l* l_1	LD831 ВК-404	Koccerell 1912 Першин А.Ф., 1996
Светло-желтые краевые цветки	*ly*	ВА-1Б	Толмачёв В.В., 1991
Абрикосовые краевые цветки	*ap*	КГ-13	Толмачёв В.В., 1991
Оранжевые краевые цветки	*o*	ВИР-130	*M.L.Kinman* 1964, *Leclerk P*, 1968

В то же время возможности использования генов гетероморфных морфологических признаков в качестве маркерных вследствие их относительной малочисленности ограничены. Повышение надежности идентификации селекционных образцов, осуществление контроля генетической чистоты инбредных линий и уровня гибридности возможно при использовании ДНК-маркеров.

Наш опыт практического семеноводства родительских линий коммерческих гибридов подсолнечника позволяет утверждать, что сочетание в использовании молекулярно-генетических маркеров и генов маркерных морфологических признаков дает возможность с высокой надежностью контролировать генетическую чистоту родительских линий. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма определенных локусов генома позволит осуществлять идентификацию коммерческих генотипов с целью защиты авторских прав, определения уровня типичности и гибридности.

В Южном биотехнологическом центре НААН исследовали профили амплификации микросателлитной ДНК пяти линий подсолнечника селекции Института масличных культур (ЗЛ-22, ЗЛ-102, ЗЛ-103, ЗЛ-165, ЗЛ-169) по 8 локусам (ORS78, ORS509, ORS595, ORS815, ORS3, ORS4; На1796, На1608). Для определения генетической чистоты линий на начальном этапе анализировали выборку индивидуальных растений. Три микросателлитных локуса выявили полиморфизм исследуемых линий (табл. 2).

Таблица 2 - Генотипы линий по микросателлитным локусам

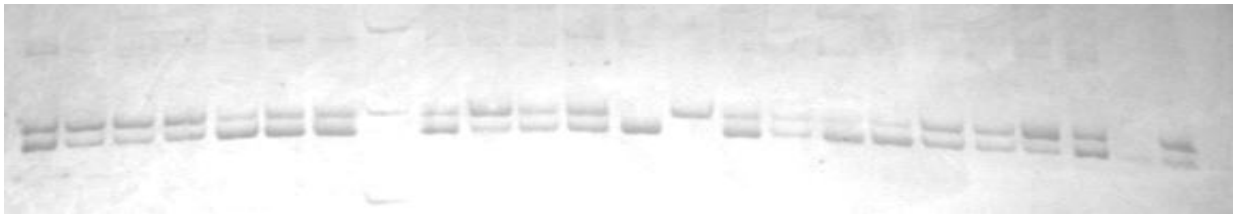
Линия	Аллели , п.н. (код локуса)							
	ORS78 (A)	*ORS509* (B)	*ORS595* (C)	*ORS815* (D)	*ORS3* (E)	*ORS4* (F)	*На1796* (G)	*На1608* (H)
ЗЛ-22	156	202	179	181	232	157	235	172
ЗЛ-102	156	202	143	181	232	157	235	169
ЗЛ-103	156	196	179	181	232	157	235	169
ЗЛ-165	156	196	143	181	232	157	235	175
ЗЛ-169	156	199	179	181	232	157	235	169

Каждый генотип имеет уникальное сочетание аллелей, что позволяет записать идентификационную формулу генотипа, включающую информацию о локусах и соответствующих им аллелях. Для дифференциации любой линии из проанализированного набора линий достаточно провести исследование трёх полиморфных локусов (табл. 3).

Таблица 3 - Идентификационные формулы исследованных линий

ЗЛ-22	$B_{202}C_{179}H_{172}$
ЗЛ-102	$B_{202}C_{143}H_{169}$
ЗЛ-105	$B_{196}C_{179}H_{169}$
ЗЛ-165	$B_{196}C_{143}H_{175}$
ЗЛ-169	$B_{199}C_{179}H_{169}$

Для получения идентификационных формул, способных дифференцировать исследуемый генотип из расширенного набора форм мировой селекции, количество анализируемых микросателлитных локусов необходимо увеличить до 15 - 20. Сравнение амплификационных спектров индивидуальных растений (или семян) инбредной линии по ряду микросателлитных локусов позволяет судить о ее гомозиготности. При наличии полиморфизма между родительскими формами, спектр гибрида F1 объединяет оба родительских аллеля (рис. 1). Сравнительный анализ электрофоретических спектров родителей и выборки (порядка 100 образцов) семян гибрида, позволяет быстро и точно определить процент гибридных семян, т.е. установить уровень гибридности в данной партии семян.



1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 P1 P2 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК родительских форм (P1, P2) и индивидуальных растений гибрида F_1 (1 - 21) по микросателлитному локусу *ORS815*. M – маркер молекулярного размера фрагментов.

Для этого достаточно провести анализ по нескольким, полиморфным для родительских линий, микросателлитным локусам. Для идентификации гибрида, т.е. установления его происхождения от определенных линий, необходимо исследовать семена по всем локусам - определить их соответствие идентификационной формуле данного гибрида.

ДНК-типирование позволит до посева определить качество партий семян, отбраковать семена, не соответствующие нормам уровня типичности и гибридности. Молекулярно-генетические маркеры, с высокой точностью маркирующие генотип, могут быть эффективно использованы для контроля генетической чистоты в питомнике размножения линий, а также в питомнике оценки потомств линий.

Гены-маркеры, эффект которых проявляется на уровне организма, в частности, гены отдельных морфологических признаков эффективны для контроля генетической чистоты при размножении линий (на этапах получения элиты и первой репродукции) и, что чрезвычайно важно, на участках гибридизации.

Сейчас для внесения в Реестр сортов растений Украины указывается минимальное морфологическое описание, но требуется наличие морфологических особенностей. Пока количество этих особенностей минимально. В будущем скорее всего это требование будет более жёстким с точки зрения морфологии и обязательным будет использование молекулярных генетических маркеров. Объединение этих показателей в будущем сможет дать действительную защиту прав интеллектуальной собственности селекционера, полную уверенность в чистоте семенного материала и качестве семеноводческого процесса.

ВЫВОДЫ

1. Показан спектр разнообразия морфологических маркерных признаков и микросателитных локусов ДНК подсолнечника.
2. Проблема маркирования генотипов подсолнечника в данный момент может быть решена использованием по меньшей мере 13 рецессивных генов морфологических признаков и 8 микросателитов ДНК.
3. Комплексное использование генов рецессивных морфологических признаков и ДНК-маркеров подсолнечника позволит увеличить объективность идентификационной оценки селекционного материала и эффективность разных этапов семеноводческой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова В.А. Генетика культурных растений. Подсолнечник / В.А.Гаврилова, И.Н. Анисимова. – СПб: ВИЗР, 2003. – 209 с.
2. Коновалов Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха (Pisum sativum L.): автореф. дис. на соискание науч. степени. канд. биол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика»/ Ин-т общ. генетики им. Н.И. Вавилова РАН. – М., 2006. – 20 с.
3. Knapp S.I. Genetic mapping in sunflowers DNA / S.I.Knapp, S.T.Berry L.H Rieseberg // Based Markers in Plants. – Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands. – 2001. –

P.111-125.

4. Саналатий А.В. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа / А.В. Саналатий, А.Е. Солоденко, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 4. – С.31-37
5. Солоденко А.Е. Идентификация генотипов подсолнечника с помощью микросателлитных маркеров / А.В. Солоденко , А.В. Саналатий, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38. № 2. – С.15-19.
6. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (Helianthus annuus L.) / [Paniego N., Eschaide M., Munoz M., at.al] // Genome. – 2002. – №.45. – P.34-43.
7. Solodenko A. Genotyping of Helianthus based on microsatellite sequences / A.Solodenko, Y.Sivolap // Helia. – 2005. – Nr.42. – P.19-26.
8. Микросателитные локусы как маркеры для идентификации и сертификации линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК / С.З. Гучетель, Т.А. Челюстникова, Т.С. Антонова, С.А. Рамзанова // Масличные культуры. Научно- технический бюлетень ВНИИМК. – 2007. – Вып. 2 (137). – С.27-32.

REFERENCES

1. Gavrilova V.A. Genetika kulturnykh rasteniy. Podsolnechnik. / V.A. Gavrilova, I.N.Anisimova – SPb: VIZR, 2003. – 209 s.
2. Konovalov F.A. Kartirovanie i molekulyzrno-geneticheskiy analiz genov gorokha (Pisum sativum L.): avtoref. dis. na soiskanie nauch. stepeni kand. biol. nauk : spets. 03.00.15 «Genetika»/ Institut obshch. genetiki im. N.I. Vavilova RAN. – M., 2006. - 20 s.
3. Knapp S.I. Genetic mapping in sunflowers DNA / S.I.Knapp, S.T.Berry L.H Rieseberg // Based Markers in Plants.– Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands. – 2001. – P.111-125.
4. Sanalatiy A.V. Identifikatsiya genotipov podsolnechnika ukrainskoy selektsiy pri pomoshchi SSRP-analiza / A.V. Sanalatiy, A.E. Solodenko, Yu.M. Sivolap // Tsitologiya i genetika. – 2006. – T. 40, № 4. – S.31-37
5. Solodenko A.E. Identifikatsiya genotipov podsolnechnika s pomoshchyu mikrosatelitnykh markerov / A.E. Solodenko, A.V. Sanalatiy, Yu.M. Sivolap // Tsitologiya i genetika. - 2004.- T. 38. № 2. - S.15-19.
6. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (Helianthus annuus L.) / [Paniego N., Eschaide M., Munoz M., at.al] // Genome. – 2002. – №.45. – P.34-43.
7. Solodenko A. Genotyping of Helianthus based on microsatellite sequences / A.Solodenko, Y.Sivolap // Helia. – 2005. – Nr.42. – P.19-26.
8. Mikrosatelitnye lokusy kak marker dlya identifikatsiy i sertafikatsiy liniy i gibridov podsolnechnika selektsiy VNIIMK / S.Z. Guchetel, T.A. Chelyustnikova, T.S. Antonova, S.A. Ramazanova // Maslichnye kultury. Nauchno- tekhnicheskiy byuleten VNIIMK. – 2007. – Vyp. 2 (137). – S.27-32.

УДК 633.791:575.113

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ *CHS*2, *CHS*3 ТА *CHS*4 У СОРТІВ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Венгер А. М., Волкова Н. Е.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

65036,Україна, Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3

venger87@ukr.net

Молекулярно-генетичними методами визначено поліморфізм генів *chs*2, *chs*3 та *chs*4, що кодують халконсинтази 2-4 хмеля звичайного в сортів української селекції в регіонах інтронів.