

УДК 575.11.113:854.78
© 2010

Ю.М. Сиволап,
академік УААН
А.Є. Солоденко,
кандидат
біологічних наук
Південний
біотехнологічний центр
в рослинництві УААН

ІДЕНТИФІКАЦІЯ І МАРКУВАННЯ ГЕНОМУ СОНЯШНИКУ

Наведено основні напрями та результати досліджень, спрямованих на розробку і впровадження ДНК-технологій у селекційний процес та для підвищення ефективності насінництва соняшнику. Розглянуто молекулярно-генетичні дослідження геному соняшнику, що базуються на різних типах ДНК-маркерів.

Сучасні досягнення молекулярної генетики є джерелом нових і підвищення ефективності традиційних методів селекції та насінництва. Рівень генетичних досліджень на сучасному етапі значно підвищується при використанні молекулярних маркерів. Сучасна селекція майже неможлива без ефективного використання MAS-технологій (marker assisted selection). Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму певних ДНК-локусів стає ефективним заходом у генетиці та селекції рослин. Особливий інтерес викликає вивчення вихідного матеріалу і рання діагностика генотипів під час селекції, заснованої на гібридизації та доборі. Застосування молекулярних маркерів має сприяти зменшенню масштабів та скороченню термінів селекційних програм. Аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму дає змогу оцінити генетичне різноманіття, класифікувати вихідний селекційний матеріал, маркувати гени господарсько цінних ознак, а також здійснювати генетичний моніторинг у селекції та насінництві [1].

Одним з найоптимальніших за часом і матеріальними витратами методів оцінки молекулярно-генетичного поліморфізму є аналіз продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Можливість програмованого контролю реакції та оперування великою кількістю зразків дає змогу аналізувати матеріал у селекційних масштабах.

У Південному біотехнологічному центрі в рослинництві УААН (ПБЦ) уперше в СНД запроваджено використання сучасного молекулярно-генетичного методу аналізу специфічності геномів — ПЛР і розроблено низку ДНК-технологій для поліпшення певних етапів селекційного процесу та насінництва найважливіших сільськогосподарських культур, зокрема соняшнику.

Різні варіанти ПЛР використовують для дослідження геному соняшнику з метою розв'язання ряду теоретичних і прикладних питань. У ПБЦ проведено дослідження генетичного різноманіття генотипів соняшнику української селекції з використанням полілокусних і монолокусних маркерних систем [5, 8].

Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму соняшнику на між- і внутрішньовидовому рівнях. Проаналізовано поліморфізм довільно ампліфікованої ДНК 35 видів і підвидів роду *Helianthus* [13]. Порівняльний аналіз спектрів ампліфікації дав змогу визначити генетичні дистанції між різними *Helianthus* sp. Отримано схему, що відображає генетичні зв'язки між дикорослими видами *Helianthus* sp. і представниками культурного *Helianthus annuus*. Розподіл видів у цілому відповідає морфологічному поділу цього роду на секції. Виявлено, що селекційні лінії відрізняються одна від одної більше, ніж представники різних підвидів дикорослих видів *Helianthus*. Найближчі до *Helianthus annuus* види (*H. laetiflorus*, *H. salicifolius*, *H. bolandery*, *H. petiolaris*, *H. tuberosus*) можна розглядати як вірогідних донорів господарсько цінних ознак для культурного соняшнику. Аналіз генетичних дистанцій, розрахованих на підставі даних поліморфізму ДНК, дає змогу класифікувати інбредні лінії соняшнику згідно зі ступенем генетичної віддаленості, розподілити лінії на групи материнських і батьківських форм [3]. Знання генетичної спорідненості ліній, що базується на результатах молекулярно-генетичного аналізу, може бути використане в гібридній селекції під час добору батьківських пар. Показана можливість прогнозування низькогетерозисних гібридів і відбраковка на початкових етапах селекційного процесу, базуючись на результатах дослідження поліморфізму ДНК ліній [4].

Ідентифікація та реєстрація генотипів. Однією з найбільш розповсюджених систем ДНК-аналізу є ампліфікація мікросателітних послідовностей (SSR — simple sequence repeat) за ПЛР. Принциповими особливостями SSR-маркерів є їх локус-специфічність, поліалельність, кодомінантний тип успадкування, широке розповсюдження у геномі, відносна простота у використанні та відновлюваність результатів дослідження. Проаналізовано поліморфізм мікросателітної ДНК 21 виду роду *Helianthus*, що активно залучаються до міжвидової гібридизації з культурним соняшником як

донори агрономічно цінних ознак [14]. Виявлено видоспецифічні алелі, що є потенційними маркерами наявності чужорідного генетичного матеріалу в геномі віддалених гібридів.

Властива мікросателітним маркерам кодомінантна природа успадкування дає змогу досліджувати алельне різноманіття певних локусів геному та виявляти гетерозиготи. Саме тому цей тип маркерів є незамінним при визначенні генетичної чистоти сорту, лінії, а також для встановлення рівня гібридності та ідентифікації генотипів. У ПБЦ розроблено технологію ідентифікації і реєстрації інбредних ліній та гібридів соняшнику у вигляді генетичної формули генотипу за результатами ПЛР-аналізу мікросателітної ДНК [2, 10]. Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм мікросателітних локусів інбредних ліній соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, Інституту олійних культур, Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортівивчення. Набори алелів за дослідженими локусами для кожного проаналізованого генотипу виявилися специфічними, тобто повністю відображаючими унікальність селекційних форм. Складено базу даних за SSR-генотипуванням основної частини зареєстрованих у Державному реєстрі сортів рослин України генотипів соняшнику. Інформацію про алельний склад за мікросателітними локусами записано у вигляді генетичних формул [12]. Пропонуємо проводити ідентифікацію генотипів соняшнику методом ампліфікації мікросателітної ДНК тестованих зразків (будь-якої частини рослини) за допомогою ПЛР за 15 SSR-локусами, запису набору алелів за аналізованими локусами (тобто генетичної формули) та порівняння з генетичними формулами еталонних зразків, що занесені до Державного реєстру сортів рослин України та зберігаються в Центрі генетичних ресурсів. Генетична формула генотипу може бути надійним та об'єктивним критерієм для точної ідентифікації сортів, інбредних ліній та гібридів соняшнику, контролю генетичного матеріалу на всіх етапах селекції та у процесі насінництва, а також для захисту прав авторів селекційних форм. Технологія молекулярно-генетичного аналізу генотипів значною мірою відповідає вимогам UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants). ДНК-маркери спроможні доповнити DUS-тест (DUS—distinct, uniform, stable) під час аналізу рослинного матеріалу на будь-якій стадії онтогенезу.

Установлення генетичної чистоти, рівня

гібридності простих гібридів F_1 . Установлення типості, тобто генетичної однорідності інбредних ліній — одна з обов'язкових процедур у гібридній селекції. Генетично однорідні лінії — запорука отримання насіння F_1 з високим (не менше 98%) рівнем гібридності. Стандартні підходи (грунт-контроль, електрофорез запасних білків та ізоферментів) не завжди дають змогу надійно встановлювати типовість і гібридність, тому мають бути доповнені методами, що дозволяють генотипування на рівні ДНК. Ступінь гетерозиготності за локусами гіперваріабельних районів геному, а саме мікросателітів, висока (до 90%), тому вони можуть бути використані як кодомінантні маркери під час встановлення гібридності простих гібридів соняшнику F_1 . Нами запропоновано надійний, точний та швидкий спосіб оцінки рівня гібридності в партіях насіння простих гібридів соняшнику за результатами молекулярно-генетичного тестування [9].

Маркування гена стійкості до вовчка. Ефективність селекції соняшнику значно залежить від доповільної діагностики генетично детермінованої стійкості до рослини-паразита — вовчка (*Orobanche cumana*). Використання ДНК-маркерів до гена *Or 3* дає змогу скоротити терміни тестування стійкості генотипів соняшнику до вовчка, а також, що важливо в селекції, проводити такий аналіз на будь-якій стадії розвитку рослини. В Україні поширена раса С («молдавська»), стійкість до якої пов'язана з захисною реакцією в судинах коренів і контролюється одним домінантним геном *Or 3*. В Інституті олійних культур за умов Договору про сумісну роботу створено популяцію F_2 від схрещення контрастних за стійкістю до вовчка (раса С) батьківських ліній, протестовано популяцію F_3 , диференційовано рослини F_2 на гомо- та гетерозиготні генотипи за геном *Or 3*. Нами виявлено ДНК-маркери, що диференціюють контрастні за стійкістю генотипи, встановлено зчеплення отриманих маркерів і локусу *Or 3* [8, 11]. Установлення алельного складу ліній та гібридів за локусами геному соняшнику RTS 338_A, RTS 338_C, RTS 338_D, ORS 1036 пропонуємо як спосіб ідентифікації стійких до вовчка генотипів [7].

Найефективнішим для тестування наявності генетично детермінованої стійкості до вовчка визнано мікросателітний локус ORS 1036. Означений ДНК-маркер зчеплено з локусом *Or 3* на відстані 8 сМ, що свідчить про ефективність використання у 90,7% проведених тестувань.

Висновки

У Південному біотехнологічному центрі в рослинництві УААН у розробку теорії і практики селекції соняшнику в Україні впровадже-

но новий прогресивний метод ПЛР-аналізу, розроблено ДНК-технології тестування поліморфізму та генетичної спорідненості,

ідентифікації генотипів, оцінки генетичної чистоти інбредних ліній та рівня гібридності простих гібридів соняшнику, діагностики стійкості до вовчка. Стратегічним напрямом досліджень є маркування генів стійкості со-

няшнику до несправжньої борошністої роси, генів, контролюючих синтез олеїнової кислоти, генів-відновлювачів фертильності, локусів кількісних ознак, таких як урожайність і вміст олії.

Бібліографія

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях//Науч.-метод. руковод./Под ред. Ю.М. Сиволапа. — К.: Аграр. наука, 1998. — С. 9.
2. Сиволап Ю., Волкодав В., Бальвінська М., Кожухова Н., Солоденко А., Чеботар С. Ідентифікація і ресстрація генотипів м'якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшнику за допомогою аналізу мікросателітних локусів//Метод. реком. — ПБЦ в рослинництві УААН, Одеса. — 2004. — 14 с.
3. Сиволап Ю.М., Солоденко А.Е., Бурлов В.В. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus*)//Генетика. — 1998. — № 2. — С. 37—43.
4. Сиволап Ю., Солоденко А., Бурлов В. Исследование молекулярно-генетического разнообразия инбредных линий и уровня гетерозиса у гибридов//Цитология и генетика. — 1998. — № 6. — С. 6—12.
5. Солоденко А., Саналатий А., Сиволап Ю. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров//Цитология и генетика. — 40, № 4. — 2006. — С. 37—43.
6. Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В., Ведмедева К.В., Сиволап Ю.М. Маркирование гена устойчивости к заразихе *Og 3* у подсолнечника//Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 5. — С. 9—12.
7. Солоденко А., Трояновська А., Сиволап Ю. Ідентифікація стійких до вовчка (*Orobanche citala* Wallr.) генотипів соняшнику//Метод. реком. — ПБЦ в рослинництві УААН. — Одеса, 2007. — 7 с.
8. Солоденко А., Трояновська А., Сиволап Ю. Система ДНК маркерів для використання в селекції та насінництві соняшнику//Геном рослин. Зб. наук. статей. — Одеса, 2008. — С. 121—124.
9. Спосіб встановлення типовості та рівня гібридності генотипів соняшнику. — Деклараційний патент на винахід № 63265А. — Отримано 15.01.2004. — Бюл. № 1.
10. Спосіб ідентифікації генотипів соняшнику. — Деклараційний патент на винахід № 68813А. — Отримано 16.08.2004. — Бюл. № 8.
11. Спосіб ідентифікації стійких до вовчка генотипів соняшнику. — Деклараційний патент на корисну модель № 10339. — Отримано 15.11.2005. — Бюл. № 11.
12. Трояновская А.В., Солоденко А.Е., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа//Цитология и генетика. — 2006. — 40, № 4. — С. 37—43.
13. Sivolap Yu., Solodenko A. Inter- and intra-species differentiation in the genus *Helianthus* by RAPD analysis//Helia. — 1998. — № 21. — P. 9—18.
14. Solodenko A., Sivolap Yu. Genotyping of *Helianthus* based on microsatellite sequences//Helia. — 2005. — 28, № 42. — P. 19—26.