

ISSN 2409–5524

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ —  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР  
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

# **ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ**

**СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОГО ІНСТИТУТУ —  
НАЦІОНАЛЬНОГО ЦЕНТРУ  
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ**

*Відповідальний редактор  
член-кореспондент НААН України В. М. Соколов*

Видання засноване у 1956 році

**Випуск 25 (65)**

Одеса  
СГІ–НЦНС  
2015

УДК 633.1(051.2)

ЗАСНОВНИК

СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ — НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР НАСІННЄЗНАВСТВА  
ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

**СОКОЛОВ В. М.** (відповід. редактор), к. с.-г. н. ;  
**ЛИТВИНЕНКО М. А.** (заст. відповід. редактора), д. с.-г. н. ;  
**БАБАЯНЦ О. В.**, д. б. н. ;  
**БЕЛОУСОВ А. О.**, д. б. н. ;  
**ВАРЕНИК Б. Ф.**, к. с.-г. н. ;  
**ВЛАСЕНКО В. А.**, д. с.-г. н., Сумський національний аграрний університет;  
**ВОЛКОВА Н. Е.**, д. б. н. ;  
**ГЕРАСИМЕНКО В. П.**, д. б. н., Одеський державний аграрний університет;  
**ДАВИДЕНКО О. Г.**, д. б. н., Інститут генетики та цитології Національної академії наук Республіки Білорусь;  
**ДРЕМЛЮК Г. К.**, д. с.-г. н. ;  
**КІНДРУК М. О.**, д. с.-г. н. ;  
**ЛАВРИНЕНКО Ю. О.**, д. с.-г. н., Інститут зрошуваного землеробства НААН України;  
**ЛИФЕНКО С. П.**, д. с.-г. н. ;  
**ЛІНЧЕВСЬКИЙ А. А.**, д. с.-г. н. ;  
**ЛЯХ В. О.**, д. б. н., Запорізький національний університет;  
**МАРТОН Л. Ч.**, доктор наук, Інститут сільського господарства Центру сільськогосподарських досліджень Угорської академії наук;  
**ПУШКАРЕНКО О. Я.**, к. б. н. ;  
**РИБАЛКА О. І.**, д. б. н. ;  
**СІЧКАР В. І.**, д. б. н. ;  
**СТЕЛЬМАХ А. Ф.**, д. б. н. ;  
**ФАЙТ В. І.**, д. б. н.

Зростання кількості населення на Земній кулі та одночасне скорочення площ під с.-г. угіддями загостило глобальну проблему забезпечення людства продовольством. І у подальшому рішення назрілої проблеми значною мірою залежатиме від застосування в селекційному процесі сучасних біотехнологічних підходів. Такі дослідження розпочалися в СГІ завдяки науковому ентузіазму Юрія Михайловича Сиволапа, доктора біологічних наук, професора, академіка НААН України, який, на превеликий жаль, через тяжку хворобу пішов із життя. Біотехнологічні наробки, старт яким дав Ю. М. Сиволап, знайшли гідне продовження як в СГІ–НЦНС, так і в багатьох інших наукових центрах. І не тільки України.

Збірник розрахований на науковців, селекціонерів, викладачів, аспірантів, студентів біологічного та сільськогосподарського профілів.

*Під назвою «Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортівивчення» видання виходить з 2002 року*

## ЗМІСТ

**ГЕНЕТИКА**

ВЕРБИЦЬКА Т. Г. ДНК-технології в селекції рослин: від кінетики реасоціації до генної інженерії . . . . .	9
ФАЙТ В. І., БАЛАШОВА І. А., ГАЛАЄВА М. В. Маркування генів якісних та кількісних ознак адаптивності пшениці м'якої ( <i>Triticum aestivum</i> L.) . . . . .	19
ЧЕБОТАР С. В., БЛАГОДАРОВА О. М., КОЗУБ Н. О., СОЗІНОВ І. О. ПЛР-аналіз поліморфізму локусів, що впливають на якість зерна пшениці м'якої ( <i>Triticum aestivum</i> L.) . . . . .	35
МОЦНИЙ І. І., СУДАРЧУК Л. В., ЧЕБОТАР С. В. Молекулярно-генетичне визначення пшенично-житніх хромосомних заміщень і транслокацій у сортів і інтрогресивних ліній пшениці . . . . .	50
ГАЛАЄВ О. В., БАБАЯНЦ Л. Т. Молекулярно-генетичні маркери для ідентифікації генів стійкості до грибкових захворювань пшениці м'якої ( <i>Triticum aestivum</i> L.) . . . . .	61
БАЛЬВІНСЬКА М. С., КАЛЕНДАР Р. М., БАЛАШОВА І. А., СТРАТУЛА О. Р., БРИК О. Ф., ЗАХАРОВА О. О., СУЛІМА Ю. Ю., БІЛИНСЬКА О. В., НЕЦВЕТАЄВ В. П. ДНК-технології в генетико-селекційних дослідженнях ячменю ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) в СГІ–НЦНС . . . . .	76
ВОЛКОВА Н. Е., БУКРЄЄВА Н. І., СЛИЩУК Г. І. Молекулярно-генетичний та біоінформатичний аналіз поліморфізму геному кукурудзи ( <i>Zea mays</i> L.): результати 25 років досліджень в СГІ–НЦНС . . . . .	91
СОЛОДЕНКО А. Є., ВАРЕНИК Б. Ф., БУРЛОВ В. В., ВЕДМЕДЄВА К. В. Використання ДНК-маркерів в генетико-селекційних програмах соняшнику ( <i>Helianthus annuus</i> L.) . . . . .	103
ВОЛКОВА Н. Е., БРИК О. Ф., ВЕНГЕР А. М. Ідентифікація сортів сої культурної ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr) та аналіз генів, що кодують субодиниці гліциніну . . . . .	114
ГАЛАЄВ О. В., ГАЛАЄВА М. В., ШПАК Д. В. Виявлення расоспецифічних генів стійкості до пірикуляріозу <i>Pi-ta</i> та <i>Pi-b</i> у сортів рису ( <i>Oryza sativa</i> L.) . . . . .	120
ШЕВЧУК Г. Ю. Молекулярно-генетичний аналіз видів роду <i>Sorghum</i> Moench . . . . .	129
ШАЮК Л. В., РОЇК М. В. Порівняльний аналіз алельного складу мікросателітних локусів буряків цукрових ( <i>Beta vulgaris ssp. Saccharifera</i> Dole) . . . . .	135
ВЕНГЕР А. М., ВОЛКОВА Н. Е. Молекулярні маркери в селекції та розсадництві хмелю звичайного ( <i>Humulus lupulus</i> L.) . . . . .	141

ВЛАСОВ В. В., МУЛЮКІНА Н. А., ТУЛАЄВА М. І., КОВАЛЬОВА І. А., ЧІСНІКОВ В. С., КОНУП Л. О., КАРАСТАН О. М., ЛОСЄВА Д. Ю. ДНК-технології у дослідженні винограду ( <i>Vitis vinifera</i> L.) в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»: методичні та історичні аспекти . . . . .	147
СОЛОДЕНКО А. Є., ГРЕВЦОВА Г. Т., ДРАБИНЮК Г. В. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму природних популяцій кизильників ( <i>Cotoneaster sp.</i> ) в Україні . . . . .	154

### **БІОТЕХНОЛОГІЯ**

ШЕСТОПАЛ О. Л., ІГНАТОВА С. О., ЗАМБРІБОРЩ І. С., ЗЕЛЕНІНА Г. А. Методи культури <i>in vitro</i> для сучасної селекції пшениці м'якої ( <i>Triticum aestivum</i> L.) та ячменю ( <i>Hordeum</i> <i>vulgare</i> L.) . . . . .	160
ДОБРОВА Г. О., ЗАМБРІБОРЩ І. С., ШЕСТОПАЛ О. Л. Вплив генотипу і умов культивування на регенерацію рослин у культурі пиляків пшениці твердої ( <i>Triticum durum</i> Desf.) <i>in vitro</i> . . . . .	175

### **ФІТОПАТОЛОГІЯ**

ВОЛКОВА Н. Е., СОЛОДЕНКО А. Є., БАЛАШОВА І. А., ЗАХАРОВА О. О., ВЕНГЕР А. М. Молекулярна детекція збудників інфекційних хвороб сільськогосподарських культур . . . . .	184
--	-----

### **СЕЛЕКЦІЯ ТА НАСІННИЦТВО**

ЛИТВІНЕНКО М. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні методи у селекції сільськогосподарських культур в Україні . . . . .	195
БЕЛОУСОВ А. О., СОКОЛОВ В. М., ДОМЕНЮК В. П. Використання MAS-технології в селекції кукурудзи ( <i>Zea mays</i> L.) на гетерозис . . . . .	204
КОЛЕСНИК О. О., ЧЕБОТАР С. В., ВОЛКОВА Н. Е., БАЛЬВІНСЬКА М. С., СОЛОДЕНКО А. Є., ГАЛАЄВ О. В. ДНК-типсування сільськогосподарських культур за допомогою мікросателітного аналізу для диференціації, ідентифікації та реєстрації генотипів . . . . .	213

### **ОГЛЯДИ**

КАЛЕНДАР Р. М. Молекулярні маркери на основі ретротранспозонів . . . . .	227
РИБАЛКА О. І., ЩЕРБИНА З. В. Пшениця з високим вмістом амілози — нове слово в селекції культури . . . . .	246

### **ПОРТРЕТИ**

ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ СИВОЛАП: ЛЮДИНА, НАУКОВЕЦЬ, ВЧИТЕЛЬ . . . . .	266
--	-----

## СОДЕРЖАНИЕ

**ГЕНЕТИКА**

ВЕРБИЦКАЯ Т. Г. ДНК-технологии в селекции растений: от кинетики реассоциации до геной инженерии . . . . .	9
ФАЙТ В. И., БАЛАШОВА И. А., ГАЛАЕВА М. В. Маркирование генов качественных и количественных признаков адаптивности пшеницы мягкой ( <i>Triticum aestivum</i> L.) . . . . .	19
ЧЕБОТАРЬ С. В., БЛАГОДАРОВА Е. М., КОЗУБ Н. А., СОЗИНОВ И. А. ПЦР-анализ полиморфизма локусов, влияющих на качество зерна пшеницы мягкой ( <i>Triticum aestivum</i> L.) . . . . .	35
МОЦНЫЙ И. И., СУДАРЧУК Л. В., ЧЕБОТАРЬ С. В. Молекулярно- генетическое определение пшенично-ржаных хромосомных замещений и транслокаций в сортах и интрогрессивных линиях пшеницы . . . . .	50
ГАЛАЕВ А. В., БАБАЯНЦ Л. Т. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации генов устойчивости к грибковым заболеваниям пшеницы мягкой ( <i>Triticum aestivum</i> L.) . . . . .	61
БАЛЬВИНСКАЯ М. С., КАЛЕНДАРЬ Р. Н., БАЛАШОВА И. А., СТРАТУЛА О. Р., БРИК А. Ф., ЗАХАРОВА О. А., СУЛИМА Ю. Ю., БЕЛИНСКАЯ Е. В., НЕЦВЕТАЕВ В. П. ДНК-технологии в генетико- селекционных исследованиях ячменя ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) в СГИ–НЦСС . . . . .	76
ВОЛКОВА Н. Э., БУКРЕЕВА Н. И., СЛИЩУК Г. И. Молекулярно- генетический и биоинформатический анализ полиморфизма генома кукурузы ( <i>Zea mays</i> L.): результаты 25 лет исследований в СГИ–НЦСС . . . . .	91
СОЛОДЕНКО А. Е., ВАРЕНИК Б. Ф., БУРЛОВ В. В., ВЕДМЕДЕВА Е. В. Использование ДНК-маркеров в генетико- селекционных программах подсолнечника ( <i>Helianthus annuus</i> L.) . . . . .	103
ВОЛКОВА Н. Э., БРИК А. Ф., ВЕНГЕР А. Н. Идентификация сортов сои культурной ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr) и анализ генов, кодирующих субединицы глицинина . . . . .	114
ГАЛАЕВ А. В., ГАЛАЕВА М. В., ШПАК Д. В. Выявление расоспецифических генов устойчивости к пирикулярриозу <i>Pi-ta</i> и <i>Pi-b</i> в сортах риса ( <i>Oryza sativa</i> L.) . . . . .	120
ШЕВЧУК А. Ю. Молекулярно-генетический анализ видов рода <i>Sorghum</i> Moench . . . . .	129
ШАЮК Л. В., РОИК М. В. Сравнительный анализ аллельного состава микросателлитных локусов свеклы сахарной ( <i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>Saccharifera</i> Dole) . . . . .	135
ВЕНГЕР А. Н., ВОЛКОВА Н. Э. Молекулярные маркеры в селекции и питомниководстве хмеля обыкновенного ( <i>Humulus lupulus</i> L.) . . . .	141

ВЛАСОВ В. В., МУЛЮКИНА Н. А., ТУЛАЕВА М. И., КОВАЛЕВА И. А., ЧИСНИКОВ В. С., КОНУП Л. А., КАРАСТАН О. М., ЛОСЕВА Д. Ю. ДНК-технологии в изучении винограда ( <i>Vitis vinifera</i> L.) в ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова»: методические и исторические аспекты . . .	147
СОЛОДЕНКО А. Е., ГРЕВЦОВА Г. Т., ДРАБИНЮК Г. В. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций кизилыников ( <i>Cotoneaster</i> sp.) в Украине . . . . .	154

### **БИОТЕХНОЛОГИЯ**

ШЕСТОПАЛ О. Л., ИГНАТОВА С. А., ЗАМБРИБОРЩ И. С., ЗЕЛЕНИНА Г. А. Методы культуры <i>in vitro</i> для современной селекции пшеницы мягкой ( <i>Triticum aestivum</i> L.) и ячменя ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) . . . . .	160
ДОБРОВА А. А., ЗАМБРИБОРЩ И. С., ШЕСТОПАЛ О. Л. Влияние генотипа и условий культивирования на регенерацию растений в культуре пыльников пшеницы твердой ( <i>Triticum durum</i> Desf.) <i>in vitro</i> . . . . .	175

### **ФИТОПАТОЛОГИЯ**

ВОЛКОВА Н. Э., СОЛОДЕНКО А. Е., БАЛАШОВА И. А., ЗАХАРОВА О. А., ВЕНГЕР А. Н. Молекулярная детекция возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных культур . . . . .	184
---	-----

### **СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО**

ЛИТВИНЕНКО Н. А. Биотехнологические и молекулярно- генетические методы в селекции сельскохозяйственных культур в Украине . . . . .	195
БЕЛОУСОВ А. А., СОКОЛОВ В. М., ДОМЕНЮК В. П. Использование MAS-технологии в селекции кукурузы ( <i>Zea mays</i> L.) на гетерозис . . . . .	204
КОЛЕСНИК О. А., ЧЕБОТАРЬ С. В., ВОЛКОВА Н. Э., БАЛЬВИНСКАЯ М. С., СОЛОДЕНКО А. Е., ГАЛАЕВ А. В. ДНК-типирование сельскохозяйственных культур с помощью микросателлитного анализа с целью дифференциации, идентификации и регистрации генотипов . . . . .	213

### **ОБОЗРЕНИЕ**

КАЛЕНДАРЬ Р. Н. Молекулярные маркеры на основе ретротранспозонов . . . . .	227
РЫБАЛКА А. И., ЩЕРБИНА З. В. Пшеница с высоким содержанием амилозы — новое слово в селекции культуры . . . . .	246

### **ПОРТРЕТЫ**

ЮРИЙ МИХАЙЛОВИЧ СИВОЛАП: ЧЕЛОВЕК, УЧЕНЫЙ, УЧИТЕЛЬ . . . .	266
---	-----

## CONTENTS

**GENETICS**

VERBITSKA T. G. DNA technology in plant breeding: from kinetics of reassociation to genetic engineering	9
FAYT V. I., BALASHOVA I. A., GALAEVA M. V. Marking of genes for qualitative and quantitative traits of adaptability for bread wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	19
CHEBOTAR S. V., BLAGODAROVA O. M., KOZUB N. O., SOZINOV I. O. PCR-analysis of polymorphism loci affecting the quality grains of bread wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	35
MOTSNYI I. I., SUDARCHUK L. V., CHEBOTAR S. V. Molecular-genetic evidence of wheat-rye chromosome substitution and translocation in wheat cultivars and introgression stocks	50
GALAEV O. V., BABAYANZ L. T. Molecular-genetic markers for identification of genes resistance to fungal diseases of bread wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	61
BALVINSKA M. S., KALENDAR R. M., BALASHOVA I. A., STRATULA O. R., BRYK O. F., ZAKHAROVA O. O., SULIMA YU. YU., BILINSKA O. V., NETSVETAEV V. P. DNA technology in barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) genetic and breeding research summary at PBGI–NCSCI	76
VOLKOVA N., BUKREEVA N., SLISCHUK G. Molecular-genetics and bioinformatic analysis of maize ( <i>Zea mays</i> L.) genome polymorphism: results of 25 years' research in PBGI–NCSCI	91
SOLODENCO A. Ye., VARENYK B. F., BURLOV V. V., VEDMEDEVA K. V. DNA markers for using in sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> L.) genetic and breeding	103
VOLKOVA N. E., BRIK O. F., WENGER A. M. Identification of soybean varieties ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr) and analysis of genes encoding subunit glycinins	114
GALAEV O. V., GALAEVA M. V., SHPAK D. V. Detection of race-specific blast resistance genes <i>Pi-ta</i> and <i>Pi-b</i> in rice varieties ( <i>Oryza sativa</i> L.)	120
SHEVCHUK G. Yu. Molecular genetic analysis of species of the genus <i>Sorghum</i> Moench	129
SHAJUK L. V., ROIK M. V. Comparative analysis of miorosatellite loci allelic composition of sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>Saccharifera</i> Dole)	135
WENGER A. M., VOLKOVA N. E. Molecular markers in hop breeding ( <i>Humulus lupulus</i> L.)	141

VLASOV V. V., MULJUKINA N. A., TULAEVA M. I., KOVALJOVA I. A., CHISNIKOV V. S., KONUP L. O., KARASTAN O. M., LOSJEVA D. JU. DNA-technologies for grapevine ( <i>Vitis vinifera</i> L.) researches in NSC «Tairov research institute of viticulture and wine-making»: methodological and historical aspects . . . . .	147
SOLODENKO A. Ye., GREVTSOVA G. T., DRABINYUK G. V. Molecular- genetic polymorphism investigation of natural populations of Cotoneaster ( <i>Cotoneaster</i> sp.) in Ukraine . . . . .	154

### **BIOTECHNOLOGY**

SHESTOPAL O. L., IGNATOVA S. O., ZAMBRIBORSHCH I. S., ZELENINA G. A. The methods of <i>in vitro</i> culture for modern selection of soft wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.) and barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) . . . . .	160
DOBROVA G. O., ZAMBRIBORSHCH I. S., SHESTOPAL O. L. The affect of genotype and cultural conditions on <i>in vitro</i> plant regeneration in durum wheat ( <i>Triticum durum</i> Desf.) anther culture . . . . .	175

### **PHYTOPATHOLOGY**

VOLKOVA N. E., SOLODENKO A., Ye., BALASHOVA I. A., ZAKHAROVA O. O., VENGER A. M. Molecular detection of causal agents of crops infectious diseases . . . . .	184
--	-----

### **BREEDING AND SEED INVESTIGATION**

LYTVYNENKO M. A. Of biotechnology and molecular methods in breeding of agricultural crop in Ukraine . . . . .	195
BELOUSOV A. O., SOKOLOV V. M., DOMENJUC V. P. MAS-technology using in mayze ( <i>Zea mays</i> L.) breeding for heterosis . . . . .	204
KOLESNYK O. O., CHEBOTAR S. V. , VOLKOVA N. E., BALVINSKA M. S., SOLODENKO A. E., GALAEV O. V. DNA typing of agricultural crops by microsatellite analysis for the purposes of genotype differentiation, identification and registration . . . . .	213

### **REVIEW**

KALENDAR R. N. Retrotransposon-based molecular markers . . . . .	227
RYBALKA O. I., SHCHERBYNA Z. V. HIGH-amylose wheat — a new word in the wheat breeding . . . . .	246

### **PORTRAIT**

SIVOLAP Yu. M.: Man, Scientific, Teacher . . . . .	266
--	-----



## ГЕНЕТИКА

УДК 575.1

Т. Г. ВЕРБИЦКАЯ, к. б. н., зав. лаб.  
СГІ–НЦСС, Одесса  
Лаб. молекул.-генет. исслед. «Гермедтех»  
e-mail: tg.verbitska@gmail.com

### ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ: ОТ КИНЕТИКИ РЕАССОЦИАЦИИ ДО ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

*Освещены основные научные достижения лаборатории молекулярной биологии ВСГИ в период ее становления. Изучение молекулярной структуры геномов сельскохозяйственных растений было начато под руководством Ю. М. Сиволапа. Кинетика реассоциации, анализ фракций генома, исследование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов легли в основу создания ДНК-технологий по совершенствованию селекционного процесса. Одним из направлений работы лаборатории явилось изучение влияния экзогенной ДНК на наследственность растений. Работы лаборатории создали основу анализа организации, специфики и изменчивости генома сельскохозяйственных растений.*

Ключевые слова: геном, кинетика реассоциации, генная инженерия, ДНК-технология, сельскохозяйственные растения.

**Введение.** В 1971 году в ВСГИ была создана одна из первых профильных лабораторий в системе ВАСХНИЛ — лаборатория молекулярной биологии. Основателем и бессменным руководителем ее стал молодой, энергичный, вернувшийся со стажировки из США, к. с.-х. н. Сиволап Юрий Михайлович.

Открытие генетической роли ДНК, механизмов кодирования и синтеза белков, а также молекулярных механизмов основных генетических процессов позволило подойти к исследованию на молекулярно-генетическом уровне процессов, которые считались объектом чисто генетического изучения. Одной из первостепенных задач явилось исследование специфичности молекулы ДНК важных для сельского хозяйства высших растений.

Первый этап становления лаборатории был организационно-методический. Наш маленький коллектив из 6 человек составили как сотрудники с определенным багажом знаний Л. Ф. Дьяченко, А. Н. Котлов, К. А. Серова, так и молодые, с университетской скамьи, полные энтузиазма и желания сразу все познать. Мы самоотверженно овладевали

всеми тонкостями методов молекулярной биологии. Это — спектрофотометрия, ультрацентрифугирование, ультразвуковая дезинтеграция, электрофорез, изотопные методы, разные варианты перегонки реактивов, включая вакуумную, лиофильная сушка и т. д. Надо отметить, что, благодаря энергии Юрия Михайловича и соответствующему финансированию, за несколько лет лаборатория была прекрасно оснащена и достойно конкурировала с немногочисленными подобными лабораториями Москвы, Ленинграда, Киева.

Основным материалом молекулярно-биологических исследований того времени, в силу лучшей генетической изученности и более простого состава, были прокариоты. Взяв в качестве объекта исследования злаковые, сразу столкнулись с методическими трудностями. Первый наш учитель Юрий Михайлович основные методы и подходы анализа ДНК растений освоил в ведущей в мире по уровню исследований молекулярной биологии растений и животных лаборатории доктора Дж. Боннера (Калифорния, США). Но у Дж. Боннера модельным растительным материалом был горох, а ткани злаков оказались гораздо более сложным объектом молекулярной биологии. Несовершенство методов молекулярно-генетического анализа растений приходилось компенсировать количеством. Сейчас даже трудно представить, что для выделения ДНК из кукурузы необходимо было вырастить на пробковой крошке грамм 800 этиолированных проростков и измельчить их в мельнице с жидким азотом. Лизирующего буфера требовалось 3–4 литра, раствора для диализа 4–5 литров. Мы безмерно радовались, когда в литровом стакане всплывала «медуза» ДНК. Результатом упорного и творческого труда стали первые печатные работы по выделению ДНК и хроматина и его составных частей из тканей сельскохозяйственных растений [1–3].

По оборудованию и уровню квалификации научных работников лаборатория в середине 70-х годов уже занимала одно из ведущих мест в бывшем СССР и стала методическим центром по молекулярной биологии сельскохозяйственных растений и исследованию их генома. После первых опубликованных работ и первых конференций мы уже принимали стажеров из Черновцов, Киева, Уфы, Москвы, республик Средней Азии. Разработаны и изданы первые в стране методические пособия по выделению и исследованию молекулярных соединений из тканей растений [4].

Основным направлением стало определение специфичности генома растений методами молекулярной биологии и исследования генома путем анализа вторичной структуры ДНК. Исследование организации генома методами денатурации-ренатурации ДНК, особенно анализа кинетики реассоциации ДНК, сформировали современное представление о геноме растений как сложной динамической системе. В основу работы первой аспирантки лаборатории Т. Г. Вербицкой легло изучение молекулярной организации генома ячменя. В результате исследования тер-

мальной денатурации, кинетики реассоциации, ДНК/ДНК гибридизации выявлена интрамолекулярная гетерогенность ДНК ячменя. На основе данных электронно-микроскопического анализа, результатов гибридизации фрагментов разной длины, данных гиперхромизма, изучения материала, устойчивого к  $S_1$ -нуклеазе, определен характер распределения полинуклеотидных последовательностей в геноме и разработана модель молекулярной организации генома важной сельскохозяйственной культуры — ячменя, включающая 9 классов нуклеотидных последовательностей [5, 6].

Применение методов анализа интрамолекулярной гетерогенности генома послужило важным инструментом при установлении специфичности ДНК, что является необходимым для характеристики видов. При изучении генома тритикале (гибрида пшеницы и ржи), отмечено, что этой культуре свойственны черты каждой из родительских форм и присущ ряд индивидуальных особенностей. Анализ дифференциальных профилей плавления ДНК показал наличие общих субкомпонентов у тритикале, ржи и пшеницы и индивидуальных, характерных только для генома тритикале, т. е. геном тритикале представляет собой продукт взаимодействия, а не сумму геномов исходных родителей. Сравнение кинетики реассоциации ДНК у тритикале и родительских форм пшеницы и ржи показало, что у тритикале произошло увеличение фракции наиболее часто повторяющихся последовательностей нуклеотидов и уменьшение фракции средних повторов [7].

Оказалось, что у растений фракция часто повторяющихся последовательностей значительно больше, чем у животных, и была выдвинута гипотеза, что эта разница в организации ДНК связана с теми последовательностями нуклеотидов, которые отвечают за регуляторные реакции, обеспечивая жизнедеятельность растений в изменяющихся условиях окружающей среды. Обнаружено избыточное количество рибосомных генов у растений и несколько типов регуляции рДНК. Было установлено, что количество рибосомных генов может меняться в зависимости от уровня метаболической активности ткани. Класс средних повторов занимает большую часть генома высших растений, в частности злаков. Гены, кодирующие рибосомную, транспортную РНК и гистоны, составляют сравнительно небольшую часть ДНК с промежуточной повторяемостью. Основную долю этой фракции составляют последовательности — регуляторы активности генома, обеспечивающие функционирование и репродукцию растений в изменяющихся условиях окружающей среды. Последовательности нуклеотидов малокопийной фракции злаков не являются уникальными, а повторяются в определенной степени, например в геноме ячменя 4-кратное повторение. Выявление интрамолекулярной гетерогенности ДНК и выделение фракций последовательностей разных как по количеству копий, так и по функциям в генетической системе клетки, создало возможность дифференциальной оценки эволюцион-

ной изменчивости генома. Исследование фракций ДНК позволило по-новому сформировать понятие «геном» и осознать его изменчивость в процессе макро- и микроэволюции [8–10].

С помощью анализа данных молекулярной гибридизации установлен внутривидовой диапазон изменчивости фракции малокопийной ДНК у видов культурных злаков среди сортов *Triticum aestivum* и форм *Hordeum vulgare*. Было показано, что разница между шестирядным и двухрядным ячменем не превышает уровня внутривидовой изменчивости, что дало повод считать их подвидами, а не отдельными видами. Это была одна из первых попыток оценки внутривидовой дивергенции генома культурных злаков.

В формировании биологической специфичности организма значительная роль принадлежит хромосомным белкам, которые участвуют в контроле генной активности, обеспечивают выражение генетической информации и поддерживают структуру ДНК. При изучении негистоновых белков хроматина ячменя В. В. Чарским оценена межвидовая, внутривидовая и онтогенетическая специфичность. С помощью двумерного электрофореза в составе негистоновых белков хроматина ячменя обнаружена специфичная система протеиназа — ингибитор. Было высказано предположение, что она ответственна за катаболизм ядерных белков и посредством этого может оказывать влияние на выражение генов [11].

С 1975 года началось изучение влияния экзогенной ДНК на наследственность растений. Разработка эффективного метода трансформации привлекала возможностью создания принципиально новых подходов в селекции, возможностью создания нетрадиционных методов повышения их урожайности, качества продукции, устойчивости к неблагоприятным факторам. Особую актуальность приобрела проблема разработки метода генетической трансформации у растений в связи с успехами генетической инженерии у бактерий, позволяющей *in vitro* получать гибридные (рекомбинантные) молекулы ДНК и синтезировать новые гены. Однако вопрос о возможности генетической трансформации у высших организмов оставался открытым. В 60-х и начале 70-х годов на животных были получены многочисленные, но плохо воспроизводимые результаты. Первая работа по трансформации в нашей лаборатории показала возможность индуцирования признаков морозостойкости в ячмень с помощью экзогенной ДНК ржи, способной выдерживать низкие температуры. Растворы препаратов экзогенной ДНК ржи вводили с помощью инъекций в зерновки молочной спелости, что позволило получить 54–67 % растений ячменя, которые выживали после промораживания, 18 % — в контроле. Семьи с повышенной морозостойкостью выявлялись и в  $F_3$ , с частотой появления данного признака 30–40 %, при этом спектр запасных белков морозостойких растений выходил за пределы полиморфизма белков сорта-реципиента. Такие явления пытались

объяснять возможным присутствием эписом или экзосом, образующихся в клетках реципиента с экзогенной ДНК, и имеющих регуляторное влияние на его геном, а также возможными мутациями [12].

Исследование проблемы генетической трансформации и других биологических эффектов чужеродной ДНК у растений невозможно без исследования механизмов поглощения и дальнейшей судьбы экзогенного генетического материала в клетке.

Взаимодействие экзогенной гомологичной ДНК с ядрами, выделенными из проростков кукурузы, исследовано в диссертационной работе В. А. Топтикова. Показано, что при поглощении гомологичной ДНК изолированными ядрами не участвуют системы активного транспорта или облегченной диффузии. Большое значение в процессе накопления экзогенного гомологичного материала ядрами имеют сорбционные взаимодействия, в первую очередь электростатической природы. Проникновение и накопление ДНК происходит по ограниченному количеству участков на поверхности и мест связывания в ядре экзогенного материала. Максимальное количество гомологичной ДНК, которое способно поглотить растительное ядро *in vitro*, соответствует величине реципиентного генома. Экзогенная ДНК может влиять на жизненно важные процессы, стимулируя РНК-полимеразную активность ядер и индуцируя ДНКазную активность. Впервые для растительной системы показано, что индукция ДНКазной активности затрагивает не только экзогенный, но и эндогенный материал. В целом процесс поглощения ДНК ядрами — это физиологический процесс, в котором уровень накопления регулируется реципиентной системой и зависит от ее состояния [13]. Изучали трансформирующее действие не только тотальных препаратов ДНК, но выделенных геномных фракций [14].

Работы по трансформации проводились широкомасштабно и в полевых условиях. При введении ДНК из сорта гороха Одесский 58 (Le) в семена линии 858 (le) И. С. Образцовым в 1978 г. получено растение с химерными междоузлиями. Частота появления таких растений составила  $2.5 \times 10^{-4}$ . Однако возможность трансформации растений экзогенной ДНК подвергалась сомнению в связи с вероятной деградацией последней под действием нуклеаз тканей растения-хозяина [15]. Для разрешения данного вопроса И. С. Образцовым и Н. М. Бабак проведена изящная работа по исследованию биологической активности гетерологичной бактериальной ДНК в тканях гороха. Стерильные семена гороха инкубировали в растворе ДНК *Baciullus subtilis SHgw*. После инкубации в ДНК семена замачивали в воде и через определенные промежутки времени выделяли тотальную ДНК и использовали для трансформации реципиентного штамма *B. subtilis trp-*. Было установлено, что ДНК сенной палочки присутствует в тканях растений в недеградированном состоянии и сохраняет потенциальную способность к трансформации. Трансформационная активность прослеживалась на протяжении 240 часов после

инкубации, что свидетельствовало о полимерности экзогенной ДНК и, следовательно, о том, что ДНКазы гороха ее не деградировали [16].

Одним из главных условий получения большого количества генетически модифицированных злаков является разработка эффективного протокола регенерации растений. Показаны перспективные пути получения направленных наследственных изменений у сельскохозяйственных растений, в том числе с использованием каллусной культуры. Т. В. Авраамовой, М. С. Бальвинской исследован подбор условий оптимизации культуральных сред и гормонов, при культивировании каллусов ячменя для реализации их регенерационного потенциала. Однако четких данных о трансформации при введении тотальной ДНК в растения в этот период не было получено. Трансформация растений с помощью выделенной ДНК стала возможной после разработки методов идентификации и выделения отдельных генов, создания векторов, обеспечивающих перенос и встраивание в генетическую систему хозяина генно-инженерных конструкций, а также селективной системы регенерации трансформированных клеток.

Конечно, эти эксперименты были еще далеки от внедрения их результатов в селекционную практику, но они являлись основой анализа организации, специфики и изменчивости генома сельскохозяйственных растений. Большое значение для реализации работ имела возможность сотрудничать с селекционерами института, иметь соответствующий селекционный материал. К середине 70-х годов без участия сотрудников лаборатории «молби» не проходила ни одна научная конференция по молекулярной биологии. Создались тесные творческие контакты с лабораторией академика А. М. Белозерского (МГУ), Институтом молекулярной биологии (лаб. Г. П. Георгиева, Москва), Научно-исследовательским институтом генетики и селекции промышленных микроорганизмов (лаб. Ю. П. Винецкого, Москва), Институтом физиологии растений (Киев), Институтом молекулярной биологии и генетики НАН Украины (Киев), Черновицким университетом. Совместная работа с Институтом генетики и цитологии (Минск) была представлена на XIV Международном генетическом конгрессе [17]. На базе лаборатории проходили заседания Международного комитета по исследованию перспектив селекции растений, оргкомитета по программе «Геном растений», международные конференции.

Если анализ кинетики реассоциации ДНК выявил структурную организацию всего генома, то анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК позволил оценить организацию и изменчивость отдельных генов. Охарактеризован полиморфизм длины рестрикционных фрагментов ДНК ячменя в локусе Ног В (Ног 2) [18]. А. Л. Кензиором выделены гены теплового шока ячменя и показан их меж- и внутривидовой полиморфизм. Реализация работ по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов не была бы возможна без скрупулезной работы А. Г. Бахтуриной по выделению ферментов рестрикции.

Исследования особенностей организации и изменчивости генома растений способствовали разработке в конце 80-х годов первых отечественных биотехнологий в растениеводстве. Л. А. Спозито разработан способ обнаружения цитоплазмы *Helianthus petiolaris* в клетках *H. annuus* путем гибридизации тотальной ДНК из раздавленных тканей со специфическим зондом, сконструированным на основе EcoRI-EcoRI-фрагмента ДНК *H. annuus* [19].

Е. В. Бойко разработана биотехнология гомеостатичности ячменя по показателям рДНК [20]. Создана и внедрена совместно с учеными Института виноградарства и виноделия имени В. Е. Таирова диагностика бактериального рака винограда [21]. К этому времени лабораторию представляет коллектив молекулярных генетиков с большим научным потенциалом, обладающий качествами, необходимыми, по словам Юрия Михайловича, для ученого: оптимизмом, фанатизмом и энтузиазмом.

Одним из главных направлений генетики является изучение структурной организации и функционирования наследственного аппарата, а также разработка приемов и методов конструирования новых генетических структур с целью создания клеток и целых организмов с заданными свойствами. Традиционные методы селекции не могут создать принципиально новые комбинации наследственной информации из-за барьеров межвидовой изоляции. Успешное их преодоление возможно с применением методов генетической инженерии растений, одним из основных элементов которых является выделение и последующее клонирование отдельных генов. Проведены работы по клонированию кДНК, синтезированной на поли(А)+мРНК из эндоспермов ячменя [22], освоена бесклеточная белоксинтезирующая система из зародышей пшеницы. С помощью трансляции *in vitro* полисом и мРНК из развивающихся зерновок ячменя получены данные о гетерогенности и сортовой специфичности гордеинов [23]. Т. Г. Вербицкой, Л. Ф. Дьяченко ведется работа по созданию геномной библиотеки ячменя рестриктазно-лигазным методом с последующим введением в клетку ДНК ячменя с помощью вектора на основе бактериофага лямбда. Однако дальнейшего развития данные работы не получили, т. к. начался новый этап в молекулярно-биологических исследованиях — эра полимеразной цепной реакции.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сиволап Ю. М. Получение хроматина и растворимого дезоксирибонуклеопротеина из тканей злаковых растений / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко // Научно-техн. бюлл. Всес. селекц.-генет. ин-та. — 1974. — № 1. — С. 67–75.
2. Сиволап Ю. М. Выделение ДНК из тканей растений и фракционирование ее при помощи гидроксипатита / Ю. М. Сиволап, А. Н. Котлов // Науч.-техн. бюллетень Всес. селекц.-генет. ин-та. — 1974. — Вып. 21. — С. 76–81.
3. Сиволап Ю. М. Особенности выделения тотальной ДНК из тканей злаковых / Ю. М. Сиволап, О. В. Богданова // Научн.-техн. бюллетень Всес. селекц.-генет. ин-та. — 1975. — Вып. 24. — С. 20–24.

4. Методы выделения и анализа высокополимерных соединений из тканей сельскохозяйственных растений : [сб. науч. тр.] / [науч. ред. Сиволап Ю. М. и др.]. — Одесса : ВСГИ, 1983. — 100 с.
5. Сиволап Ю. М. Изучение молекулярной организации генома ячменя (*Hordeum vulgare*) / Ю. М. Сиволап, Т. Г. Вербицкая // Цитология и генетика. — 1976. — Т.10, № 6. — С. 511–515.
6. Сиволап Ю. М. Выделение и анализ фракций генома ячменя / Ю. М. Сиволап, Т. Г. Вербицкая, В. П. Чуенко // Цитология и генетика. — 1979. — Т.13, № 3. — С.175–180.
7. Сиволап Ю. М. Сравнительный анализ интрамолекулярной гетерогенности ДНК 56-хромосомного тритикале и его геномных доноров / Ю. М. Сиволап, В. П. Петрашевич, И. А. Балашова // Научно-технический бюллетень Всес. селекц.-генет. ин-та. — 1983. — Вып. 2(48). — С. 33–38.
8. Сиволап Ю. М. Исследование интермолекулярной гетерогенности ДНК растений / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Т. Г. Вербицкая // Сб. : Научн. тр. Всес. селекц.-генет. ин-та. — 1976. — Вып. 13. — С.48–59.
9. Сиволап Ю. М. Некоторые особенности молекулярной структуры геномов растений / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, А. Н. Новоселов // Мол. биол. — 1977. — Т.11, № 4. — С.877– 883.
10. Сиволап Ю. М. Структурные особенности и биологическая активность ДНК, меченой радиоактивными изотопами / Ю. М. Сиволап, В. Л. Базелян // Молекулярная биология. — Киев : Наукова думка, 1980. — Вып. 26. — С. 19–23.
11. Сиволап Ю. М. Исследование специфичности компонентного состава негистоновых белков хромосом высших растений / Ю. М. Сиволап, В. В. Чарский // Цитология и генетика. — 1983. — Т.17, № 1. — С. 60–65.
12. Сиволап Ю. М. Эффект введения участков генома ржи растениям ячменя / Ю. М. Сиволап, Л. П. Хорошевская // Цитология и генетика. — 1976. — Т.10, № 4. — С. 320–325.
13. Топтиков В. А. Взаимодействие экзогенной гомологичной ДНК с изолированными клеточными ядрами из проростков кукурузы : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.03 «Молекулярная биология» / В. А. Топтиков. — Киев, 1983. — 24 с.
14. Цитогенетическое действие тотального препарата ДНК и его геномных фракций на облученные семена ячменя / О. В. Квитко, Н. А. Картель, Ю. М. Сиволап, Т. Г. Вербицкая // Молекуляр. биология. — Киев : Наукова думка, 1980. — № 25. — С. 15–17.
15. Сиволап Ю. М. Возможность генетической трансформации у высших растений / Ю. М. Сиволап, И. С. Образцов // Молекуляр. биология. — Киев : Наукова думка, 1980. — Вып. 26. — С. 3–8.
16. Сиволап Ю. М. Поглощение и особенности распределения ДНК *Bacillus subtilis* в тканях *Pisum sativum* / Ю. М. Сиволап, И. С. Образцов, Н. М. Бабак // Цитология и генетика. — 1979. — Т.13, № 4. — С.309–313.
17. Действие геномных фракций экзогенной ДНК на радиационные повреждения хромосом у ячменя / Н. А. Картель, О. В. Квитко, Ю. М. Сиволап, Н. В. Турбин // XIV Межд. генет. конгресс : Тез. докл. Часть II. — Москва, 1978. — С. 236.
18. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов ДНК ячменя в локусе Ног В (Ног 2) / Л. Ф. Дьяченко, В. П. Нецветаев, В. П. Петрашевич, А. И. Бун-



- товская // Геном ячменя и проблемы его улучшения : сб. науч. труд. — Одесса : ВСГИ, 1989. — С.19–21.
19. Пат. 1797625 Российская Федерация, к пат. 4901294/13. Способ обнаружения цитоплазмы *Helianthus petiolaris* в клетках *Helianthus annuus* / Сиволап Ю. М., Спозито Л. А. ; заявитель и патентообладатель Всесоюзный селекционно-генетический институт; заявл. 09.01.91 ; опубл. 23.02.93. Бюл. № 7.
  20. Пат. 1664846 Российская Федерация, к А.с.4400756/13. Способ определения гомеостатичности форм ярового ячменя / Сиволап Ю. М., Бойко Е. В. ; заявитель и патентообладатель Всесоюзный селекционно-генетический институт ; заявл. 30.03.88 ; опубл. : 23.07.91. Бюл. № 27.
  21. Биотехнологический метод диагностики бактериального рака / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Б. Н. Милкус [и др.] // Биотехнология. — 1981. — № 5. — С. 82–85.
  22. Дьяченко Л. Ф. Использование принципа векторной системы Окаямы — Берга для клонирования кДНК ячменя / Л. Ф. Дьяченко, Ю. М. Сиволап // Биополимеры и клетка. — 1985. — Т. 1, № 5. — С. 271–276.
  23. Тихонов П. С. Особенности биосинтеза проламинов ячменя (*Hordeum vulgare* L.) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.03 «Молекулярная биология» / П. С. Тихонов. — Киев, 1986. — 17 с.

Надійшла 08.06.2015.

UDC 575.1

**Verbitska T. G.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **DNA TECHNOLOGY IN PLANT BREEDING: FROM KINETICS OF REASSOCIATION TO GENETIC ENGINEERING**

The article highlights the major scientific achievements of the laboratory of molecular biology of the LIPBGJ in the period of formation. The study of the molecular structure of the genomes of economic agricultural plants started in the laboratory of molecular biology under the direction of Yuriy Sivolap. Reassociation kinetics, analysis of the fractions of the genome, the study of restriction fragments length polymorphism inspired the creation of DNA-based technologies for improving the breeding process. One of the research areas of the laboratory was to study the effect of exogenous DNA in plant heredity. Laboratory's research formed the basis for analysis of the organization, specificity and variability of the genome of crop plants.

УДК 575.1

**Вербицька Т. Г.****ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН:  
ВІД КІНЕТИКИ РЕАСОЦІАЦІЇ ДО ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Висвітлені основні наукові досягнення лабораторії молекулярної біології ВСГІ в період її становлення. Вивчення молекулярної структури геномів сільськогосподарських рослин було розпочато в лабораторії молекулярної біології під керівництвом Ю. М. Сиволапа. Кінетика реасоціації, аналіз фракцій геному, дослідження поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів склали основу створення ДНК-технологій для вдосконалення селекційного процесу. Одним із напрямів роботи лабораторії було вивчення впливу екзогенної ДНК на спадковість рослин. Роботи лабораторії створили основу аналізу організації, специфіки та мінливості геному сільськогосподарських рослин.

УДК 575.16:577.2:58.036.5:633.11

В. И. ФАЙТ, д. б. н., зам. дир., зав. отд.,  
И. А. БАЛАШОВА, к. б. н., вед. науч. сотруд.,  
М. В. ГАЛАЕВА, к. б. н., мл. науч. сотруд.  
СГІ–НЦСС, Одесса  
e-mail: faygen@ukr.net

## **МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОВ КАЧЕСТВЕННЫХ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ АДАПТИВНОСТИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.)**

*Обсуждается маркирование главных генов Vrn-1, Ppd-1 и QTL темпов колошения и морозостойкости. Выявлены новые ДНК-маркеры гена Vrn-D1a и микросателлитные локусы, ассоциированные с морозостойкостью растений и продолжительностью периода до колошения. Идентифицировано генотипы около 200 сортов пшеницы мягкой озимой разного эколого-географического происхождения и показаны достоверные различия частот аллелей локусов Ppd-D1, Xgwm182–5D и Xcfd7–5B, что свидетельствует о селекционной или адаптивной ценности конкретных аллелей указанных локусов для определённых условий.*

Ключевые слова: пшеница, ДНК-маркеры, гены, микросателлитные локусы, яровизация, фотопериод, морозостойкость.

**Введение.** Для озимых культур адаптация, в первую очередь связана с факторами перезимовки, в частности с реакцией на низкотемпературный стресс. Генетическое изучение морозостойкости показало, что данный признак относится к разряду количественных [1] и контролируется несколькими аддитивными генами [2], фенотипическое проявление которого зависит от действия многих составляющих. Адаптация растений к конкретным условиям может быть существенно улучшена путем манипулирования генами *Ppd*, *Vrn*, *Vrd* и *Eps*. Указанные системы генов определяют тип и темпы развития и общую продолжительность жизненного цикла, вследствие чего существенно влияют на уровень адаптивности растений к условиям осенне-зимнего, и весенне-летнего периода, а также на формирование реального урожая [3, 4]. В связи с этим возникает необходимость привлечения методов молекулярного маркирования для идентификации и отбора хозяйственно ценных рекомбинантов, несущих определенные аллели генов *Ppd*, *Vrn*, *Vrd* и *Eps* или их сочетания. Эффективность подобного подхода к решению экспериментальных задач была показана ранее на примере получения молекулярных маркеров к определенным генам, ответственным за темпы развития мягкой пшеницы [5, 6].

В то же время темпы колошения, как и морозостойкость, являются классическим количественным признаком, различия которого контролируются полигенными системами, большинство эффектов их отдельных локусов минорные и не идентифицируются по качественным признакам. Вследствие этого для общего генетического анализа темпов колошения, как и морозостойкости, целесообразно применять методы количественной генетики, в частности идентификацию QTL. Развитие методов молекулярно-генетического анализа показало широкие возможности выявления ДНК-маркеров QTL морозостойкости [7, 8] и темпов колошения [9, 10].

В связи с вышеизложенным, цель настоящей работы — выявление молекулярных маркеров сцепленных с генами *Vrn* и *Ppd*, отвечающих за чувствительность к яровизации и фотопериоду, а также QTL продолжительности периода до колошения и морозостойкости пшеницы.

**Материалы и методы.** Исследования проводили в 2000–2014 гг. В качестве исходного материала для маркирования генов *Vrn-1*, *Ppd-1*, QTL продолжительности периода до колошения и морозостойкости использовали: почти изогенные по *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* линии сортов Мироновская 808, Одесская 16, Скороспелка 36, Triple Dirk C; нулли-тетрасомные (5-я группа хромосом) линии сорта Chinese Spring; замещенные по 2-й группе хромосом линии сорта Mercia и по 2D хромосоме линии сортов Avalon, Norman, Rendezvous, Brigant, Brimstone; расщепляющиеся популяции от скрещивания различающихся по наличию/отсутствию определенного гена темпов развития ( $F_2$  — Мироновская 808 x Мироновская 808/*Vrn-D1*;  $F_2$  и  $F_3$  — Одесская 16 x Avalon/2DCiano-67) или по продолжительности периода до колошения ( $F_2$  — Омская озимая/Nambu-Комуги), или уровню морозостойкости ( $F_2$  — Обрий/Прогресс, Эритроспермум 2917/Одесская 132, Альбидум 114/Одесская 132, Лузановка одесская/Одесская красноколосая) генотипов; рекомбинантно-инбредные линии (Mercia // Mercia/2D Ciano 67 и Лузановка одесская/Одесская красноколосая), а также яровые и озимые сорта разного эколого-географического происхождения.

Анализ молекулярно-генетического полиморфизма проводили с помощью различных модификаций поли- и монолокусной ПЦР: RAPD, ISSR, SSR, STS. Экстрагировали ДНК из проростков или зерен методом СТАВ [11]. Амплификацию осуществляли на приборе Терцик («ДНК-технология», Россия). Продукты амплификации фракционировали в 2 %-м агарозном геле с окрашиванием Et.Br и в 10–12 %-м полиакриламидном геле. Визуализацию продуктов амплификации в ПААГ проводили путем их окрашивания 0,012 М  $AgNO_3$ . Молекулярную массу продуктов амплификации определяли относительно маркеров pUC18/MspI с помощью компьютерной программы «Image Master 1D Elite» (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

В зависимости от задач эксперимента семена изучаемых генотипов высевали осенью на опытном поле отдела общей и молекулярной генети-

ки СГІ — НЦСС на ділянках 3 м<sup>2</sup> по 500 всхожих зерен на м<sup>2</sup> или на одно-рядкових ділянках довжиною 1 м по 20 рослин в ряду з площею живлення 30х5 см<sup>2</sup>, или после пророщивання и яровизації одределеної продовжителюности проростки висаживали в 5-літрові судини з ґрунтом на вегетационній площадці или в світлїх камерах фітотрона. Оценку уровня фотоперіодической чутливості образцїв осуществляли при сравненні дати колошення изучаемих генотипов в условиях удлиненого и укороченого фотоперіода. Для ідентифікації генотипов сортів, ліній по генам *Vrn* и *Ppd* іспользовали гібридологический анализ [12, 13].

Для одределення продовжителюности періода до колошення (ПВК) во время вегетации у одредельних рослин в условиях фітотрона и при высадке проростков на вегетационній площадці отмечали дату колошення з іспользованием пергаментних етикеток. В поле дату колошення отмечали при наличии на ділянці 75 % выколосившихся рослин. Морозостойкость (75–90 рослин каждого генотипа) оценивали на стадії проростков [14, 15] и рослин в фазі кущення [16]. Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятым методикам [17].

Метеорологические условия за період проведения исследований включали весь спектр лимитирующих факторов среды, распространённых в Степи Украины. Это позволило объективно оценить исходный материал по усреднённой адаптивности к данным условиям.

**Результаты и обсуждение.** Эффективность поиска маркеров, сцепленных с генами, контролируемыми качественными или количественными признаками, во многом определяется іспользуемым исходным генетическим материалом. Наличие рекомбинантно-инбредных, замещенных, почти изогенных ліній и модельных F<sub>2</sub> популяций позволило оценить возможности молекулярного маркирования генов *Vrn-D1a* и *Ppd-D1a*, а также QTL морозостойкости и темпов колошення.

**Маркирование гена *Vrn-D1*.** Для выявления маркеров генов *Vrn-1* проводили анализ ДНК изогенных по *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* ліній чотырех озимых сортов Triple Dirk, Одесская 16, Мироновская 808, Скоропелка 3б, что позволило на первых этапах поиска проводить скрининг детектируемых полиморфных ампликонов. Іспользуемый исходный генетический материал отличается крайне низким уровнем полиморфизма при практически полном восстановлении генофона рекуррентного родителя у изогенных ліній. Применяя различные модификации поли-и монолокусной ПЦР, в общей сложности, детектировано более 2 тыс. продуктов амплификации, из которых только 8 являлись полиморфными [18]. Так, при проведении RAPD-ПЦР с праймером p.116 [19] полиморфный ампликон 657 п. н. обнаружен у изогенных ліній сортів Triple Dirk, Одесская 16, Мироновская 808, Скоропелка 3б доминантных по *Vrn-D1*. Также у данных ліній обнаружен полиморфный участок ДНК при проведении ISSR-ПЦР с праймером (AGC)<sub>6</sub>G. Полиморфизм выражался в отсуствии продукта 850 п. н., что обозначается, как null-аллель. Для оцен-

ки локализации потенциальных маркеров в 5D хромосоме использовали нулли-тетрасомные линии сорта Chinese Spring, который моногенно доминантен по гену *Vrn-D1*. Поскольку не исключается возможность преобразования доминантного маркера в более совершенный кодоминантный, RAPD-фрагмент был секвенирован, проведен дизайн праймеров, что позволило предложить кодоминантный ПЦР-тест, при проведении которого детектируются фрагменты, идентифицирующие рецессивный и доминантный аллели указанного гена.

Для установления сцепления доминантного и кодоминантного маркеров с геном проводили анализ растений расщепляющейся популяции  $F_2$  Мироновская 808/Мироновская 808-*Vrn-D1*, сопоставляя фенотип и данные RAPD- и STS-ПЦР (рис. 1). Анализ полученных результатов свидетельствовал, что расстояние между STS-маркером и геном составляет 1 сМ. Применение ISSR-маркера, которым являлся null-аллель 850 п. н., имеет свои особенности и ограничения, что было установлено благодаря наличию разнообразного генетического материала, а также данным по использованию RAPD- и STS-маркеров. Показано, что в гибридной популяции null-аллель детектируется только у доминантных гомозигот, а при проведении анализа сортов различной селекции маркируются только моногенно доминантные генотипы, в данном случае моногенно доминантные по *Vrn-D1a*. В результате проведенных исследований предложено несколько ДНК-маркеров, применение которых способствует объективной оценке аллельного состояния гена *Vrn-D1* [18].

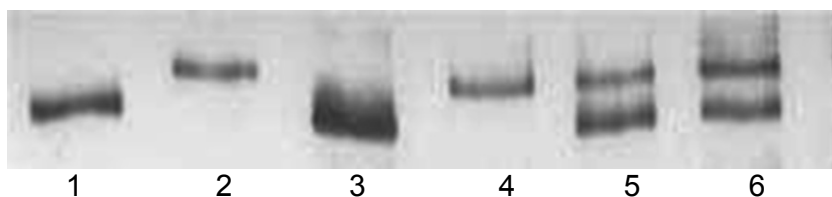


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов STS-ПЦР ДНК растений популяции  $F_2$  Мироновская 808 / Мироновская 808-*Vrn-D1*: 1, 3 — яровые гомозиготы (раннее колошение); 2, 4 — озимые гомозиготы (отсутствие колошения); 5, 6 — гетерозиготы (позднее колошение)

**Маркирование гена *Ppd-D1a*.** Апробированная схема поиска маркеров, сцепленных с конкретным геном, применялась и при маркировании гена *Ppd-D1a*, расположенного на 2D хромосоме. При проведении ISSR-ПЦР с праймером (AG)9C у замещенных по 2D хромосоме линий сортов Avalon, Brigant, Norman, Rendezvous и сорта Ciano 67 выявлен null-аллель 350 п. н. Такого рода маркер может детектироваться у моногенно доминантных генотипов. Анализ ДНК набора РИЛ Mercia x Mercia/2D Ciano 67, охарактеризованных по фоточувствительности, показал отсутствие продукта 350 п. н. у слабофоточувствительных линий. Тесное сцепление маркера с геном — 1,9 сМ установлено при анали-

зе популяції  $F_2$  Одеськая 16 // Avalon/2D Ciano 67. Об'єктивність отбору із популяції  $F_2$  домінують гомозигот по вказаному маркеру підтверджена при аналізі покоління  $F_3$  [20]. Тем не менше результати ідентифікації *Ppd*-генотипів сортів озимої пшениці путем гібридологічного і ISSR аналізу совпадали тільки в 44 % випадків. Ефективність ідентифікації гена *Ppd-D1a* по ISSR-маркеру обмежена групою сортів, маючих загальне походження. Так, у замещенних по 2D хромосомі ліній, набору РИЛ і гібридної популяції донором гена *Ppd-D1a* являвся мексиканський яровий сорт Ciano 67. У озимих сортів української селекції null-аллель 350 п. н. детектований виключно у сортів, в родословній яких присутній Red River 68. В свою чергу загальним родителем сортів Red River 68 (США) і Ciano 67 (Мексика) являється мексиканський сорт Sonora 64 (генотип *Ppd-D1a Ppd-B1a*). Швидше за все у ряду мексиканських ярових сортів в зоні локалізації гена *Ppd-D1* існує мутація в одному з ділянок праймірування (AG)9C, яка виявляється при проведенні ISSR-ПЦР. Данна мутація успадковалася спільно з ділянкою хромосоми і домінують *Ppd-D1a*, в тому числі при створенні сорту Red River 68 і далі групою українських озимих сортів (рис. 2).

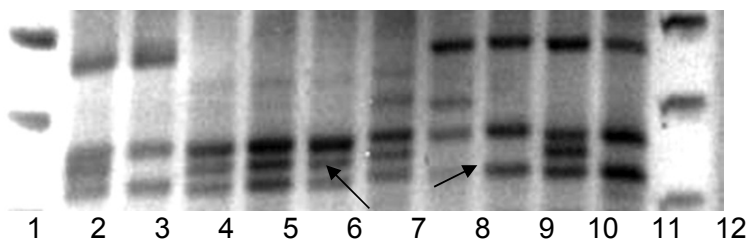


Рис. 2. Електрофореграма ISSR-ПЦР ДНК сортів озимої м'якої пшениці з використанням праймера (AG)9C: 2 — Безостая 1; 3 — Обрий; 4 — Скороспелка 3б; 5 — Лада одеська; 6 — Лузановка одеська; 7 — Федоровка; 8 — Тира; 9 — Знахідка; 10 — Mercia 2D; Ciano 67; 1, 12 — маркер мол. ваги pUC-19/Msp1

Внаслідок Beales et al. [21] була виявлена делеція в промоторі домінують гена *Ppd-D1* і розроблені аллель-специфічні ПЦР-тести для ідентифікації *Ppd-D1a* і *Ppd-D1b* генотипів. При проведенні ДНК-аналізу озимих і ярових сортів продукт ампліфікації 288 п. н., характерний для аллеля *Ppd-D1a*, був виявлений у 122 (70,5±3,5 %) з 171 зразка (27,2±3,4 %) — 414 п. н., що свідчить про наявність рецесивного аллеля *Ppd-D1b* [22]. В вибірці ярових сортів частоти генотипів *Ppd-D1a* і *Ppd-D1b* не відрізнялися (оба по 50,0±11,2 %). У озимих сортів частота аллеля *Ppd-D1a* (77,5±3,7 %) значно вище такої *Ppd-D1b* (22,5±3,7 %). Отже, слабка реакція на фотоперіод, обумовлена наявністю в генотипі гена *Ppd-D1a*, є одним з необхідних умов для реалізації потенціалу урожайності озимих сортів, які частіше за все вирощують в більш південних районах

с относительно мягкой зимой и укороченным естественным днем. Яровую пшеницу возделывают, как правило, в северных районах с продолжительным естественным летним днем, и генотипы *Ppd-D1a* в данных условиях не обладают преимуществом по урожаю зерна [23].

Превышение частоты генотипа *Ppd-D1a* по сравнению с таковой генотипа *Ppd-D1b* отмечено и в выборках озимых сортов разных регионов (табл. 1), за исключением сортов Востока Украины (Донецк, Луганск, Харьков), где частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* равны ( $50,0 \pm 11,8\%$ ). При этом генотип *Ppd-D1b* на Севере (Белая Церковь, Киев, Мироновка) и Юге (Одесса) Украины идентифицирован только у сортов, районированных до 60–70 годов XX столетия. У сортов более позднего периода селекции выявлен генотип *Ppd-D1a*. Достоверные различия частот *Ppd-D1a* или *Ppd-D1b* генотипов у выборках сортов разных регионов и их отличие от таковых общего набора свидетельствуют о селекционной ценности указанных генотипов для определённых условий выращивания.

Таблица 1

Частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* в выборках сортов разных регионов

Регион	Всего		<i>Ppd-D1a</i>		<i>Ppd-D1b</i>	
	n	$p \pm S_p, \%$	n	$p \pm S_p, \%$	n	$p \pm S_p, \%$
Общая выборка	129	100,0	100	$77,5 \pm 3,7$	29	$22,5 \pm 3,7$
Восток Украины	18	100,0	9	$50,0 \pm 11,8$	9	$50,0 \pm 11,8$
Юг Украины	64	100,0	60	$93,7 \pm 3,1$	4	$6,3 \pm 3,1$
Север Украины	7	100,0	6	$85,7 \pm 13,2$	1	$14,3 \pm 13,2$
Западная Сибирь	7	100,0	5	$71,4 \pm 17,1$	2	$28,6 \pm 17,1$
Северный Кавказ	15	100,0	15	$100,0 \pm 5,6$	0	$0,0 \pm 5,6$

### Маркирование QTL продолжительности периода до колошения.

Маркирование QTL принципиально не отличается от такового генов качественных признаков. Задача состоит в выявлении различий аллельного состояния микросателлитного локуса, которое ассоциируется с различиями по фенотипическому проявлению признака у исследуемого материала. Для выявления QTL темпов колошения проводили SSR-ПЦР по 25 микросателлитным локусам более рано (Nambu Komugi — 9, Знахидка одесская — 10, Скороспелка 3б — 11, Triple Dirk С — 13 мая) и более поздно колосящихся (Мироновская 808–20, Ульяновка — 21, Л326–25, Омская озимая — 26 мая) сортов из рабочей коллекции отдела генетики СГІ–НЦСС. Первичный скрининг позволил рассматривать в качестве потенциальных маркеров QTL темпов колошения микросателлитные локусы *Xgwm512–2AS*, *Xgwm429–2B* и *Xbarc17–1A*. Сопоставление данных маркерного анализа ДНК растений популяции  $F_2$  Омская озимая/Nambu Komugi (рис. 3) с продолжительностью периода до колошения свидетельствовало, что альтернативные аллели локусов *Xgwm512* и *Xgwm429* обуславливали 10,4 и 8,9 % различий по указанному признаку соответственно. Аналогичный анализ по локусу *Xbarc17* достоверных различий не выявил [24].



В дальнейшем для выявления QTL темпов колошения проводили анализ ДНК по микросателлитным локусам, картированным на хромосомах 5-й гомеологической группы, разным по срокам колошения 53 сортов озимого типа развития. Наиболее интересные результаты получены при проведении SSR-ПЦП по локусу *Xbarc286–5D*. В изученной выборке сортов выявлено два аллеля 290 и 272 п. н. У сортов, колосившихся 9–15 мая, за единичным исключением, детектирован аллель 290 п. н., а колосившихся 21–26 мая — аллель 272 п. н. В группе сортов, колосившихся 16–20 мая, соотношение аллелей 290 и 272 п. н. составляло 8 к 10 соответственно. В среднем за три года изучения сорта-носители аллеля 290 п. н. локуса *Xbarc286* колосились на 14,3, а аллеля 272 п. н. — на 20,1 суток (отсчет от даты 1 мая). Данное соотношение по продолжительности периода до колошения между двумя группами сортов сохранялось все три года изучения.

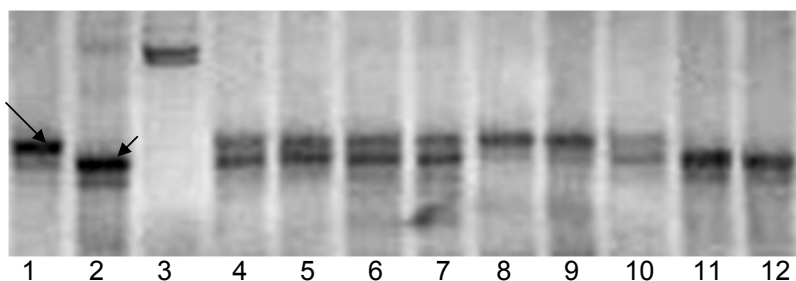


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов SSR-ПЦП по локусу *Xgwm429* ДНК растений популяции  $F_2$  комбинации скрещивания Омская озимая / Nambu-Komugi: 1 — Nambu Komugi; 2 — Омская озимая; 3 — маркер мол. веса pUC-19/Msp1; 4, 5, 6, 7, 10 — гетерозиготы по маркерному локусу; 8, 9 — ДНК рано колосющихся растений  $F_2$ ; 11, 12 — ДНК поздно колосющихся растений  $F_2$

Маркерный анализ по локусу *Xbarc286* следует проводить в комплексе с маркированием гена *Ppd-D1*, поскольку сочетание аллелей *Ppd-D1b/272* п. н. способствует увеличению периода до колошения (позднеспелости), а *Ppd-D1a/290* п. н. сокращению данного показателя (скороспелости). Присутствие в генотипе сорта аллелей *Ppd-D1a/272* п. н. характерно преимущественно для среднеспелых и значительно реже поздно колосющихся сортов [25].

Преимущественное распространение аллеля 290 п. н. у сортов с ранними, а аллеля 272 п. н. с поздними сроками колошения позволяет рекомендовать данный микросателлитный маркер для прогнозирования продолжительности периода до колошения у озимого сортимента. У наиболее рано колосющихся сортов присутствуют «ранние» аллели локусов *Xgwm512* и *Xgwm429*. В частности, у сорта Nambu Komugi, который является наиболее раннеспелым в исследованном наборе, детектированы все три «ранних» аллеля микросателлитных локусов, которые рассматривались в данной работе как маркеры QTL темпов колошения.

**Выявление микросателлитных локусов, ассоциированных с морозостойкостью  $F_2$  популяций.** Оценивали морозостойкость  $F_2$  популяций Обрий/Прогресс, Эритроспермум 2917/Одесская 132, Альбидум 114/Одесская 132, Лузановка одесская/Одесская красноколосая и их родительские формы. Уровень морозостойкости проростков  $F_2$  популяции определяется уровнем морозостойкости родительских компонентов и продолжительностью закаливания [26]. Морозостойкость проростков при  $-12^\circ\text{C}$  изученных родительских сортов при закаливании 12 суток варьировала от 22 (Эритроспермум 2917) до 67 % (Лузановка одесская), а при 24 сутках — от 13 (Обрий) до 74 % (Лузановка одесская). При этом из четырех  $F_2$  популяций только у одной Лузановка одесская/Одесская красноколосая выявлены достоверные различия между родительскими формами независимо от продолжительности закаливания (38 и 31 % при 12 и 24 сутках) и отсутствие реакции родительских сортов (67 и 74 % соответственно у сорта Лузановка одесская; 29 и 43 % соответственно у сорта Одесская красноколосая) и растений  $F_2$  (44 и 40 % соответственно) на продолжительность закаливания.

Таблица 2

Морозостойкость групп растений популяции  $F_2$   
Лузановка одесская/Одесская красноколосая — носителей альтернативных аллелей локусов *Xbarc 117–5A* и *Xgwm 156–5A* при продолжительности закаливания 12 и 24 суток,  
% живых растений

Локус	Гено-тип, п. н.	12 суток			24 суток		
		живых	всего	%	живых	всего	%
<i>Xbarc 117–5A</i>	224	12	36	33	26	47	55
	230	25	45	56	9	29	31
НСР <sub>0,05</sub>				22			23
<i>Xgwm 156–5A</i>	311	9	29	31	15	39	38
	290	23	39	59	13	39	33
НСР <sub>0,05</sub>				23			-

При использовании праймеров к 15 МС локусам выявлено полиморфизм ДНК сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая по пяти из них: *Xbarc 117–5A*, *Xbarc 330–5A*, *Xgwm 156–5A*, *Xbarc 319–5A* и *Xgwm 182–5D*. Сопоставление двух групп растений  $F_2$  — носителей альтернативных аллелей по каждому из пяти полиморфных локусов позволило выявить достоверные аллельные различия по морозостойкости для двух локусов *Xbarc 117–5A* и *Xgwm 156–5A* (табл. 2).

Продолжительность первой фазы закаливания 12 суток способствовала формированию достоверно большей морозостойкости растений  $F_2$ -носителей аллеля 230 п. н. локуса *Xbarc 117–5A* или аллеля 290 п. н. локуса *Xgwm 156–5A*, характерных для сорта Одесская красноколосая. Увеличение продолжительности первой фазы закаливания с 12 до 24

суток приводило к смене рангов по морозостойкости генотипов-носителей альтернативных аллелей каждого из локусов. Так, морозостойкость растений с аллелем 224 п. н. локуса *Xbarc 117–5A* от сорта Лузановка одесская в данном варианте была существенно выше (на 24 %) морозостойкости растений с аллелем 230 п. н. сорта Одесская красноколосая. Различия двух групп растений  $F_2$  — носителей альтернативных аллелей локуса *Xgwm 156–5A* при продолжительности закаливания 24 суток оказались недостоверными.

**Выявление микросателлитных локусов, ассоциированных с морозостойкостью рекомбинантно-инбредных линий.** Вследствие достижения и сохранения гомозиготности РИЛ, испытания можно проводить в разные годы и при разных условиях. Исходя из этого, для выявления новых ассоциированных с морозостойкостью МС-локусов использовали РИЛ  $F_7$  Лузановка одесская/Одесская красноколосая [27, 28]. Анализ по 40 микросателлитным локусам, локализованным на хромосомах пятой гомеологической группы, позволил выявить полиморфизм по 11 из них: *Xbarc319–5A*, *Xbarc330–5A*, *Xgwm156–5A*, *Xwmc415–5B*, *Xbarc4–5B*, *Xbarc88–5B*, *Xbarc89–5B*, *Xcfd7–5B*, *Xgpw3191–5B*, *Xgwm182–5D*, *Xcfd8–5D* между сортами Лузановка одесская и Одесская красноколосая. По указанным полиморфным локусам идентифицирована 101 РИЛ. Соотношение расщепления по аллелям каждого локуса достоверно соответствовало теоретически ожидаемому ( $\chi^2$  равен от 0,13 до 4,60, при  $\chi^2_{0,05}=5,99$  для  $df=2$ ), что свидетельствует о достаточно полном сохранении генетического разнообразия в процессе создания РИЛ.

Сопоставление двух групп линий-носителей альтернативных аллелей по каждому из полиморфных локусов хромосом пятой группы позволило выявить достоверное влияние аллельных различий локусов *Xbarc330–5A*, *Xcfd7–5B*, *Xwmc415–5B*, *Xgpw3191–5B*, *Xgwm182–5D*, *Xcfd8–5D* на морозостойкость (табл. 3).

Аллельные различия локуса *Xbarc330–5A* определяли 12 % фенотипического разнообразия популяции РИЛ Лузановка одесская/Одесская красноколосая по морозостойкости растений в фазе кущения только в марте. Морозостойкость линий с аллелем 104 п. н. от морозостойкой родительской формы Лузановка одесская была большей таковой линий с аллелем 106 п. н. от сорта Одесская красноколосая.

Линии с присутствием соответствующего аллеля локуса *Xcfd7–5B*, *Xwmc415–5B* и *Xgpw3191–5B* от сорта Лузановка одесская характеризовались большей морозостойкостью проростков в отличие от линий с присутствием аллелей от сорта Одесская красноколосая. При этом аллельные различия по локусам *Xcfd7–5B* и *Xgpw3191–5B* достоверны во всех трех опытах по промораживанию проростков, а различия по морозостойкости сцепленного с ними локуса *Xwmc415–5B* выявлены только в одном из трех вариантов опыта.

Таблица 3

Морозостойкость проростков ( $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и раскутившихся растений ( $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) групп РИЛ  $F_7$  Лузановка одесская/Одесская красноколосая, различающихся по аллелям микросателлитных локусов, % живых растений

Локус	Аллель	Проростки			Кущение		
		1	2	3	февраль 2011	март 2011	январь 2012
<i>Xbarc330–5A</i>	104 п. н. Л*	72	80	86	70	72	79
	106 п. н. О*	76	83	88	69	60	78
НСР <sub>0,05</sub>		–	–	–	–	12	–
<i>Xcfd7–5B</i>	194 п. н. Л	78	86	90	66	60	76
	204 п. н. О	67	74	81	73	73	82
НСР <sub>0,05</sub>		9	9	8	–	11	–
<i>Xwmc415–5B</i>	174 п. н. Л	77	87	88	63	63	77
	172 п. н. О	70	76	84	75	69	80
НСР <sub>0,05</sub>		–	9	–	10	–	–
<i>Xgpw3191–5B</i>	178 п. н. Л	79	89	91	64	62	78
	236 п. н. О	67	72	81	75	70	79
НСР <sub>0,05</sub>		8	9	7	10	–	–
<i>Xgwm182–5D</i>	165 п. н. Л	79	86	92	69	69	77
	162 п. н. О	68	76	82	68	62	80
НСР <sub>0,05</sub>		9	9	7	–	–	–
<i>Xcfd8–5D</i>	160 п. н. Л	77	86	89	71	67	77
	162 п. н. О	70	76	84	66	65	80
НСР <sub>0,05</sub>		–	10	–	–	–	–

Примечание. 104 п. н. Л\* — аллель размером 104 п. н. от сорта Лузановка одесская; 106 п. н. О\* — аллель размером 106 п. н. от сорта Одесская красноколосая и так далее.

В то же время при промораживании раскутившихся растений при  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  большей морозостойкостью по всем трем сцепленным локусам хромосомы 5В характеризовались линии-носители аллелей сорта Одесская красноколосая. Вместе с тем достоверное влияние аллельных различий на морозостойкость в фазе кущения РИЛ в феврале 2011 года отмечено по локусам *Xwmc415–5B* и *Xgpw3191–5B*, а по локусу *Xcfd7–5B* — в марте 2011 года. Смена рангов генотипов-носителей альтернативных аллелей одного локуса при промораживании проростков и растений в фазе кущения была отмечена ранее [29] и, видимо, объяснима изменениями условий закаливания растений.

Аллельные различия по локусу *Xgwm182–5D* обуславливали 10–11 % различий по морозостойкости проростков двух групп РИЛ Лузановка одесская/Одесская красноколосая — носителей альтернативных аллелей данного локуса. Присутствие аллеля 165 п. н. от сорта Лузанов-

ка одесская способствовало достоверному увеличению морозостойкости проростков и, в отличие от локусов хромосомы 5В, рассмотренных выше, не существенному, но увеличению морозостойкости растений в фазе кущения. По локусу *Xcfd8–5D* наблюдали подобную тенденцию, но различия были достоверными только в одном из опытов по промораживанию проростков.

**Частоты аллелей локусов *Xcfd7–5B* и *Xgwm182–5D*.** Разный уровень морозостойкости линий  $F_7$  Лузановка одесская/Одесская красноколосая свидетельствовал о неодинаковой селекционной ценности конкретных аллелей микросателлитных локусов *Xcfd7–5B*, *Xwmc415–5B*, *Xgprw3191–5B* и *Xgwm182–5D* по морозостойкости. Вместе с тем селекционная ценность конкретных аллелей для определенных условий может быть получена на основе сопоставления частоты встречаемости в выборках сортов разного географического происхождения.

При микросателлитном анализе у сортов изученной выборки (163 образца) по локусу *Xcfd7–5B* выявлено два аллеля: аллель размером 194 п. н. и null-аллель (отсутствие продукта амплификации) [30]. По микросателлитному локусу *Xgwm182–5D* (выборка 180 сортов) идентифицировано 5 аллелей размером 162, 165, 167, 169 и 174 п. н. [31]. Большинство сортов 85,9 и 87,1 % по локусу *Xcfd7–5B* и *Xgwm182–5D*, соответственно, были линейными с присутствием одного из вышеуказанных аллелей каждого из локусов. Вместе с тем 14,1 % сортов по локусу *Xcfd7–5B* и 12,9 % по локусу *Xgwm182–5D* оказались неоднородными. Каждый из них состоял из двух генотипов с разным их соотношением.

Частота аллеля размером 194 п. н. локуса *Xcfd7–5B* в общей выборке сортов составляла 29,3 %, что почти в 2,5 раза меньше таковой null-аллеля (70,7 %). Аналогичное соотношение частот двух указанных аллелей сохранялось и в выборках сортов разных регионов Украины и России. Вместе с тем относительные различия частот в разных регионах несколько изменялись от 35,6±12,73 % в выборке сортов Севера Украины до 66,2±14,71 — Северного Кавказа. Преимущественное распространение null-аллеля локуса *Xcfd7–5B* в выборке сортов пшеницы озимой Украины и России может свидетельствовать о его селекционной и/или адаптивной ценности для условий указанных стран. В то же время у сортов Юга Украины (в основном СГИ–НЦСС), районированных или внесенных в Государственный реестр до 1996 года, различия частот аллелей локуса *Xcfd7–5B* оказались несущественными (49,8±7,6 и 50,2±7,6 %, соответственно 194 п. н. и null-аллеля). В выборке сортов, районированных или внесенных в Реестр после 1996 года и до настоящего времени, частота null-аллеля локуса *Xcfd7–5B* увеличилась на 37,8 % в сравнении с таковой предыдущего периода селекции, а аллеля 194 п. н. соответственно уменьшилась до 12 % (различия достоверны,  $P < 0,01$ ). Следовательно, селекционный процесс на Юге Украины в последние десятилетия направлен на отбор генотипов с присутствием null-аллеля локуса *Xcfd7–5B*.

По локусу *Xgwm 182–5D* в общей выборке сортов и выборках сортов отдельных регионов с большей частотой от 83 до 53,6 % встречался аллель 165 п. н. (рис. 4), что достоверно выше частот всех других аллелей на 38–83 %, за исключением выборки сортов Поволжья и Западной Сибири. В последнем случае частота аллеля 165 п. н. (54 %) достоверно не отличалась от таковой аллеля 169 п. н. (39 %). Вместе с тем частота аллеля 165 п. н. на севере Украины достоверно превышала на 25 % аналогичный показатель на Юге Украины ( $P < 0,01$ ). Различия частот аллеля 165 п. н. в выборках сортов указанных двух регионов с таковой выборки Поволжья и Западной Сибири, Северного Кавказа и двух последних между собой были несущественными. Аллель 165 п. н. выявлен практически у всех сортов Юга Украины (СГИ–НЦСС) I–V сортосмен (1912–1975). У сортов VI–VII сортосмен (1976–2012) идентифицированы новые аллели локуса *Xgwm 182–5D* с молекулярной массой 162, 167 и 174 п. н., что обусловлено привлечением в селекционный процесс сортов США, Мексики, Европы. Частота аллеля 174 п. н. на Юге Украины составляла 18 %, с тенденцией к снижению на Севере Украины и Северном Кавказе. Аллель 162 п. н. с частотой 20 % выявлен исключительно у сортов Юга Украины, что может свидетельствовать о селекционной ценности указанного аллеля для условий данного региона с точки зрения получения потенциально-го урожая. В то же время аллель 162 п. н. или тесно сцепленный с ним ген, видимо, негативно влияет на уровень морозостойкости растений пшеницы. Слабоморозостойкие сорта Обрий, Одесская красноколо-сая, Ольвия и другие унаследовали аллель 162 п. н. от ярового сорта Red River 68 (США).

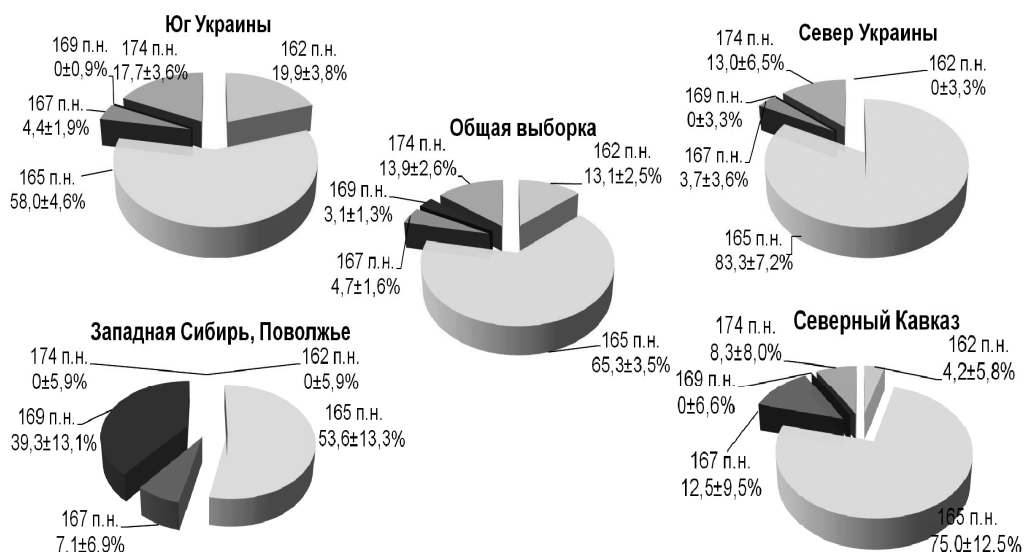


Рис. 4. Частоты аллелей локуса *Xgwm 182–5D* в выборках сортов разных регионов

В отличие от аллеля 162 п. н., аллель 167 п. н. детектирован у сортов разных регионов. Однако его частота оказалась низкой (около 5 % в общей выборке). Аллель 169 п. н. идентифицирован лишь у линейных и неоднородных сортов Западной Сибири и Поволжья. В данной выборке не выявлено ни одного сорта — носителя аллелей 162 или 174 п. н.

**Выводы.** Использование нескольких методов, основанных на принципах ПЦР, позволило выявить новые ДНК-маркеры к локусу *Vrn-D1a* и микросателлитные локусы *Xbarc 117–5A*, *Xgwm 156–5A*, *Xwmc415–5B*, *Xgprw3191–5B*, *Xcfd7–5B*, *Xgwm182–5D*, ассоциированные с морозостойкостью проростков, *Xwmc415–5B* и *Xgprw3191–5B* — с морозостойкостью раскустившихся растений в середине зимы, *Xbarc330–5A* и *Xcfd7–5B* — с морозостойкостью раскустившихся растений в конце зимы и локусы *Xgwm512*, *Xgwm429* — с продолжительностью периода до колошения.

Идентифицированы генотипы около 200 сортов пшеницы мягкой озимой разного географического происхождения и периодов создания по аллелям локусов *Ppd-D1*, *Xcfd7–5B* и *Xgwm182–5D*. Показаны достоверные различия частот конкретных аллелей. Преимущественное распространение в изученной выборке сортов с присутствием аллеля *Ppd-D1a*, 165 п. н. локуса *Xgwm182–5D* и null-аллеля локуса *Xcfd7–5B* обусловлено селекционной ценностью таких генотипов для условий Юга Украины. Выявленные маркерные локусы рекомендуется использовать вместе с другими методами при отборе из гибридных популяций более морозостойких и скороспелых генотипов на ранних этапах селекции.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sutka J., Galiba G., Veisz O., Snape J. W. Genetic analysis of frost resistance and its contribution to development of frost resistant cereal varieties — A review / J. Sutka, G. Galiba, O. Veisz, J. W. Snape // Plant Breeding and Seed Science. — 1997. — V. 41, № 2. — P. 39–50.
2. Мусич В. Н. Комбинационная способность и типы действия генов у сортов Озимой мягкой пшеницы по признаку морозостойкости / В. Н. Мусич, В. Ф. Герасименко // Генетика. — 1984. — Т. 20, № 12. — С. 2031–2034.
3. Стельмах А. Ф. Эффекты локусов *Vrn* мягкой пшеницы по агрономическим признакам в различных условиях / А. Ф. Стельмах, В. И. Файт // Цитология и генетика. — 1995. — Т. 29, № 4. — С. 54–61.
4. Worland A. J., Börner A., Korzun V., Li W. M., Petrović S., Sayers E. J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats / A. J. Worland, A. Börner, V. Korzun, W. M. Li [et al.] // Euphytica. — 1998. — V. 100, 1–3. — P. 385–394.
5. Хлёткина Е. К. Использование RAPD– и STS–анализа для маркирования генов пятой гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы / Е. К. Хлёткина, Е. А. Салина, И. Н. Леонова // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 10. — С. 1349–1357.
6. Lukman R. Molecular mapping of major genes influencing flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) / R. Lukman Diss. : München, Techn University. — 2003. — 102 p.

7. Toth B. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat / B. Toth, G. Galiba, E. Feher, J. Sutka, J. W. Snape // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — V. 107. — P. 509–514.
8. Vágújfalvi A. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A / A. Vágújfalvi, G. Galiba, L. Cattivelli, J. Dubkovsky // *Mol. Genet. Genomics.* — 2003. — V. 269. — P. 60–67.
9. Kuchel H. Identification of genetic loci associated with ear-emergence in bread wheat / H. Kuchel, G. Hollamby, P. Langridge, H. K. Williams, S. P. Jefferies // *TAG.* — 2006. — V. 111, № 6. — P. 1103–1112.
10. Hanocq E. Detection and mapping of QTL for earliness components in a bread wheat recombinant inbred lines population / E. Hanocq, M. Niarquin, E. Heumez, M. Rousset, J. Le Gouis // *TAG.* — 2004. — V. 110, № 1. — P. 106–115.
11. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграрна наука, 1998. — С. 34–40.
12. Стельмах А. Ф. Каталог сортов яровой мягкой пшеницы по генотипам системы локусов *Vrn* (чувствительность к яровизации) / А. Ф. Стельмах, В. И. Авсенин, А. Н. Воронин. — Изд. 3, доп. — Одесса : ВСГИ, 1987. — 111 с.
13. Файт В. І. Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами Фотоперіодичної чутливості / В. І. Файт, В. Р. Федорова // *Зб. наук. праць СГІ–НАЦ НАІС.* — Одеса, 2007. — Вип. 9(49). — С. 9–21.
14. Мусич В. Н. Об оценке озимых зерновых культур на морозостойкость в зоне Юго-западного селекцентра методом прямого промораживания / В. Н. Мусич // *Экспресс-информация Юго-западного селекцентра.* — Одесса, 1976. — Вып. 1. — С. 157–164.
15. Гаврилов С. В. Підвищення ефективності оцінки озимої пшениці на морозостійкість в умовах штучного клімату / С. В. Гаврилов // *Зб. наук. праць СГІ.* — Одеса, 2006. — Вип. 8(48). — С. 67–73.
16. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах півдня України : метод. рекомендації / [Феоктістов П. О., Гаврилов С. В., Ляшок А. К., І. П. Григорюк, М. Д. Мельничук]. — К. : Видавничий центр НАУ, 2006. — 36 с.
17. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий — М. : Колос, 1973. — 327 с.
18. Балашова И. А., Календарь Р. Н., Файт В. И., Сиволап Ю. М. Создание ДНК маркера к локусу *Vrn-D1* мягкой пшеницы / И. А. Балашова, Р. Н. Календарь, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // *Биотехнология.* — 2002. — № 2. — С. 30–36.
19. Использование *RAPD*-метода для создания ДНК-маркеров к *Vrn* генам / И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап, В. И. Файт, А. Ф. Стельмах // *Цитология и генетика.* — 2001. — Т. 35, № 2. — С. 49–52.
20. Балашова И. А. Маркирование гена *Ppd-D1a* методом *ISSR*–ПЦР / И. А. Балашова, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // *Вісник ОНУ. Біологія.* — 2002. — Т. 7, вип.1. — С. 69–74.
21. Beales J. Pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales, A. Turner, S. Griffiths, J. W. Snape & D. A. Laurie // *Theoretical and Applied Genetics.* — 2007. — V. 115. — P. 721–733.



22. Файт В. И. Идентификация генотипов *Ppd-1* сортов пшеницы мягкой методами генетического и STS — ПЦР анализа / В. И. Файт, И. А. Балашова, В. Р. Федорова, М. С. Бальвинская // Физиология растений и генетика. — 2014. — Т. 46, № 4. — С. 325–336.
23. Dyck J. A., Matus-Cádiz M. A., Hucl P., Talbert L., Hunt T., Dubuc J. P., Nass H., Clayton G., Dobb J., Quick J. Agronomic performance of hard red spring wheat isolines sensitive and insensitive to photoperiod / J. A. Dyck, M. Matus-Cádiz, P. Hucl, L. Talbert, T. Hunt, J. P. Dubuc, H. Nass, G. Clayton, J. Dobb, J. Quick // Crop Sci. — 2004. — V. 44. — P. 1976–1981.
24. Файт В. И. Маркирование QTL продолжительности периода до колошения озимой пшеницы / В. И. Файт, И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 5. — С. 35–40.
25. Файт В. И. Маркирование QTL темпов колошения у доминантных по *Ppd-D1a* генотипов озимой пшеницы / В. И. Файт, И. А. Балашова // Зб. наук. праць СГІ — НЦНС. — Одеса, 2012. — Вип. 19 (59). — С. 26–34.
26. Галаева М. В. Морозоустойчивость  $F_2$  популяций пшеницы мягкой озимой и ее связь с аллелями микросателлитных локусов / М. В. Галаева, В. И. Файт, С. В. Чеботарь, Ю. М. Сиволап // Вісник ХНАУ: Серія Біологія. — 2013. — Вип. 3 (30). — С. 68–75.
27. Галаева М. В. Морозостійкість рекомбінантно-інбредних ліній озимої пшениці, відмінних за алельним складом микросателітних локусів хромосоми 5В / М. В. Галаева, В. І. Файт, С. В. Чеботар, О. В. Галаєв, Ю. М. Сиволап // Вісник ОНУ. — 2011. — Т. 16 (вип. 6). — С. 32–39.
28. Галаева М. В. Зв'язок алелів микросателітних локусів п'ятої групи хромосомом з морозостійкістю озимої пшениці / М. В. Галаева, В. І. Файт, С. В. Чеботар, О. В. Галаєв, Ю. М. Сиволап // Цитологія та генетика. — 2013. — Т. 47, № 5. — С. 3–11.
29. Мокану Н. В. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимоморозостойкости и урожаю у озимой пшеницы / Н. В. Мокану, В. И. Файт // Цитология и генетика. — 2008. — Т. 42, № 6. — С. 28–35.
30. Галаева М. В. Ідентифікація генофонду пшениці м'якої озимої за алелями асоційованого з морозостійкістю микросателітного локусу *Xcfd7-5B* / М. В. Галаева, В. І. Файт, Ю. М. Сиволап // Вісник ХНАУ: Серія Біологія. — 2013. — Вип. 1(28). — С. 72–77.
31. Галаева М. В. Генетическое разнообразие генофонда мягкой озимой пшеницы по ллелям связанного с морозоустойчивостью микросателлитного локуса *Xgwm182-5D* / М. В. Галаева, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // Biopolimers and Cell. — 2013. — V. 29, N 6. — P. 487–492.

Надійшла 02.07.2015.

UDC 575.16:577.2:58.036.5:633.11

**Fayt V. I., Balashova I. A., Galaeva M. V.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**MARKING OF GENES FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE TRAITS OF ADAPTABILITY FOR BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.)**

The main genes *Vrn-1*, *Ppd-1* and QTL for heading time and frost resistance are being discussed. New DNA markers for gene *Vrn-D1a* and microsatellite loci associated with plant frost resistance and pre-heading period are revealed. Genotypes of 200 bread wheat varieties of different ecological and geographical origin are identified, and significant differences in the frequency of alleles for loci *Ppd-D1*, *Xgwm182–5D* and *Xcfd7–5B* are shown and indicate the adaptive and breeding value of specific alleles of mentioned loci for certain conditions.

УДК 575.16:577.2:58.036.5:633.11

**Файт В. І., Балашова І. А., Галаєва М. В.**

**МАРКУВАННЯ ГЕНІВ ЯКІСНИХ ТА КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК АДАПТИВНОСТІ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.)**

Обговорюється маркування головних генів *Vrn-1*, *Ppd-1* і QTL темпів колосіння та морозостійкості. Виявлено нові ДНК-маркери до гена *Vrn-D1a* і мікросателітні локуси, асоційовані з морозостійкістю рослин або тривалістю періоду до колосіння. Ідентифіковано генотипи близько 200 сортів пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження і показані достовірні відмінності частот алелів локусів *Ppd-D1*, *Xgwm182–5D* і *Xcfd7–5B*, що свідчить про селекційну або адаптивну цінність конкретних алелів вказаних локусів для певних умов.

УДК 577:2:633.11:575

С. В. ЧЕБОТАР<sup>1,2</sup>, д. б. н., член-кор. НААН, пров. наук. співроб., зав. каф.,  
О. М. БЛАГОДАРОВА<sup>1</sup>, наук. співроб.,  
Н. О. КОЗУБ<sup>3</sup>, к. б. н., зав. лаб.,  
І. О. СОЗІНОВ<sup>3</sup>, ст. наук. співроб.

<sup>1</sup>СГІ — НЦНС, Одеса,

<sup>2</sup>ОНУ ім. І. І. Мечникова, Одеса

<sup>3</sup>ІЗР НААН, Київ

e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

### **ПЛР-АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛОКУСІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ЯКІСТЬ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.)**

*У Південному біотехнологічному центрі в рослинництві НААН (ПБЦ) у період 2002–2012 рр. досліджували молекулярно-генетичний поліморфізм у локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* і *Glu-A3*, за генами пу-роіндолінів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, що контролюють ознаку «твердозерність», а також за генами *Wx*, які зумовлюють вміст амілози в крохмалі ендосперму зерна пшениці м'якої, із застосуванням ПЛР-аналізу. Зіставлено результати визначеного генетичного поліморфізму методом ПЛР з алель-специфічними праймерами до локусів  $\gamma$ -гліадинів, з даними, отриманими електрофорезом запасних білків зерна пшениці. Рівень визначеного ПЛР поліморфізму був нижчий від виявленого електрофорезом запасних білків. ПЛР-аналізом генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* у більшості досліджених українських сортів пшениці були детектовані алелі, характерні для твердозерних сортів, лише три сорти мали алелі, що властиві м'якозерним пшеницям. Серед досліджених українських пшениць-носіїв нуль-алелів за *Wx*-генами не виявлено.*

Ключові слова: пшениця м'яка, ПЛР-аналіз, локуси *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* і *Glu-A3*, гени *Pina-D1* та *Pinb-D1*, *Wx*-гени.

**Вступ.** У зв'язку з розробкою у відомих наукових центрах світу нових методів дослідження генетичного поліморфізму, зокрема за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка дозволяє виявляти зміни в нуклеотидній послідовності генів, що викликані мутаціями, або відстежувати зчеплене успадковування алелів генетичних локусів, що косегрегують з генами, які визначають прояв господарсько цінних ознак сільськогосподарських культур, у Південному біотехнологічному центрі в рослинництві НААН (ПБЦ) на початку 2000-х років Ю. М. Сиволапом та С. В. Чеботар були ініційовані дослідження локусів геному пшениці м'якої, що впливають на якість зерна. Зокрема: 1) спільно з аспіранткою А. М. Поліщук проведено молекулярно-генетичний аналіз сортів та майжеізогенних ліній

пшениці м'якої за допомогою ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli*- та *Glu*-локусів, а у дослідженнях з фахівцями відділу генетичних основ селекції СГІ н. с. О. М. Благодаровою і завідувачкою лабораторії екологічної генетики і біотехнології к. б. н. Н. О. Козуб та с. н. с. І. О. Созіновим з Інституту захисту рослин НААН зіставлено визначені алелі *Gli*- та *Glu*-локусів за ПЛР з алельними варіантами блоків гліадинів, що спостерігаються за електрофорезом у ПААГ [1, 2]; 2) ідентифіковано алельний стан генів пуроіндолінів вітчизняних сортів пшениці м'якої та спільно із тодішнім завідувачем лабораторії наукових досліджень інтелектуальної власності, маркетингу інновацій та сортовивчення к. с.-г. н. О. М. Хохловим проведено зіставлення з фізичними показниками твердозерності, визначеними за методом NIR [3, 4]; 3) з аспіранткою І. В. Петровою здійснено ПЛР-детекцію алелів *Wx*-генів у сортах та проведено добір селекційних ліній пшениці, що мають нуль-алелі за *Wx*-генами, спільно з завідувачем відділу генетичних основ селекції СГІ д. б. н. О. І. Рибалкою; оцінено ефекти впливу функціональних алелів за *Wx*-генами на вміст амілози в крохмалі зерна генотипів пшениці, що розрізняються за алелями вказаних генів у спільних дослідженнях з к. с.-г. н. О. М. Хохловим [5, 6].

Хлібопекарські властивості сортів пшениці визначаються фізичними властивостями клейковинного комплексу зерна, який складають білки: мономерні гліадини та високополімерні глютеніни. Генетичний контроль білків клейковини пшениці здійснюється мультиалельними *Glu*-/*Gli*-локусами, локалізованими в хромосомах гомеологічних груп 1 та 6, алелі кожного з яких вносять певний позитивний чи негативний вклад в ознаки технологічної та хлібопекарської якості борошна [7–10]. Слід звернути увагу, що значення глютенінів у формуванні хлібопекарських властивостей пшениці оцінюється науковцями (Paine et al. [11], О. М. Благодарова та ін. [9]) як визначальне. Але поліморфізм культурних сортів за локусами *HMW* (високомолекулярних) глютенінів досить низький. За даними [9], сорти України мають по три алелі локусів *Glu-A1* і *Glu-B1*, і, окрім 1–2 %, не відрізняються за локусом *Glu-D1*. У ПБЦ було розпочато дослідження з визначення алелів генів запасних білків за молекулярними маркерами. Ставилось завдання: вивчити, чи може ПЛР-аналіз генів запасних білків на рівні нуклеотидних послідовностей дати нову інформацію про різні алельні стани окремих генів з кластерів генів запасних білків. Проводилося порівняння і зіставлення систем класифікації алельних станів генів гліадинів та глютенінів за даними ДНК-маркерів та за даними електрофорезу білків [2].

Твердозерність/м'якозерність — також одна з найважливіших характеристик зерна пшениці, яка має стосунок до помелу зерна, замісу тіста та виготовлення хлібобулочних виробів. Борошно твердозерних пшениць *Triticum aestivum* L. використовують в хлібопекарській промисловості. М'якозерна пшениця *T. aestivum* L. більш підходить для виготовлення печива та бісквітів у кондитерській галузі [12].

Ознака твердозерність/м'якозерність контролюється генами, що локалізовані у *Ha* (*Hardness*) локусі на короткому плечі хромосоми 5D. Ці гени кодують три поліпептиди, з яких складається білок фріабілін: пуринодоліни *a* (*Pina-D1*) і *b* (*Pinb-D1*) та *Grain Softnes Protein* (*GSP1*) [13,14].

Градація ознаки «твердозерність» зерна пшениці значною мірою зумовлена різноманітними сполученнями алелів пуринодолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Дикий тип м'яких пшениць має м'яку текстуру ендосперму, це пов'язано з алелями *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*. У твердозерних пшениць *T. aestivum* L. перший або другий пуринодоліновий ген або обидва мають мутації, досить повна характеристика яких наведена у роботах [4, 15].

Коливання вмісту амілози з тенденцією до зниження (від 20 до 0 %) також суттєво впливає на технологічні якості крохмалю та борошна пшениці. Ключовим ферментом синтезу амілози у крохмальних гранулах є фермент *GBSS1* (*granule-bound starch synthase*), який ще називають *Wx*-протеїном (молекулярна маса 60 кДа). *Wx*-протеїни кодуються генами, що були ідентифіковані у пшениці [16] як *Wx-A1* (7AS), *Wx-B1* (4AL), *Wx-D1* (7DS). Як повідомлено І. В. Петровою із співавторами [5], зазначені гени мають функціональні і нефункціональні (нуль) алелі. Для локусу *Wx-A1* функціональними є алелі *Wx-A1a*, *Wx-A1c*, нефункціональним нуль-алель — *Wx-A1b*. Локус *Wx-B1* у *Triticum aestivum* L. має *Wx-B1a*, *Wx-B1c*, *Wx-B1e*, *Wx-B1f* функціональні алелі та нефункціональний алель *Wx-B1b*. Локус *Wx-D1* відрізняється алельним складом від попередніх наявністю двох нуль-алелів — *Wx-D1b*, *Wx-D1e* та функціональних *Wx-D1a*, *Wx-D1c*, *Wx-D1d*, *Wx-D1f*. Всі три нуль-алелі не рівноцінні за впливом на вміст амілози в крохмалі. Найсуттєвіше зниження вмісту амілози, у порівнянні з дією нефункціональних алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*, спричинює нуль-алель гена *Wx-B1*.

**Метою** нашої роботи було з'ясування генетичного поліморфізму за локусами *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3*, *Pina-D1*, *Pinb-D1* та *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* у вітчизняних сортів м'якої пшениці; зіставлення результатів визначення алелів за локусами *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3*, ідентифікованих за допомогою ПЛР та електрофорезу гліадинів у ПААГ.

У нашій роботі [2] підкреслено, що важливість ПЛР ідентифікації алелів запасних білків пов'язана: по-перше, зі складністю білкових спектрів, коли електрофореграми містять одночасно продукти експресії декількох локусів (7 для гліадинів, по 3 для LMW і HMW глютенінів), що робить перехід до їхньої ідентифікації в автоматичному режимі неможливим; по-друге, тільки так буде можливо ідентифікувати алелі, що розрізняються за кількістю копій генів; і, по-третє, можливо поліпептиди з однаковою рухливістю при їхньому поділі за масою (SDS-електрофорез) і за показником маса + заряд (кислий електрофорез) будуть все ж відрізнятися послідовністю нуклеотидів кодуючих їх генів.

**Матеріали та методи.** У роботі з вивчення генетичного поліморфізму генів запасних білків використано сорти м'якої пшениці: Лузанівка одеська, Зустріч одеська, Струмок, Одеська 267, Знахідка одеська, Любава одеська, Фантазія одеська, Прима одеська, Лада одеська, Застава одеська, Вікторія, Альбатрос одеський; шість майжеізогенних ліній м'якої пшениці, що були запропоновані та надані для дослідження к. б. н. Н. О. Козуб і с. н. с. І. О. Созіновим, зокрема лінії GLI-D1–5, GLI-B1–3, GLI-B1–4, GLI-A1–1, GLI-D1–4, GLI-B1–12, що відрізняються за певними алелями гліадинових локусів. Зазначені лінії створено д. б. н. М. М. Копусем [17] на основі сорту Безоста 1 в результаті шести бекросів та добору за гліадиновими маркерами. Донорами алельних варіантів локусів запасних білків при схрещуванні з сортом Безоста 1 (генетична формула *Gli-A1b Glu-B1b Glu-D1b*) є сорти Кримка місцева (алелі *Gli-D1j*, *Gli-A1m*), Левент (*Gli-B1o*), Zg2689/74 (*Gli-B1g*), Тріумф (*Gli-B1g*), Аврора (*Gli-B1l*). Також використано вихідний сорт Безоста 1 і сорт Одеська червоноколося та лінію Б-16, яка несе транслокацію 1RS.1BL.

Зернівки досліджуваних сортів було поділено на дві частини. Та, що з зародком, використовувалась для пророщування і виділення ДНК, а друга — для електрофорезу запасних білків. ДНК виділяли відповідно методичним рекомендаціям [18]. Ампліфікацію проводили за допомогою алель-специфічних праймерів до алелів *GliA-1.1*, *GliA-1.2*, *GliB-1.1*, *GliB-1.2*, *GliD-1.1*, *GliD-1.2*, згідно Zhang et al. [19] та алель-специфічних праймерів *Glu-A3a*, *Glu-A3e*, *Glu-A3ac*, *Glu-A3d*, *Glu-A3f* і *Glu-A3g* [20]. Продукти ампліфікації розділяли в 8 % неденатуруючому ПААГ. Для візуалізації продуктів ампліфікації використовували забарвлення за допомогою  $\text{AgNO}_3$  [21].

Електрофорез запасних білків виконувався науковим співробітником відділу генетичних основ селекції СГІ О. М. Благодаровою за методикою Ф. О. Поперелі [7]. Для аналізу брали по три зерна кожного сорту. Алелі гліадинів позначено за каталогом Е. В. Метаковського [22].

Для визначення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* використовували: спрямовану ПЛР з праймерами до гена *Pina-D1* [23], які дозволяють тестувати *Pina-D1a* алель, та з парами праймерів алель-специфічними до *Pinb-D1a* та до *Pinb-D1b* алелів [24]. ПЛР виконували у 20 мкл реакційної суміші, яка містила 1x Hotstar буфер, 1x Hotstar Q розчин, 100 нг ДНК, 4 нмоль dNTP, по 10 пмоль прямого та зворотного праймерів, 1 U Hotstar Taq полімерази (Qiagen, Hilden, Німеччина). Використовували такі умови ампліфікації: первинна денатурація — 95 °C 5 хв, потім 35 циклів: 94 °C — 0,5 хв; 60 °C — 0,5 хв; 72 °C — 0,75 хв; заключна елонгація –72 °C — 7 хв. Продукти ПЛР розділяли у 2 % агарозному гелі, візуалізували із забарвленням бромистим етидієм за стандартною процедурою.

Відносні показники твердозерності у зерні сортів пшениці були визначені методом NIR (інфрачервоний коефіцієнт відбиття) на приладі Infrapid 61 (комп'ютеризована версія; Labor MIM, Угорщина), а також на приладі Спектран-119М (ЛОМО Фотоніка, Росія) як описано [4].

Аналізували 46 сортів та лінії Wx-15, Wx-12 за допомогою алель-специфічних праймерів до Wx-A1a [5, 6, 25], праймерів Wx98F1 і Wx98R1 до Wx-B1 та праймерів WxD1b1F і WxD1b1R до локусу Wx-D1 [26].

Проводили маркерний добір селекційних ліній з популяції F<sub>5</sub> від схрещування сорту Куяльник (носії *a*-алелів за трьома локусами Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) та лінії Wx-12 (носії *b*-алелів за трьома локусами Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) (популяція створена завідувачем відділу генетичних основ селекції СГІ д. б. н. О. І. Рибалкою) та здійснювали спектрофотометричне визначення вмісту амілози в крохмалі зерна відібраних ліній за допомогою спектрофотометру Cary win UV «Varian» (Австрія) за методикою, що наведена [28].

**Результати та обговорення.** За результатами ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами, що розроблені Zhang et al. [19], як було показано в нашій роботі [2], досліджені сорти розділилися на 4 групи (табл. 1). Перша група — сорти з алелями *Gli-A1.1*, *Gli-B1.1*, *Gli-D1.2*: Лузанівка одеська, Зустріч одеська, Знахідка одеська, Любава одеська, Фантазія одеська, Альбатрос одеський. Друга група — сорти з *Gli-A1.1*, *Gli-B1.1*, *Gli-D1.1*: Одеська 267, Вікторія. Третя група — сорти з *Gli-A1.1*, *Gli-B1.2*, *Gli-D1.1*: Прима одеська і Застава одеська. Четверта група — сорти з *Gli-A1.2*, *Gli-B1.1*, *Gli-D1.2*: Струмок і Лада одеська. За локусом *Glu-A3* сорт Зустріч одеська мав алель *Glu-A3f*, Застава одеська — *Glu-A3a*, Струмок і Лада одеська — *Glu-A3d*, а інші сорти мали алель *Glu-A3c*.

За даними електрофорезу запасних білків, поліморфізм гліадинів у досліджуваних сортів був набагато більшим. Так, за локусом *Gli-A1* виявлено 4 алельні варіанти блоків гліадинів, їм відповідало тільки 2 алеля згідно ПЛР-аналізу. Генотипи з блоками гліадинів *Gli-A1f*, *Gli-A1b* і *Gli-A1c* мали єдиний алель *Gli A1.1*, за даними ПЛР. Як зауважено О. М. Благодаровою та наведено у [2], що, згідно каталогу алельних варіантів блоків гліадинів Ф. О. Поперелі [27], *Gli-A1b* і *Gli-A1c* представлені блоками компонентів білків, близьких за рухливістю при електрофорезі в ПААГ, а алельні варіанти *Gli-A1f* і *Gli-A1o* — дуже відрізняються блоками компонентів білків один від одного і від *Gli-A1b* і *Gli-A1c*. У дослідженій групі сортів за допомогою ПЛР-аналізу можна було диференціювати генотипи з алельним варіантом блоків гліадинів *Gli-A1o* — алель *Gli A1.2* за даними ПЛР.

При аналізі електрофореграм гліадинів за локусом *Gli-B1* у досліджуваних сортів виявлені 3 алельні варіанти блоків запасних білків — *Gli-B1b*, *Gli-B1d*, *Gli-B1e*, згідно ПЛР-аналізу, першим двом блокам відповідає алель *Gli-B1.1*, а третьому — *Gli-B1.2*. Оскільки алельний варіант гліадину *Gli-B1e* значно впливає на якість борошна, можливість його ідентифікації за допомогою ПЛР-аналізу має бути підтверджена на більшому наборі сортів.

За локусом *Gli-D1* не вдалося виявити відповідності між алельними варіантами блоків гліадинів на електрофорезі білків і за продуктами ПЛР-реакції.

Таблиця 1

Алельний стан локусів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* у генотипах сортів та майже ізогенних ліній пшениці за даними алель-специфічної ПЛР та алельні варіанти блоків гліадинів

Сорт	Алелі за даними ПЛР-аналізу			Алельні варіанти блоків гліадинів			Алелі локусу
	<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>	<i>Gli-A1</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Gli-D1</i>	<i>Glu-A3</i>
Лузанівка од.	1	1	2	b	d	g	c
Зустріч од.	1	1	2	f	b	x	f
Знахідка од.	1	1	2	b	b	j	c
Любава од.	1	1	2	b	b, d	b, j	c
Фантазія од.	1	1	2	b	b	j	c
Альбатрос од.	1	1	2	b	b	j	c
Одеська 267	1	1	1	b	b	g	c
Вікторія	1	1	1	b	b	j	c
Прима од.	1	2	1	c	e	f	c
Застава од.	1	2	1	b	e	j	a
Струмок	2	1	2	o	d	b	d
Лада од.	2	1	2	o	b	j	d
Майжеізогенні лінії пшениці, вихідний сорт та окремі донори алелів							
GLI-D1-5	1	1	1	b	b	g	c
GLI-B1-3	1	--	2	b	l	b	c
GLI-B1-4	1	2	2	b	g	b	c
GLI-A1-1	2	1	2	m	b	b	e
GLI-D1-4	1	1	2	b	b	j	c
GLI-B1-12	1	Новий алель	2	b	o	b	c
Безоста 1	1	1	2	b	b	b	c
Б-16	1	--	2	x	l	j	c
Одеська червоноколоса	1	2	2	g	c	f	c

За результатами ПЛР-аналізу локусу *Glu-A3* визначені алелі *a* і *c*, присутні в генотипах, для яких детектований алель *Gli-A1.1*. *Glu-A3a* і *Glu-A3c* алелі виявлені у сортів з алельними варіантами блоків гліадинів *Gli-A1b* і *Gli-A1c*. Алель *Glu-A3d* чітко відповідає алельному варіанту гліадину *Gli-A1o* і ПЛР-алелю *Gli-A1.2*. Алель *Glu-A3f* представлений тільки у генотипі сорту Зустріч одеська (для цього сорту характерний алельний варіант блоку гліадинів (*Gli-A1f*). Але цей сорт не відрізняється від усіх інших сортів, крім Струмка і Лади одеської, за ПЛР-аналізом локусу *Gli-A1*.

При дослідженні методами ПЛР та електрофорезу запасних білків алельного складу локусів, що кодують запасні білки у майже ізогенних ліній, а також у лінії Б16 і сорту Одеська червоноколоса, нами виявлено



у лінії GLI-B1–12 новий алель, якому відповідає продукт ампліфікації розміром 399 п. н., ще не описаний в літературі [1, 2]. При ПЛР-аналізі у лінії з житньою транслокацією продуктів ампліфікації не виявлено, тому що праймери, використані у роботі, розроблені до нуклеотидних послідовностей *Gli-1* локусів, які не містяться у житніх транслокаціях; отримані за ПЛР дані узгоджуються з даними електрофорезу запасних білків.

У результаті молекулярно-генетичного аналізу за допомогою праймерів до локусу *Glu-A3* майже у всіх лініях виявлено алель *Glu-A3c*. Тільки лінія GLI-A1–1 мала *Glu-A3e*. Отримані результати узгоджуються з даними про наявність ПЛР-алеля *Gli-A1.2* у цієї лінії. За даними Zhang et al. [20], наявність цього алеля збігається з присутністю алелів *Glu-A3d* і *Glu-A3e* для локусу *Glu-A3*. Слід звернути увагу на наявність у цієї лінії блоку компонентів гліадинів Gli-A1m за даними електрофорезу запасних білків.

Отже, у виконаних у ПБЦ спільних дослідженнях була показана можливість диференціювати ПЛР-методом генотипи м'якої пшениці з алельними варіантами блоків гліадинів Gli-A1m і Gli-A1o, які мають за ПЛР алель *Gli-A1.2*, від генотипів з варіантами блоків гліадинів Gli-A1f, Gli-A1b, Gli-A1c, Gli-A1x, Gli-A1g; а також генотипи з варіантами блоків гліадинів Gli-B1e, Gli-B1g і Gli-B1c, які, за даними ПЛР, мають *Gli-B1.2* алель, від генотипів з алельними варіантами блоків гліадинів Gli-B1b і Gli-B1d і з алелем *Gli-B1.1* за ПЛР.

За допомогою молекулярних маркерів до генів пуроіндолінів *a* і *b*, що контролюють якісну ознаку зерна м'якої пшениці — твердозерність, визначено алелі генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* у генотипах українських сортів, створених селекційними установами різних кліматичних зон (табл. 2). Досліджено також три російські сорти, що були свого часу широко розповсюджені в Україні. За результатами аналізу два сорти — Миронівська 33 і Мирлебен та лінія Б16pp характеризувалися алелями *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*, які розповсюджені у світі серед м'якозерних сортів. Це знаходиться у повній відповідності з їхнім фенотипом, визначеним методом NIR [4, 15]. 93 % сортів належить до найбільш розповсюдженого у світі твердозерного типу сортів та має алелі *Pina-D1a*; *Pinb-D1b*.

Згідно даних аналізу ознаки твердозерність, визначеної для 85 сортів пшениці м'якої методом NIR (рис.1), чітко вирізняються дві групи сортів; умовно виділена група значень до 45 одиниць відповідає групі м'якозерних сортів, група значень від 50 одиниць і вище — групі твердозерних сортів. Показник  $\chi^2$  свідчить про те, що розподіл за ознакою твердозерність відрізняється від нормального (через очевидну бімодальність).

Як ми вже зазначали [4], невелика різниця у твердозерності для сортів з однаковим алельним станом генів пуроіндолінів *a* і *b* може пояснюватися різними умовами вирощування, значна ж різниця може зумовлюватися впливом інших генів, у тому числі таких, які досі остаточно не визначені.

Таблиця 2

Параметри твердозерності та алельний стан генів пууроіндолінів, визначений у досліджених сортів згідно [4]

Текстура ендосперму зерна за класифікацією Williams (1998)	Твердозерність	Алелі генів пууроіндолінів	Сорти / лінії
Very soft	20–30	<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1b</i>	Фарандоль
Soft	33,6–38,6	<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1a</i>	Миронівська 33, Б16рр
Medium hard	50–65	<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1b</i>	Дальницька, Знахідка одеська, Володарка, Порада, Вдала, Застава, Світанок, Вимпел, Федорівка, Струмок, Батько, Сирена, Фантазія, Василина, Диканька, Ніконія, Селянка, Вікторія одеська, Леля, Веснянка
Hard	65–78	<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1b</i>	Б16 рр, Одеська 51, Лада, Либідь, Білосніжка, Красуня, Одеська 132, Тіра, Херсонська остиста, Апогей луганський, Одеська 133, Донецька 46, Писанка, Любава, Одеська 265, Ренан, Землячка одеська, Одеська 162, Обрій, Українка одеська, Альбатрос одеський, Дончанка 3, Супутниця, Краснодарська 99, Фаворитка, Ясочка, Победа 50, Золотоколоса, Станична, Білоцерківська напівкарликова, Прима, Зустріч
Very hard	78,8–90,0	<i>Pina-D1a</i> <i>Pinb-D1b/c</i>	Донський сюрприз, Лузанівка одеська, Мирхад, Миронівська 27, Мирич, Циганка
Extra hard	93	?	Миронівська 65

За локусом *Wx-A1* у всіх сортів виявлено алель *Wx-A1a*, нуль-алелі *Wx-B1b* і *Wx-D1b* не виявлені [5, 6]. Для ліній *Wx-15* і *Wx-12* тестовані *Wx-B1b* і *Wx-D1b* алелі і не отримано специфічний продукт ампліфікації для *Wx-A1a*.

Отримані нами дані узгоджуються з характеристикою українських сортів м'якої пшениці, що мають нормальний вміст амілози — 20–30 %. У той же час проведені дослідження є необхідним етапом для введення маркерної селекції за *Wx*-генами у селекційні програми СГІ. Так, в СГІ д. б. н. О. І. Рибалкою були створені популяції  $F_4$ – $F_5$  рекомбінантних інбредних ліній від схрещування сорту Куяльник (*Wx-A1aWx-A1a*,

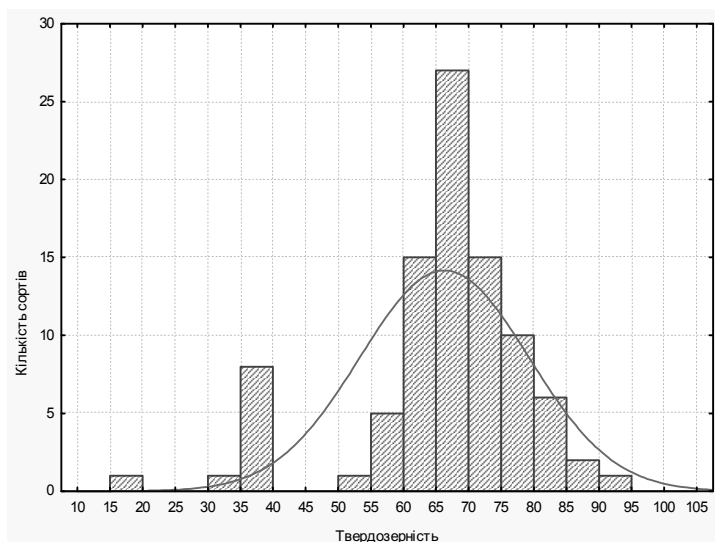


Рис. 1. Розподіл за ознакою твердозерність у зерні сортів пшениці, що визначені методом NIR  $\chi^2=24,52$  (df=6,  $p=0,00042$ ) згідно [4]

*Wx-B1aWx-B1a*, *Wx-D1aWx-D1a*) x лінія *Wx-12* (*Wx-A1bWx-A1b*, *Wx-B1bWx-B1b*, *Wx-D1bWx-D1b*).

Ми застосували алель-специфічні праймери для гібридологічного аналізу популяції  $F_5$ , де виявлено розщеплення, що відповідає теоретично очікуваному — 15: 2: 15 за локусом *Wx-A1* ( $\chi^2 = 5,05$ ;  $0,20 > P > 0,05$ ), за локусом *Wx-B1* ( $\chi^2 = 7,65$ ;  $0,05 > P > 0,01$ ), за локусом *Wx-D1* ( $\chi^2 = 2,352$ ;  $0,50 > P > 0,20$ ) [6]. Відібрано 10 селекційних форм носіїв — алелів *Wx-A1bWx-A1b*, *Wx-B1bWx-B1b*, *Wx-D1bWx-D1b*, які пропонуються для подальшого використання при створенні вітчизняних сортів з низьким вмістом амілози. Визначено ефекти впливу алельного стану *Wx*-локусів на вміст амілози в крохмалі зерна генотипів гібридної популяції. Показано неповне відтворення *Wx*-фенотипу за наявності нуль-алелів за локусами *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* у селекційних форм (рис. 2).

Визначено непропорційний характер ефектів впливу активних алелів *Wx*-генів на вміст амілози в крохмалі досліджених генотипів та відхилення від адитивності, спричинені ефектом компенсації алелів цих генів. Мінімальна абсорбція спостерігалася у гібридів з трьома нуль-алелями за локусами *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*. За наявності лише одного функціонального алеля «a» у будь-якому з трьох локусів абсорбція в середньому підвищувалась на 0,138 одиниці. Генотипи з трьома алелями «a a a» мали рівень абсорбції, характерний для батьківської форми — сорту Куяльник. У селекційних форм із повним набором мутантних алелів *Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b* спектри абсорбції були помітно вищі, ніж у батьківської лінії *Wx-12*.

Неповне відтворення *Wx*-фенотипу за наявності нуль-алелів за локусами *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* може зумовлюватися додатковими чинниками, які впливають на вміст амілози в крохмалі зерна пшениці м'якої.

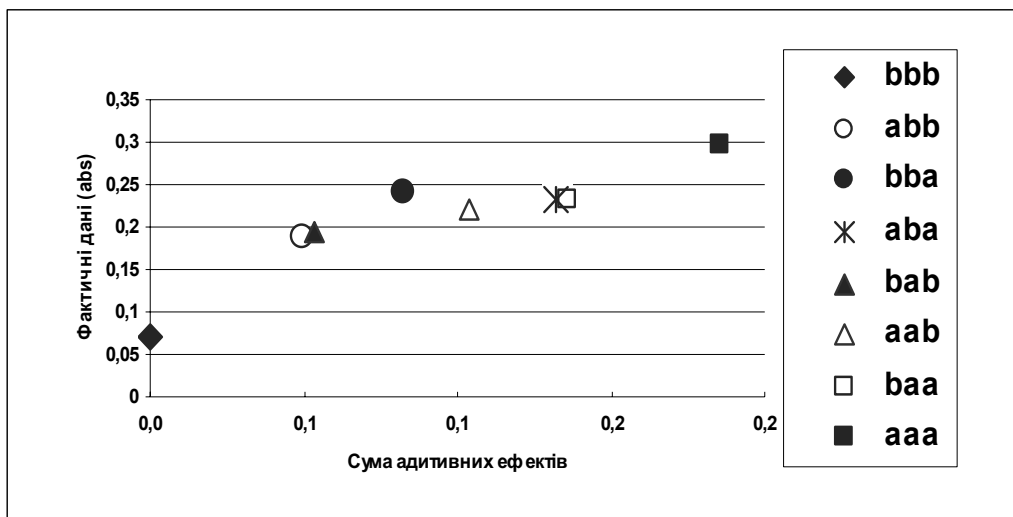


Рис. 2. Порівняння ефектів впливу алельного стану *Wx*-локусів (*Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*) на вміст амілози в крохмалі генотипів, обчислених за адитивною моделлю взаємодії генів із фактичними даними абсорбції згідно [28]: а – функціональні алелі *Wx*-локусів, b — нуль-алелі *Wx*-локусів. По осі ординат дані абсорбції при довжині хвилі 600 нм

### Висновки.

Отже, науковцями ПБЦ спільно з провідними фахівцями СГІ та Інституту захисту рослин НААН досліджено поліморфізм низки генетичних локусів, які детермінують якісні показники зерна пшениці м'якої. Визначено алельний стан українських сортів пшениці за *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3* локусами. Зіставлено генетичний поліморфізм, визначений із застосуванням ПЛР-аналізу за зазначеними вище локусами, та поліморфізм, який детектується за допомогою електрофорезу гліадинів у ПААГ (тобто, звичайним методом оцінки селекційного матеріалу пшениці за спектром запасних білків — гліадинів, що використовують у відділі генетичних основ селекції СГІ–НЦНС уже протягом 40 років з успішним виходом на практичну селекцію).

Порівняльними дослідженнями показано, що рівень генетичного поліморфізму за *Gli-1* та *Glu-A3* локусами, які детектували у ПЛР з праймерами, розробленими Zhang et al. [19, 20], нижчий, ніж спектр спостережуваного різноманіття алельних варіантів блоків гліадинів. Це пояснюється тим, що використані у дослідженні алель-специфічні праймери, розроблені Zhang et al. [19, 20] на основі попередньої детекції однонуклеотидних замін в послідовності *Gli-1* та *Glu-A3* локусів. Тобто, використану панель праймерів необхідно доповнювати іншими ПЛР-маркерами, які дозволять детектувати поліморфізм за нуклеотидною послідовністю в інших сайтах генних кластерів гліадинів.

Застосування ПЛР-аналізу алельного стану генів пуроіндолінів у генотипах вітчизняних сортів дозволило визначити, що переваж-

на більшість сортів має алелі *Pina-D1a* та *Pinb-D1b*, які характерні для твердозерних пшениць, але у сортів з зазначеними алелями фізичний показник твердозерності значно варіює. Тому припускаємо, що, окрім генів пуроіндолінів, на ознаку твердозерність впливають й інші генетичні детермінанти, які потрібно вивчати. Також доцільно було б виявити сорти пшениці, показники твердозерності яких відповідають вищим хлібопекарським технологічним властивостям, якщо також врахувати для цих сортів алельний стан локусів *Gli-1* та *Glu-A3* та алельні варіанти блоків гліадинів.

За результатами аналізу виконаних робіт з дослідження поліморфізму *Wx*-генів показано, що переважна більшість українських сортів пшениці не має нуль-алелів за *Wx*-генами. Залучення у селекційні програми сортів-донорів нуль-алелів за *Wx*-генами може бути ефективно контролювано та прискорено за маркерною селекцією на основі застосування ПЛР-аналізу *Wx*-генів, зокрема для добору селекційних ліній з низьким вмістом амілози у зерні.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Полищук А. М. Молекулярно-генетический анализ почти-изогенных линий мягкой пшеницы с помощью аллель-специфических праймеров к *Gli*-локусам / А. М. Полищук, С. В. Чеботарь, Н. А. Козуб, И. А. Созинов, Ю. М. Сиволап // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : ЛОГОС, 2007. — Т. 1 — С. 165–167.
2. Поліщук А. М. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами до *Gli*- та *Glu*-локусів / А. М. Поліщук, С. В. Чеботар, О. М. Благодарова, Н. А. Козуб, І. О. Созінов, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2010. — № 6. — С. 22–31.
3. Чеботар С. В. Аналіз алельного стану генів *Pina-D1* і *Pinb-D1* в генотипах українських сортів пшениці / С. В. Чеботар, О. М. Хохлов, К. О. Куракіна, Ю. М. Сиволап // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. Вавилова ; редкол. : Кунах В. А. (голов. ред.) [та ін.] — К. : ЛОГОС, 2008. — Т. 5. — С. 207–212.
4. Чеботар С. В. Фенотипічні прояви алелів пуроіндолінових генів м'якої пшениці / С. В. Чеботар, К. О. Куракіна, О. М. Хохлов [та ін.] // Цитология и генетика. — 2012. — № 4. — С. 8–19.
5. Петрова І. В. ПЛР-аналіз алельного стану *Wx*-генів у сортів пшениці / І. В. Петрова, С. В. Чеботар, О. І. Рибалка [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : ЛОГОС, 2006. — Т. 3. — С. 127–132.
6. Петрова І. В. Контроль *Wx*-генів в процесі селекції при створенні форм м'якої пшениці з низьким вмістом амілози / І. В. Петрова, С. В. Чеботарь, А. И. Рыбалка, Ю. М. Сиволап // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавилова ; редкол. : Кунах В. А. (голов. ред.) [та ін.]. — К. : ЛОГОС, 2007. — Т. 2. — С. 162–164.

7. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его использование в генетике и селекции / А. А. Созинов — М. : Наука, 1985. — 272 с.
8. Попереля Ф. А. Полиморфизм глиадина и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивными свойствами сортов мягкой озимой пшеницы / Ф. А. Попереля // Селекция, семеноводство и интенсивная технология возделывания озимой пшеницы. — М. : Агропромиздат, 1989. — С. 138–150.
9. Благодарова О. М. Геногеографія алелів гліадин- і глютенінкодуєчих локусів українських сортів озимої м'якої пшениці / О. М. Благодарова, М. А. Литвиненко, Є. А. Голуб // Зб. наук. праць СГІ–НАЦ НАІС. — Одеса, 2004. — Вип. 6 (46), ч. 2. — С. 179–193.
10. Рибалка О. І. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за алельним складом *Gli-/Glu*-локусів / О. І. Рибалка, М. В. Червоніс, М. А. Литвиненко // Вісн. аграр. науки. — 2008. — № 2. — С. 54–59.
11. Payne P. I. Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat / P. I. Payne, G. J. Lawrence // Cereal Research Communic. — 1983. — Vol. 11. — P. 29–35.
12. Хохлов О. М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum*): стан та перспективи досліджень в Україні / О. М. Хохлов // Зб. наук. праць СГІ. — Одеса, 2002. — Вип. 2 (42). — С. 9–29.
13. Sourdille P. Linkage between markers and genes affecting kernel hardness in wheat / P. Sourdille, M. Perretant, G. Charmet [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 1996. — V. 93. — P. 580–586.
14. Giroux M. J. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b / M. J. Giroux, C. F. Morris // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — No 95. — P. 6262–6266.
15. Чеботарь С. В. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы / С. В. Чеботарь, Е. М. Благодарова, Е. А. Куракина [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2012. — Том 16, № 1. — С. 87–98.
16. Yamamori M. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat / M. Yamamori, T. Nakamura, T. R. Endo // Theor. Appl. Genet. — 1994. — Vol. 89. — P. 179–184.
17. Копусь М. М. О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы / М. М. Копусь // Селекция и семеноводство. — 1994. — 5. — С. 9–14.
18. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю. М. Сиволапа — К. : Аграр. наука, 1998. — С. 34–40.
19. Zhang W. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for  $\gamma$ -gliadin alleles in *Triticum aestivum* / W. Zhang, M. C. Gianibelli, W. Ma, L. Rampling, K. R. Gale // Theor. Appl. Genet. — 2003. — Vol. 107. — P. 130–138.
20. Zhang W. Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / W. Zhang, M. C. Gianibelli, L. R. Rampling // Theor. Appl. Genet. — 2004. — Vol. 108. — P. 1409–1419.
21. GenePrint STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. Promega, 2001. — D004 — P. 1–47.

22. Metakovsky E. V. Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat / E. V. Metakovsky // J. Genet. Breed. — 1991. — Vol. 45. — P. 325–344.
23. Gautier M. F. *Triticum aestivum* puroindolines, 2 basic cysteine-rich seed proteins-cDNA sequence-analysis and development gene-expression / M. F. Gautier, M. E. Aleman, A. Guirao, D. Marion, P. Joudrier // Plant Molecular biology. — 1994. — Vol. 25 (1) — P. 43–57.
24. Giroux M. J. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friablin / M. J. Giroux, C.F. Morris // Theor Appl Genet. — 1997. — Vol. 95. — P. 857–864.
25. Семенюк І. В. Молекулярно-генетический анализ селекционных линий мягкой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа / И. В. Семенюк, С. В. Чеботарь, А. И. Рыбалка, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 5. — С. 17–22.
26. McLauchlan A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homo-allele of granule-bound starch synthase and application in wheat breeding programs / A. McLauchlan, F. C. Ogbonnaya, B. Hollingsworth // Aust. J. Agric. Res. — 2001. — Vol. 52, № 11–12. — P. 1409–1416.
27. Попереля Ф. О. Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці / Ф. О. Попереля // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України : зб. наук. праць СГІ. — Одеса, 1996. — С. 117–132.
28. Петрова І. В. Метрологічна характеристика методу спектрофотометричного визначення вмісту амілози в крохмалі зерна селекційних ліній пшениці / І. В. Петрова, О. М. Хохлов, С. В. Чеботар, Ю. М. Сиволап // Физиология и биохимия культурных растений. — 2010. — Т. 42, № 2. — С. 146–152.

Надійшла 17.07.2015.

UDC 577:2:633.11:575

**Chebotar S. V., Blagodarova O. M., Kozub N. O., Sozinov I. O.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**PCR-ANALYSIS OF POLYMORPHISM LOCI AFFECTING THE QUALITY GRAINS OF BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.)**

In South Plant Biotechnology Center NAAS during the 2002–2012 there were carried out PCR-analysis of molecular genetic polymorphisms in loci *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* and *Glu-A3*, *Pina-D1* and *Pinb-D1* genes of puroindolines, that determine «hardness», as well as genes *Wx*, which determine the content of amylose in starch of the endosperm of bread wheat. There were done comparison of the level of the genetic polymorphism that have been revealed by PCR with allele-specific primers for  $\gamma$ -gliadin loci and the polymorphisms of storage proteins of wheat. The level of polymorphism that have been detected by PCR was lower than polymorphism of storage proteins. PCR-analysis of gene *Pina-D1* and *Pinb-D1* have detected alleles which are specific for «hard» and «very hard» wheat varieties mostly among investigated Ukrainian varieties, only for few varieties have been identified alleles that are specific for «soft wheat». Among the tested Ukrainian wheat were not found null alleles of *Wx*-genes.

УДК 577:2:633.11:575

**Чеботарь С. В., Благодарова Е. М., Козуб Н. А., Созинов И. А.**

**ПЦР-АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА КАЧЕСТВО ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.)**

В Южном биотехнологическом центре в растениеводстве НААН в период 2002–2012 гг. с помощью ПЦР проводились исследования молекулярно-генетического полиморфизма в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* по генам puroиндолинов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, контролирующим признак «твердозерность», а также по генам *Wx*, обуславливающим содержание амилозы в крахмале эндосперма пшеницы мягкой. Проведено сопоставление результатов ПЦР-определения генетического полиморфизма с аллель-специфичными праймерами к локусам  $\gamma$ -глиадинов с данными, полученными методом электрофореза запасных белков зерна пшеницы. Уровень выявленного полиморфизма с помощью ПЦР был ниже, чем детектированного с помощью электрофореза запасных белков. Методом ПЦР-анализа генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* в большинстве



исследованных украинских сортов пшеницы были определены аллели, характерные для твердозерных сортов, только в трех сортах обнаружены аллели, присущие мягкозерной пшенице. Среди исследованных украинских пшениц не было обнаружено носителей нуль-аллелей по *Wx*-генам.

UDC 633.11:631.52:577.21:576.316:633.14

I. I. MOTSNY<sup>1</sup>, Cand. of biol. sci., lead. sci. worker,

L. V. SUDARCHUK<sup>1</sup>, eng.,

S. V. CHEBOTAR<sup>1,2</sup>, Dr. of biol. sci., mem.-cor. of NAAS of Ukraine, lead. sci. worker

<sup>1</sup>PBGI–NCSCI, Odessa

e-mail: motsnyyii@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Genetics and Molecular Biol., Odesa National I. I. Mechnikov University, Odessa

e-mail: s.v.chebotar@gmail.com

## MOLECULAR-GENETIC EVIDENCE OF WHEAT-RYE CHROMOSOME SUBSTITUTION AND TRANSLOCATION IN WHEAT CULTIVARS AND INTROGRESSION STOCKS

*With use of molecular-genetic and cytological analysis 1AL.1RS and 1BL.1RS translocations, (1B)1R wheat-rye chromosome substitution, as well as modified 1BL.1RS translocation with locus Sec1 replaced by wheat Gli-B1 locus, have been identified in new wheat cultivars, original introgression stocks and F<sub>4</sub> hybrid families. The translocations were suggested to support a resistance to leaf rust caused by the Lr genes, being not related to them, and to determine confident resistance to stem rust. The substitution stocks were susceptible to leaf and moderately susceptible or low resistant to stem rusts because of other than the wheat-rye chromosome translocation origination of the 1RS chromosome.*

Key words: *Triticum aestivum*, STS-markers, substitution, translocation.

**Introduction.** The short arm of chromosome 1R of *S. cereale* carries a number of genes of agronomic importance, and when transferred to bread wheat in the form of 1BL.1RS or 1AL.1RS translocations has improved the adaptation of wheat plants and has resulted in valuable new cultivars. Derived from cv. Aurora a wheat-rye translocation 1BL.1RS, which carries chromosome arm 1RS from rye cv. Petkus, is the most widespread. This arm carries a gene cluster *Pm8/Yr9/Lr26/Sr31* conferring resistance to diseases [1]. Derived from cv. Amigo a 1AL.1RS translocation, which short arm originated from rye cv. Insave, is in the second place according its distribution among wheat cultivars, as reported in the rye gene map database (<http://www.rye-gene-map.de/ryeintrogression/>). The rye arm in this translocation determined the resistance to drought, greenbug (*Schizaphis graminum*) (gene *Gb2*), mite (*Aceria tosichella*) (*Cm3*), powdery mildew (*Pm17*), leaf and stem rust (*SrR*) [1]. Some other translocations (including a 1AL.1RS, a 1BL.1RS and a 1DL.1RS) involving 1RS from rye cv. Imperial have been isolated in Australia in

different wheat backgrounds [2]. These translocations conferred resistance to all Australian strains of the stem rust pathogen, but were susceptible to leaf rust, stripe rust and powdery mildew. In Japan, cv. Salmon that has a translocation 1BL.1RS was obtained in the progeny of a hybrid between two strains of octoploid *Triticale*. The translocation is somewhat different from Aurora's one and carries a recognizably different allele at the *Sec1* locus [3]. The rye parent and breeding use of the Salmon's translocation are not considered in literature. Due to its increasing effect on wheat adaptability and productivity, numerous wheat cultivars and lines, carrying the 1RS as 1AL.1RS, 1BL.1RS or 1DL.1RS Robertsonian translocation, have been released worldwide [4].

The introduction of the translocations into Ukrainian bread wheat cultivars is a result following the utilization of the Aurora's and Amigo's offspring in the hybridization programs. So, the translocated chromosomes 1BL.1RS (1RS from Petkus rye) and 1AL.1RS (1RS from Insave rye) have been identified in a number of cultivars developed in Ukraine [5]. In addition, a number of introgression stocks with high resistance to leaf and stem rust, high protein content and some morphological characters were developed as a result of wide crosses; and the 1BL.1RS translocation from Aurora had been identified among them [6]. Besides, within the stocks, chromosome 1R of rye cv. Voronezhskaya SHI substituted for chromosome 1B in a mixed cv. Hostianum 237/*T. durum* cv. Chernomor background. Recently we found that this rye chromosome does not confer resistance to leaf rust, carries a different allele at the *Sec1* locus, and moreover it has a new addition secalin locus  $22.9 \pm 3.1$  cM distally from the *Sec1* in the 1RS arm [7].

Unfortunately, in contrast to their desirable agronomic traits, wheats carrying these translocations generally produce a flour with low quality. Doughs derived from them show marked stickiness, reduced dough strength and intolerance to overmixing, and this seriously limited their use in Ukraine where leavened bread is the main end-product of the flour [8]. Recently a program was started to reduce the amount of rye chromatin in 1BL.1RS translocation by induction of homoeologous pairing between 1RS and 1BS chromosomes, with the aim of separating the quality defects from the stem rust resistance gene *Sr31* [9]. Similar attempts are now being made to introduce the recombinant rye arm of Pavon MA1 line into Odessa's cvs [10] to separate the sticky dough problem from the disease resistance and high yield associated with the 1BL.1RS translocation derived from rye cv. Petkus.

Various methods have been employed to detect the wheat-rye translocations, however the abundance of DNA markers in cereal genomes provided a powerful tool to detect or verify the presence of rye chromatin in wheat backgrounds [11]. The aim of the work was to detect the (1B)1R wheat-rye chromosome substitution, 1AL.1RS and 1BL.1RS translocation in Ukrainian cultivars, introgression stocks and hybrid families with PCR markers.

**Material and methods.** A sets of 30 winter bread wheat cvs, 10 original primary introgression stocks ( $2n=42$ ) and 13  $F_4$  hybrid families have been in-

vestigated. The cvs were of different pedigree and mainly of Ukrainian breeding. Among them Odesskaya 267 (Od.267), Kuyal'nik and Pavon as a negative control for 1AL.1RS and 1BL.1RS translocations, Amigo as a positive control for 1AL.1RS translocation and Aurora as a positive control for 1BL.1RS translocation, were included in this study.

The majority of the introgression stocks ( $F_{\infty}$ ) were developed from a cross: triticale (8x) cv. AD825/*T. durum* Desf. cv. Chernomor and following spontaneous hybridization of the  $F_3$  hybrids with the collection sib-strain H74\_90–245 or H74\_90–258, or without it. Triticale AD825 is a primary amphidiploid (*T. aestivum* L. cv. Hostianum 237/*S. cereale* L. cv. Voronezhskaya SHI) [12]. The strains H74\_90–245 and H74\_90–258 were derived in Dobroudja Agricultural Institute (General Toshevo, Bulgaria) from the step cross: Dr. Savov's synthetic (*T. timopheevii* Zhuk./*Ae. tauschii* Coss.)/Tom Pouce Blanc//Avro-ra/3/Rusalka and received from Dr. Ivan Panayotov.

The stocks CWXs and CWXr were derived from a cross between the primary introgression stocks H273\_97, having a (1B)1R chromosome substitution, and H242\_97–2, carrying a 1BL.1RS translocation [Kozub, unpublished].

The  $F_4$  hybrid families were obtained from a cross Kuyal'nik/Pavon MA1 and provided by Dr. A. I. Rybalka [10]. The line Pavon MA1, having a modified 1BL.1RS translocation, was created by Dr. A. J. Lukaszewski [13] and kindly supplied to Dr. Rybalka for exclusive exploiting (Rybalka 2005, personal communication).

The material was evaluated to contain a field resistance to leaf and stem rusts and was investigated by PCR-analysis with microsatellite markers. The  $F_1$  hybrids between some of the introgression stocks or the  $F_4$  families and corresponding bread wheat tester (Od.267 or Kuyal'nik, respectively) were studied cytologically with routine acetocarmine methods. Plant pathological evaluations were carried out by the plant infection intensity in field (at the adult plant stage) with use of a unified international scale based on modified Cobb scale [14]. Were 'VR', 'R' and 'MR' characterized high, simple and moderate resistance, and 'VS', 'S' and 'MS' — respectively, susceptibility. The leaf and stem rust resistance were scored both at natural epiphytotic conditions and under an artificial infection pressure. Herewith, population mixtures of the most aggressive local races of both diseases were used.

All lines were analyzed by using DNA-markers. DNA was isolated from leaf material of adult plants and seedlings according to standard CTAB-methods [15]. Rye microsatellites: *Xrems1303*, *SR1R003*, a secalin-specific STS-marker —  $\omega$ -*sec*-P3+ $\omega$ -*sec*-P4, wheat microsatellites: *Xgwm18* (1BS), *Xgwm550* (1BS), *Xgwm140* (1BL), *Xgwm153* (1BL), *Xbarc263* (1AS), *Xgwm357* (1AL), *Taglut* (1AS) and allele-specific molecular markers: *GliB1.b* and *GliB1.d* have been applied for the PCR-analysis. The PCR products were analyzed with using standard electrophoresis procedure in 2 % agarose gel. The fragment sizes were calculated by comparison with molecular weight marker — pUC19/Mspl. Detailed characteristics of the

markers and molecular procedure used is described at methodical recommendations [16].

1RS chromosome presence was detected with the rye microsatellites and the secalin-specific STS-marker. Substitution or translocation was identified by the absence of 1A or 1B chromosome corresponding arm via application of the wheat microsatellites. The (1B)1R chromosome substitution and 1BL.1RS translocation presence in some introgression stocks was confirmed cytologically for meiotic configurations at metaphase I (MI) in pollen mother cells (PMCs) of the  $F_1$  hybrids.

**Results and discussion.** The presence of 1RS chromosome was detected in the cvs, introgression stocks and the  $F_4$  hybrid families studied when specific products with the markers: *Xrems1303*, *SR1R003*,  $\omega$ -*sec-P3* +  $\omega$ -*sec-P4* had been found. The absence of PCR products with the markers *Xbarc263* (1AS) or *Xgwm550* (1BS) evidenced the substitution of corresponded wheat chromosome arm 1AS or 1BS by the short arm of rye chromosome 1R and allowed to differentiate wheat cultivars with 1AL.1RS and 1BL.1RS translocations (Table 1). Thus, several cvs carry the arm 1RS from Insave rye as a 1AL.1RS translocation, and the others have a 1BL.1RS translocation. Two bread wheat cultivars without the translocations and negative controls for both translocations also were presented.

Within the introgression stocks the microsatellite markers *Xgwm18* (1BS), *Xgwm550* (1BS), as well as *Xgwm140* (1BL) and *Xgwm153* (1BL) have been applied for the identification and differentiation of 1B chromosome translocation or substitution. The detection of PCR-products of the *Taglut* (1AS) and *Xgwm357* (1AL) markers, irrespective of the polymorphism, proved the presence of intact 1A chromosome in the investigated introgression stocks.

The amplification products with the markers *Xgwm140* and *Xgwm153* were not detected for the stocks H273\_97, H274\_97 and H269\_97–5, but were obtained within the stocks E200\_97–1, E200\_97–2, H242\_97–1, H242\_97–2, CWXs and CWXr, as well (Table 2). Thus, the stocks H273\_97, H274\_97 and H269\_97–5 carry a (1B)1R substitution, and all the others carry a 1BL.1RS translocation chromosome. As for E217\_97, the translocation 1BL.1RS heterozygosis was revealed in this stock at the previous investigation [6]. So that, an individual selection of a plant with a big spike was carried out in the E217\_97. Evidently, the plant without the translocation was chosen and, correspondently, the stock E217\_97 without the translocation has been derived (table 2).

Meiotic observations revealed the presence of 19 closed bivalents (the maximum) plus an open bivalent and 2 univalents ( $19^{\text{II}}_{\text{c}} + 1^{\text{II}}_{\text{o}} + 2^{\text{I}}$ ) at meiotic MI in the  $F_1$  of H273\_97/Od.267 and H274\_97/Od.267 hybrids (Fig. 1 a), and  $20^{\text{II}}_{\text{c}} + 1^{\text{II}}_{\text{o}}$  (Fig. 1 b) as the highest chromosome association in the test crosses Od.267/translocation stocks, supporting the molecular-genetic evidence. There were only one PMC (0.3 %) with  $20^{\text{II}}_{\text{c}} + 2^{\text{I}}$  as the highest meiotic association (Fig. 1 c) and complete absence of pairing between 1R and 1B

Table 1

Results of PCR-analysis of the winter bread wheat cultivars studied

Cultivar	Trans- location	Presence of amplification products of the marker loci <sup>a</sup>			
		<i>Xrems1303</i> (1RS)	$\omega$ - <i>secalin-P3/P4</i> (1RS)	<i>Xgwm550</i> (1BS)	<i>Xbarc263</i> (1AS)
Amigo (control)	1AL.1RS	+	+	+	–
Rastavitsa	1AL.1RS	+	+	+	–
Vikhovanka	1AL.1RS	+	+	+	–
Zolotokolosa	1AL.1RS	+	+	+	–
Vesnyanka	1AL.1RS	+	+	+	–
Columbia	1AL.1RS	+	+	+	–
Smuglyanka	1AL.1RS	+	+	+	–
Etude	1AL.1RS	+	+	+	–
Knyaginya Ol`ga	1AL.1RS	+	+	+	–
Avrora (control)	1BL.1RS	+	+	–	+
Bilosnizhka	1BL.1RS	+	+	–	+
Veselka	1BL.1RS	+	+	–	+
Krizhinka	1BL.1RS	+	+	–	+
Libid`	1BL.1RS	+	+	–	+
Mirich	1BL.1RS	+	+	–	+
Mirleben	1BL.1RS	+	+	–	+
Mironiv`ska 33	1BL.1RS	+	+	–	+
Mironiv`ska 61	1BL.1RS	+	+	–	+
Mironiv`ska 65	1BL.1RS	+	+	–	+
Pobeda-50	1BL.1RS	+	+	–	+
Favoritka	1BL.1RS	+	+	–	+
Kharkiv`ska 96	1BL.1RS	+	+	–	+
Elegia	1BL.1RS	+	+	–	+
Shchedrist` od.	1BL.1RS	+	+	–	+
Pavon MA1	1BL.1RS	+	–	–	+
Antonivka	–	–	–	+	+
Bezostaya 1	–	–	–	+	+
Od.267 (control)	–	–	–	+	+
Kuyal`nik (control)	–	–	–	+	+
Pavon (control)	–	–	–	+	+

<sup>a</sup> + primer amplification product presence (irrespective of the polymorphism), – primer product absence.

chromosomes in all 322 PMCs studied in the test crosses Od.267/substitution stocks. On the contrary, a quite regular meiosis ( $21^{\text{II}}_{\text{C}}$  the highest association) in the  $F_1$  plants (Fig. 1 d) and a high level of pairing were observed in the Od.267/E217\_97 test cross.

Thereby, the original primary introgression stocks studied have (1B)1R wheat-rye chromosome substitution or 1BL.1RS translocation. That was determined with PCR-markers (Table 2) and confirmed cytologically (Fig. 1). The translocation was contributed by the collection sib-strain H74\_90–245 or H74\_90–258 and originated from cv. Avrora. Therefore, the rye 1RS

Table 2

Results of plant pathological evaluations and PCR-analysis of the introgression stocks

Introgression stock <sup>a</sup>	Resistance to		Xrems 1303 (1RS)	SR1R 003 (1RS)	<i>ω</i> -seca- <i>lin</i> -P3/P4 (1RS)	Xgwm 18 (1BS)	Xgwm550 (1BS)	Xgwm 140 (1BL)	Xgwm 153 (1BL)	Tag-lut (1AS)	Xgwm357 (1AL)
	Leaf rust	Stem rust									
E200_97-1	MS-R	VR	+ <sup>b</sup>	+	+	-	-	+	+	+	+
E200_97-2	VR(S)	VR	+	+	+	-	-	+	+	+	+
E217_97	VS-S	VS	-	-	-	+	+	+	+	+	+
H242_97-1	R-VR	VR	+	+	+	-	-	+	+	+	+
H242_97-2	R-VR	VR	+	+	+	-	-	+	+	+	+
H273_97	VS-MS	MS	+	+	+	-	-	-	-	+	+
H274_97	S-MS	MS	+	+	+	-	-	-	-	+	+
H269_97-5	S-MS	MS	+	+	+	-	-	-	-	+	+
CWxs	S	MR	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CWxr	MR	MR	+	+	+	-	-	+	+	+	+

<sup>a</sup> H — Hostianum, E — Erythrosperrum; <sup>b</sup> + primer amplification product presence (irrespective of the polymorphism), — primer amplification product absence.

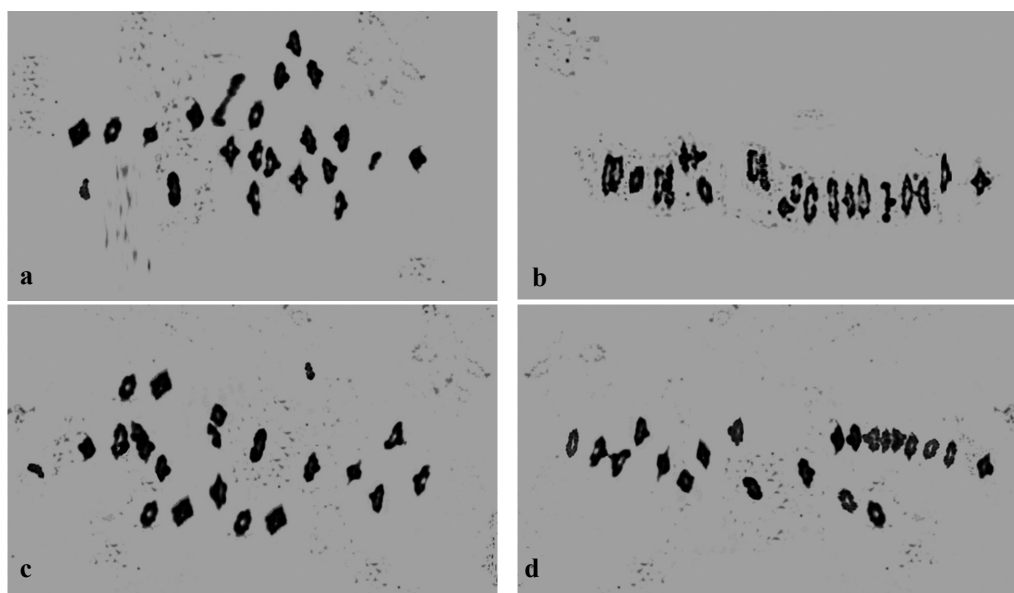


Fig. 1. The highest chromosome associations at meiotic MI of F1 hybrids derives in test-crosses (590 $\times$ ): a) H274\_97/Od.267-19<sup>c</sup>+1<sup>o</sup>+2; b) Od.267/H242\_97-2-20<sup>c</sup>+1<sup>o</sup>; c) H273\_97/Od.267-20<sup>c</sup>+2; d) Od.267/E217\_97-21<sup>c</sup>

chromosome originated from Petkus rye. The intact rye chromosome 1R for the substitution was contributed by triticale (8x) cv. AD825 and, therefore, originated from rye cv. Voronezhskaya SHI.

Depending on the rye chromosome arm pedigree the stocks were considerably different for resistance to leaf and stem rusts (Table 2). The stocks E200\_97–1, E200\_97–2, H242\_97–1 and H242\_97–2, carrying 1BL.1RS translocation from cv. Avrora, had a high resistance to both diseases with a preference of E200\_97–2 under E200\_97–1. However, the stock E200\_97–2, that has been confirming the rust resistance for years, segregated susceptible plants in 2013 and has been subjected to individual selection. E217\_97 was susceptible. The substitution stocks, carrying 1R chromosome from rye Voronezhskaya SHI, were moderately defeated by stem rust (MS) and did not have any leaf rust resistance (S-MS). The introgression stocks CWXs and CWXr were isolated from the same cross H273\_97/H242\_97–2 [Kozub, unpublished] as, respectively, susceptible and resistant (MR) to leaf rust. Both sib-stocks contain a long arm of 1B chromosome and a short arm of 1R chromosome (Table 2), so, carrying an original 1BL.1RS recombinant translocation. The stocks are susceptible to powdery mildew [Kozub 2014, personal communication] and were moderately resistant to stem rust in weak infectious background of 2014.

13  $F_4$  hybrid families from a cross Kuyal'nik/Pavon MA1 were studied by using PCR-analysis [10]. Among them 6 families had a Dr. Lukaszewski modified 1BL.1RS translocation [13] with wheat locus *Gli-B1* and without rye locus *Sec1* and one more was heterogeneous. 4 (6.6 % of 61 studied)  $F_4$  hybrid plants were found to have a recombination because of pairing between short arms of modified 1BL.1RS translocation and intact wheat chromosome 1B. Of them 3 recombinants carried the modified wheat-rye translocation with allele *Gli-B1b* (is preferred for a high flour quality) from cv. Kuyal'nik instead of Pavon MA1's *Gli-B1d* allele (determined a low flour quality).

Cytological observations, generally, supported the heterogeneity of the hybrid families. 4 of 8 evidently studied plants from 4 resistant to leaf rust families had  $20^{\text{II}}_{\text{c}}+1^{\text{II}}_{\text{o}}$  as the highest chromosome association and probably were heterozygous for the translocation. The rest plants had  $21^{\text{II}}_{\text{c}}$  and were homozygous. However, no PMC (of 253 studied) with  $21^{\text{II}}_{\text{c}}$  as the highest meiotic association proving the pairing between modified 1RS and 1BS chromosomes were observed at MI of the  $F_1$  hybrid plants Kuyal'nik/Pavon MA1, as well as of 730 PMCs at MI of the  $F_4$  plants heterozygous for the translocation.

The  $F_4$  recombinant plants were isolated and  $F_5$  families from them together with parental forms were verified for resistance to rusts. In 2013, descendants of the recombinant plant 3–4\_13 without the rye translocation (*Xrems1303* amplification product absence) were susceptible to leaf rust, but segregated plants moderately resistant to stem rust. The other recombinants carried the modified translocation (*Xrems1303* amplification product presence), as well as the allele *Gli-B1b* from cv. Kuyal'nik, and their progenies were moderately resistant to leaf rust, but defeated by stem rust (Table 3). However, in the progeny of the plant 8–2\_13 a resistant to stem rust segregant was also found. As a result, the plants with reactions 'MS' or 'MR' to leaf and 'MR' or 'R' to stem rust were isolated respectively in progenies of recombi-



nants 3–4\_13 or 8–2\_13, and 2 recombinant stocks with different level of resistance to both diseases were derived in 2014.

Table 3

Results of plant pathological evaluations and PCR-analysis of progenies of the F<sub>4</sub> recombinant plants isolated

Line or F <sub>5</sub> family	Resistance to		<i>Xrems1303</i> (1RS)	<i>Xgwm18</i> (1BS)	<i>Xgwm</i> 550 (1BS)	<i>GliB1.b</i> (1BS)	<i>GliB1.d</i> (1BS)
	Leaf rust	Stem rust					
Kuyal'nik	VS-S	VS-S	– <sup>b</sup>	+	+	+	–
Pavon MA1	R	MR	+	–	–	–	+
3–4_13	S(MS)-MS <sup>a</sup>	S;MR-MR	–	+	+	–	+
8–2_13	MR	MS(R)-R	+	–	–	+	–
8–3_13	MR	VS	+	–	+	+	–
10–3_13	MR	VS	+	–	–	+	–

<sup>a</sup> S(MS) — majority of plants had 'S' reaction and single plants had 'MS' reaction, S;MR — segregation; <sup>b</sup> + primer amplification product presence, — primer amplification product absence.

Generally, the gene *Sr31* was determined to be effective in South Ukraine [17], and the 1BL.1RS translocation from cv. *Avrora* was the source of the resistance of the studied cultivars, introgression stocks and hybrid families to stem rust. Unfortunately, the gene *Lr26* was determined to be ineffective [18], but usually the lines with the translocation confirmed any level of leaf rust resistance. Therefore, the presence of the 1BL.1RS translocation is thought to be a factor supporting other genes for the resistance. Due to their agronomic advantages, the translocations with 1RS are more widespread in wheat cultivars from Forest-Steppe zone of Ukraine, but not from South. In South Ukraine, the 1RS chromosome has not been used in wheat breeding, because of traditional for PBGI — NCSCl storage protein composition selection for the high technological quality [19]. However, a program for the wheat-rye translocation involvement in wheat breeding for disease resistance has been started at the end of last century [20], and the cvs *Vikhovanka*, *Knyaginya Ol'ga* and *Zhitnitsa* (with 1AL.1RS translocation, leaf and stem rust resistance and middle quality) and *Schedrist'* (with 1BL.1RS translocation and low quality) have been developed [21]. Because leaf-disease resistance of rye chromosome 1RS had been overcome by new mildew and leaf rust races, breeders may select only for stem rust resistance in order to use the translocations in breeding programs. This is of great advantage, since cytological, biochemical or molecular-genetic methods is not needed for the successful introduction of the desired segment of rye chromosome 1R into bread wheat.

**Conclusion.** The use of molecular-genetic and cytological analysis permit to identify the 1AL.1RS and 1BL.1RS translocation, 1B-1R wheat-rye chromosome substitution, particularly modified 1BL.1RS translocation with locus

*Sec1* replaced by wheat *Gli-B1* locus, in the original introgression stocks, cultivars and F<sub>4</sub> hybrid families. The 1AL.1RS translocation was contributed by the collection cultivars, derived from wheat cv. Amigo and originated from rye cv. Insave. The 1BL.1RS translocation, including the modified 1BL.1RS translocation, contributed by cv. Aurora and originated from Petkus rye. All these translocations were suggested to support a resistance to leaf rust caused by the other Lr genes and to determine confident resistance to stem rust. The intact rye chromosome 1R for the substitution was contributed by triticale (8x) cv. AD825 and originated from rye cv. Voronezhskaya SHI. The substitution stocks were susceptible to leaf and moderately susceptible or low resistant to stem rusts because of another origination of the 1R chromosome.

#### REFERENCES

1. McIntosh R. A. Catalogue of gene symbols for wheat / R. A. McIntosh, Y. Yamazaki, J. Dubcovsky, J. Rogers, [et al.] // 12th Int. Wheat Genet. Symp., Yokohama (Japan), 8–13 September 2013 : proc. / KOMUGI, Wheat Genetic Resources Database. [E-resource]. — Available online: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneSymbol.pdf>
2. Singh N. K. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rusts and  $\omega$ -secalins on the short arm of rye chromosome 1R / N. K. Singh, K. W. Shepherd, R. A. McIntosh // TAG. — 1990. — Vol. 80 (5). — P. 609–616.
3. Goncharov N. P. Comparative genetics of wheats and their related species / N. P. Goncharov // Novosibirsk (Russia) : Siberian University Press, 2002. — 252 p. (in Russian with English summary).
4. Rabinovich S. V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. / S. V. Rabinovich // Euphytica. — 1998. — Vol. 100 (1). — P. 323–340.
5. Stepanenko A. I. Detection of wheat-rye translocations by means of DNA markers and electrophoresis of proteins / A. I. Stepanenko, O. M. Blagodarova, B. V. Morgun, T. V. Chugunkova, O. I. Rybalka // Bull. Ukr. Soc. Genet. Breed. (Kiev, Ukraine). — 2014. — Vol. 12, № 1. — P. 78–83 (in Ukrainian with English summary).
6. Motsnyy I. I. Application of PCR markers for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocations and (1B)1R substitutions / I. I. Motsnyy, L. V. Sudarchuk, A. V. Galaev, S. V. Chebotar // Factors of experimental evolution of organisms : IX Int. Sci. Conf. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr., Uman (Ukraine), 22–26 September 2014 : coll. sc. papers. — Kiev (Ukraine) : Logos, 2014. — Vol. 15. — P. 264–268.
7. Kozub N. A. Mapping a new secalin locus on the rye 1RS arm / N. A. Kozub, I. I. Motsnyy, I. A. Sozinov, Ya. B. Blume, A. A. Sozinov // Cytology and Genetics (Allerton Press, Inc.). — 2014. — Vol. 48, No. 4. — P. 203–207.
8. Rybalka A. I. Wheat quality and its improvement / A. I. Rybalka // Kiev (Ukraine) : Logos, 2011. — 495 p. (in Ukrainian with English summary).
9. Toporash M. K. Identification of introgression forms with the 1RS.1BL translocation by PCR-detection of *Sec-1* locus / M. K. Toporash, I. I. Motsnyy, S. V. Chebotar // Science in information space (Biological Sciences) : X Int. Sci.-Pract. Conf., 20–21 November 2014 : proc. — Dnepropetrovsk (Ukraine) : Bila K. O., 2014. — Vol. 2. — P. 3–6. (in Ukrainian).

10. Sudarchuk L. V. Detection centric translocation  $1R_S.1B_L$  by using molecular markers in breeding material of soft wheat / L. V. Sudarchuk, S. V. Chebotar, A. I. Rybalka, Yu. M. Sivolap // Bulletin of ONU (Odessa, Ukraine). — 2010. — Vol. 15, Is. 6. — P. 39–48 (in Ukrainian with English summary).
11. Sivolap Yu. M. Molecular markers and breeding / Yu. M. Sivolap // Cytology and Genetics (Kiev, Ukraine). — 2013. — Vol. 47, № 3. — P. 71–80. (in Russian with English summary).
12. Badaev N. S. Differences in rye chromosome structure in the karyotype of triticale / N. S. Badaev, E. D. Badaeva, N. G. Maximov, D. K. Volkov, A. V. Zelenin // Proc. Ac. Sci. USSR (Dokl. AN SSSR, Moscow: Nauka). — 1982. — Vol. 267, № 4. — P. 953–956. (in Russian).
13. Lukaszewski A. J. Manipulation of the  $1RS.1BL$  translocation in wheat by induced homoeologous recombination / A. J. Lukaszewski // Crop Sci. — 2000. — Vol. 40 (1). — P. 216–225.
14. Methods of breeding and evaluation of the stability of wheat and barley disease in the CMEA member countries / [L. Babayants, A. Mesterhazy, Ph. Wehter et al.]; res. ed. S. Birukov, A. Kovachic. — Prague, 1988. — 321 p.
15. Using PCR analysis in genetic and breeding research. Scientific-methodical management / by ed. Yu. M. Sivolap. — Kiev : Agrarian Sciences, 1998. — C. 8–33. (in Russian with English summary).
16. Sivolap Yu. M. Detection of  $1RS.1AL$ ,  $1RS.1BL$  and modified translocations for the  $1RS$  chromosome at bread wheat breeding forms. Methodical recommendations / Yu. M. Sivolap, S. V. Chebotar, L. V. Sudarchuk. — Odessa (Ukraine), 2011–13 p. (in Ukrainian).
17. Babayants L. T. Racial structure *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn. and resistance of wheat with effective *Sr*-genes in the steppe of Ukraine / L. T. Babayants, O. V. Babayants, A. A. Vasiliev // Coll. Sci. Papers of PBGI — NCSCI (Odesa, Ukraine). — 2004. — Is. 6 (46). — P. 261–268. (in Ukrainian with English summary).
18. Babayants O. V. Genetic determination of wheat resistance to leaf rust (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*) derived from *Aegilops cylindrica*, *Triticum erebuni*, Amphiploid 4 / O. V. Babayants, L. T. Babayants, A. F. Gorach, O. A. Vasiliev, V. A. Traskovetskaya, V. A. Paliasnyi // Coll. Sci. Papers of PBGI — NCSCI (Odesa, Ukraine). — 2010. — Is. 16 (56). — P. 185–202. (in Ukrainian with English summary).
19. Chebotar S. Molecular-genetic analysis of Ukrainian bread wheat gene pool / S. Chebotar // Int. Plant Breed. Congress, 10–14 November 2013 : abstr. book. — Antalya (Turkey), 2013. — P. 624.
20. Topal N. N. Adaptive properties and productivity of varieties and lines with wheat-rye translocations in the south of Ukraine / N. N. Topal // Coll. Sci. Papers of PBGI — NCSCI (Odesa, Ukraine). — 2014. — Is. 23 (63). — P. 88–99. (in Ukrainian with English summary).
21. Litvinenko N. The effects of wheat-rye translocations  $1AL/1RS$  and  $1BL/1RS$  on grain quality of bread winter wheat varieties / N. Litvinenko, N. Topal // Scientific Journal «ScienceRise». — 2015. — № 3 (8). — P.82–87. (in Ukrainian with English summary).

УДК 633.11:631.52:577.21:576.316:633.14

**Моцний І. І., Сударчук Л. В., Чеботар С. В.****МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПШЕНИЧНО-ЖИТНІХ ХРОМОСОМНИХ ЗАМІЩЕНЬ І ТРАНСЛОКАЦІЙ У СОРТІВ І ИНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ**

1AL.1RS і 1BL.1RS транслокації, (1B)1R пшенично-житне заміщення, а також модифікована 1BL.1RS транслокація з локусом *Sec1*, заміщеним локусом *Gli-B1* пшениці, ідентифіковані за допомогою молекулярно-генетичного і цитологічного аналізу у нових сортах пшениці, оригінальних інтрогресивних лініях і гібридних сім'ях  $F_4$ . Досліджені транслокації, очевидно, підсилюють стійкість до бурої іржі, спричинену *Lr* генами, які не мають до них стосунку, і визначають певну стійкість до стеблової іржі. Заміщені лінії були сприйнятливі до листової і помірно сприйнятливі або слабо стійкі до стеблової іржі завдяки відмінному від пшенично-житних транслокацій походженню хромосоми 1RS.

УДК 633.11:631.52:577.21:576.316:633.14

**Моцный И. И., Сударчук Л. В., Чеботарь С. В.****МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ХРОМОСОМНЫХ ЗАМЕЩЕНИЙ И ТРАНСЛОКАЦИЙ В СОРТАХ И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЯХ ПШЕНИЦЫ**

1AL.1RS и 1BL.1RS транслокации, (1B)1R пшенично-ржаное замещение, а также модифицированная 1BL.1RS транслокация с локусом *Sec1*, замещенным локусом *Gli-B1* пшеницы, идентифицированы с помощью молекулярно-генетического и цитологического анализа в новых сортах пшеницы, оригинальных интрогрессивных линиях и гибридных семьях  $F_4$ . Изученные транслокации усиливают устойчивость к бурой ржавчине, вызванную *Lr* генами, не имеющими к ним отношения, и определяют надежную устойчивость к стеблевой ржавчине. Замещенные линии были восприимчивы к листовой и умеренно восприимчивы или слабо устойчивы к стеблевой ржавчине из-за отличного от пшенично-ржаных транслокаций происхождения хромосомы 1RS.

УДК 577.21:575.113:632.4

О. В. ГАЛАЄВ, к. б. н., пров. наук. співроб.  
Л. Т. БАБАЯНЦ, к. с.-г. н., пров. наук. співроб.  
СГІ–НЦНС, Одеса  
e-mail: galaev7@ukr.net

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.)

*Подаються результати застосування молекулярно-генетичних маркерів для маркування та картування нового гена стійкості до твердої сажки, що перенесений від Ae. cylindrica в геном пшениці, ідентифікації головних расоспецифічних генів стійкості до листової та стеблової іржі у 80 сортах та 15 лініях пшениці м'якої, які створені з 1991 року у СГІ–НЦНС та виявлення гена мультипатогенної нерасоспецифічної стійкості Lr34/Yr18/Pm38 у сортів пшениці української і російської селекції. У вивчених сортів та ліній виявлені гени Lr21, Lr24/Sr24, Lr26/Sr31 (1BL.1RS), Lr34/Yr18/Pm38 та Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup> (1AL.1RS) окремо і в комбінаціях. Показано, що сорти та лінії з комбінацією генів Lr24+Lr34+Lr<sup>Amigo</sup>, Lr21+Lr24+Lr34, Lr24+Lr<sup>Amigo</sup> та Lr21+Lr24+Lr<sup>Amigo</sup> забезпечують ефективний і надійний рівень стійкості на Півдні України і можуть використовуватись в якості донорів в селекційних програмах України.*

Ключові слова: пшениця м'яка, гени стійкості, тверда сажка, молекулярні маркери, Lr-гени, чужорідний генетичний матеріал.

**Вступ.** Поліпшення стійкості до патогенних грибків — одне з головних завдань, яке стоїть перед селекціонерами пшениці в усьому світі. Бура листовая, стеблова та жовта іржа, борошниста роса й тверда сажка є основними шкодочинними захворюваннями пшениці в усіх зонах України, що призводять до регулярної втрати врожаю та зниження його якості через мікотоксини. Захист рослин від патогенів здійснюється трьома способами: 1) застосуванням агротехнічних заходів; 2) використанням широкого спектру хімічних препаратів; 3) селекцією на стійкість рослин. Внесення хімічних засобів захисту посівів призводить до збільшення пестицидного навантаження на довкілля. Крім того, в популяціях шкідливих організмів накопичуються генотипи з мутаціями резистентності до фунгіцидів, що знижує ефективність їхнього застосування і потребує розробки й застосування нових препаратів. Отож, менш коштовним та екологічно чистим способом боротьби з хворобами й шкідниками є створення і впровадження стійких сортів [1].

Пошук джерел стійкості, маркерування та ідентифікація генів, що відповідають за стійкість рослин до захворювань, є основою технології створення нових сортів багатьох сільськогосподарських культур з високим рівнем стійкості до різних фітозахворювань. Стратегія селекції пшениці м'якої на стійкість до грибкових захворювань передбачає використання нових та відомих і раніше ефективних генів від диких співродичів пшениці. Доволі значного поширення набула практика використання відомих головних генів і їхніх комбінацій (пірамідкування), що пов'язано з наявністю молекулярних маркерів до цих генів і, відповідно, з можливістю використання їх у MAS (marker-assisted selection; добір за допомогою молекулярних маркерів). Залучання в селекційний процес нових генів стійкості потребує проведення додаткової тривалої і коштовної роботи з пошуку генетичних маркерів, які зчеплені або асоційовані з цільовими геном/генами.

До пірамідкування можна вдаватися і при використанні подоланих головних генів. У цьому випадку прийнятний рівень стійкості досягається за рахунок залишкових ефектів на стійкість, які проявляються кожним подоланим геном і їхньою адитивною дією [2]. Згідно з літературними даними, тривалість збереження стійкості сортів забезпечується, коли вертикальна (расоспецифічна) стійкість базується на використанні головних генів і поєднується з горизонтальною (нерасоспецифічною) стійкістю [3, 4]. Створення сортів з такою стійкістю більш складний і тривалий процес, що передбачає залучення молекулярних маркерів.

Використання відомих головних генів стійкості, до яких розроблені молекулярні маркери, полегшує їхнє комбінування в одному сорті і забезпечує майже ідеальну генетичну стійкість, яка знижує ймовірність того, що весь комплекс генів стійкості, наявний у сорті, буде швидко подоланий незалежними мутаціями патогена. У зв'язку з цим розробка ДНК-технології добору генотипів м'якої пшениці з певними комплексами алелів генів стійкості до основних шкодочинних захворювань пшениці є надто актуальною.

**Мета** даного дослідження полягала у вивченні можливостей використання молекулярних маркерів для: 1) маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного з *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці; 2) ідентифікації генів стійкості до листової та стеблової іржі у сортів та ліній пшениці м'якої озимої селекції СГІ; 3) ідентифікації алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38*, у 228 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження; 4) виявлення комбінації генів, що забезпечують стійкість до листової іржі, у сортів та ліній пшениці м'якої озимої в умовах Півдня України.

**Матеріали і методи.** *Рослинний матеріал.* Матеріалом для маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці, були зразки місцевої популяції

виду *Ae. cylindrica* Host (CCDD,  $2n = 28$ ), рекурентний сорт м'якої пшениці Одеська напівкарликова і лінія Лютесценс 23397, інтрогресивна лінія пшениці 5/55–91 — [(Одеська напівкарликова х *Ae. cylindrica*) х Одеська напівкарликова]  $F_9$  ( $2n = 42$ ), інтрогресивна лінія пшениці 378/2000 — (5/55–91 х Одеська напівкарликова)  $F_9$  ( $2n = 42$ ), популяції  $BC_3F_2$  та  $BC_3F_3$ , що отримані від схрещування 378/2000 х Лютесценс 23397.

Ідентифікували гени стійкості до листової та стеблової іржі *Lr9*, *Lr19*/*Sr25*, *Lr21*, *Lr24*/*Sr24*, *Lr26*/*Sr31*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr<sup>Amigo</sup>*/*Sr<sup>Amigo</sup>* у 80 сортів пшениці м'якої озимої, які створені з 2000 року у СГІ та 15 ліній отриманих від міжвидових схрещувань 5/55–91, 5/20–91, 378/2000, КП 3/12, КП 15/12, КП 16/12, КП 28/12, КП 42/12, КП 64/12, КП 82/12, КП 83/12, КП 84/12, КП 153/12, СП 519/12, СП 520/12, які створено у відділі фітопатології та ентомології СГІ–НЦНС.

Матеріалом для ідентифікації алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38*, були 228 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження.

Для виявлення комбінації генів, що забезпечують стійкість до листової іржі в умовах Півдня України, досліджували сорти Вихованка та Княгиня Ольга і 15 ліній, отриманих від міжвидових схрещувань.

Позитивним контролем для визначення відомих генів були використані майже ізогенні лінії сорту Thatcher з генами стійкості до листової іржі *Lr9* (TcLr9), *Lr19* (TcLr19), *Lr21* (TcLr21), *Lr24* (TcLr24), *Lr26* (TcLr26), *Lr34* (TcLr34), *Lr37* (TcLr37) та сорти/лінії носії генів стійкості: Amigo (*Lr<sup>Amigo</sup>*/*Sr<sup>Amigo</sup>*), *Ae. squarrosa* KS86WGRC02 (*Lr39*), *Ae. squarrosa* KS91WGRC11 (*Lr42*), ОК75Abd-386-Oklahoma (*Sr24*), ОК75Abd-380-Oklahoma (*Sr25*), які надані National Plant Germplasm System (США).

**Виділення ДНК.** ДНК виділяли з 5-денних паростків, зеленого листа або сухого зерна з застосуванням СТАВ-буфера [5].

**Умови ампліфікації ДНК та візуалізації продуктів ампліфікації** при маркеруванні та картуванні гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці, описано Галаєвим та ін. [6], при ідентифікації генів стійкості до листової та стеблової іржі наведено у роботі Гораша та ін. [7], при ідентифікації алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38*, описано Галаєвим та ін. [8].

**Фітопатологічний аналіз.** Стійкість на дорослих рослинах оцінювали за 9-бальною шкалою [9]. Ефективність генів стійкості до листової іржі вивчали на стадії проростків у теплиці і на дорослих рослинах у польових умовах разом з науковими співробітниками відділу фітопатології та ентомології СГІ за їхніми методиками. Оцінювали стійкість до листової іржі на стадії проростків за шкалою: VR — дуже стійкі, R — стійкі, MR — помірно стійкі, MS — помірно чутливі, S — чутливі, VS — дуже чутливі.

Статистична обробка результатів — за загальноприйнятими методиками [10].

**Результати й обговорення. 1. Маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці.** Однією з стратегій селекції м'якої пшениці на стійкість до грибкових захворювань є залучення нових головних генів стійкості від диких співродичів пшениці, що потребує попереднього маркування цільового гена/генів.

Маркування чужорідних генів стійкості потребує декількох етапів: 1) пошук поліморфних локусів ДНК між батьківськими формами; 2) детекція інтрогресивних фрагментів у лінії пшениці; 3) виявлення стабільних інтрогресивних фрагментів; 4) скринінг популяцій, що розщеплюються, з використанням МС маркерів до стабільних інтрогресивних фрагментів для виявлення їхнього зчеплення з геном (генами) стійкості до фітопатогенів, перенесених від дикого співродича.

*Молекулярно-генетичний поліморфізм генотипів батьківських форм.* Для пошуку молекулярно-генетичного поліморфізму генотипів батьківських форм сорту Одеська напівкарликова та виду *Ae. cylindrica* використано 115 пар праймерів до 148 МС локусів пшениці. За результатами SSR-аналізу за 93 мікросателітними (МС) локусами пшениці (62,8 %) виявили продукти ампліфікації у *Ae. cylindrica*. Показана можливість використання МС маркерів м'якої пшениці для картування геному *Ae. cylindrica* [11]. 63 МС локуси (42,0 %) дозволили виявити поліморфізм між пшеницею та *Ae. cylindrica* [12, 13]. Виявлені поліморфні між батьківськими формами МС локуси є основою для детекції чужорідного генетичного матеріалу в гібридному геномі.

*Детекція інтрогресивних фрагментів у лінії пшениці 5/55–91.* ПЛР-аналіз з використанням 63 МС маркерів пшениці вдалося виявити у лінії 5/55–91 16 інтрогресивних фрагментів (табл. 1) [14]. Останнім часом існує проблема можливості переносу генів стійкості до гербіцидів від трансгенної пшениці до *Ae. cylindrica* за спонтанної гібридизації в польових умовах. У зв'язку з цим ряд авторів [15] пропонує вводити трансгени в негомологічні до *Ae. cylindrica* геноми А та В пшениці, що запобіжить потоку генів від трансгенної пшениці до диких видів. Однак у наших роботах виявлені інтрогресивні фрагменти у гібридних лініях не тільки в геномі D пшениці гомологічному геному D *Ae. cylindrica*, але і в негомологічних геномах А та В, що свідчить про можливість інтрогресії ДНК геномів С та D *Ae. cylindrica* в м'яку пшеницю і навпаки, — ДНК з геномів А, В та D м'якої пшениці може бути інтрогресована в *Ae. cylindrica* [13].

*Стабільність інтрогресивних фрагментів.* МС маркери, які виявили інтрогресивні фрагменти у лінії 5/55–91, було використано для дослідження її бекросного нащадка лінії 378/2000. За дванадцяти МС локусами виявлено стабільну інтрогресію (табл. 1); за даними маркерами можна виявити продукти інтрогресії зчеплених з геном (генами) стійкості до фітопатогенів, що перенесені від егілопсу до пшениці [12, 14].



Таблиця 1

Мікросателітні маркери, що виявили фрагменти геному егілопсу в геномах  
бекросних нащадків пшенично-егілопних гібридів

Локус	Локалізація	Алель, п. н.	Лінія	
			5/55–91 (BC <sub>1</sub> F <sub>9</sub> )	378/2000 (BC <sub>2</sub> F <sub>5</sub> )
Taglut	1AS	126	+	+
Barc17	1AL	300	+	+
Barc213	1AL	170	+	+
Xgwm18	1BS	196	+	+
Xgwm259	1BL	99	+	+
Xgwm33	1DS	null	+	+
Xgwm 619	2BL	184	+	–
Xgwm389	3BS	114	+	+
Xgwm314	3DL	171	+	+
Xgwm383	3DL	218	+	–
Xgwm499	5BL	140	+	+
Xcfd7	5BL	190	+	+
Xbarc88	5BL	94	+	+
Xgwm182	5DL	167	+	+
Xgwm427	6AL	null	+	–
Xgwm617	6AL	null	+	–

Примітка: «+» — присутність інтрогресивного алеля, «–» — відсутність інтрогресивного алеля.

*Успадкування стійкості до твердої сажки.* Фенотиповий прояв стійкості до твердої сажки визначали на 170 рослинах популяції BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, що отримані від схрещування 378/2000 x Лютесценс 23397. Стійкість успадковувалась як моногенно домінантна ознака 3:1, з розщепленням у F<sub>2</sub> 138 стійких та 32 чутливих рослин ( $\chi^2 = 3,16$ ). З 138 стійких рослин F<sub>2</sub> в F<sub>3</sub>: 34 сім'ї — гомозиготні за стійкістю до твердої сажки та 104 — гетерозиготні. Однак співвідношення класів розщеплення F<sub>2</sub> не відповідає очікуваному 1:2:1 ( $\chi^2 = 7,66$ ). В даному випадку спостерігається відхилення теоретичних класів від емпіричних: нестача обох типів гомозигот та надлишок гетерозигот. Чинник, що спотворює розщеплення, можливо, пов'язаний з розташуванням гена стійкості в складі чужорідної транслокації, внаслідок чого можуть виникати певні відхилення у співвідношенні розщеплення за досліджуваною ознакою.

*Молекулярне маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від Ae. cylindrica в м'яку пшеницю.* При генотипуванні рекомбінантів BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> і фенотипового прояву стійкості до твердої сажки за допомогою програми «JOINMAP» ver. 2.0 з картуючою функцією Козамбі [16] визначили відстань MC маркера Xgwm259 від гена стійкості до твердої сажки, яка склала на хромосомній карті пшениці 7,6 сМ (рис. 1). Даний маркер можна використати в селекції на поліпшення генотипів пшениці щодо стійкості до твердої сажки [6, 17].

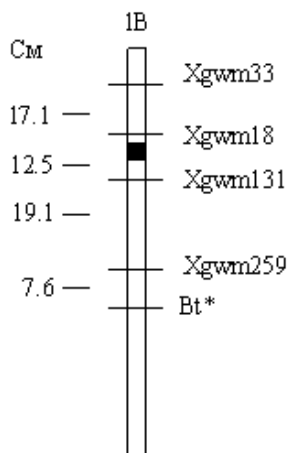


Рис. 1. Генетична карта 1В хромосоми пшениці з локалізацією інтрогресивного гена стійкості до твердої сажки

**2. Ідентифікація генів стійкості до листової та стеблової іржі в сортах та лініях пшениці м'якої озимої селекції СГІ.** Пошук молекулярних маркерів, зчеплених з новим ефективним геном/генами стійкості до фітопатогенів, це досить тривала та коштовна робота. Також доволі рідко вдається використати нові гени від диких видів з комерційною метою через те, що інтрогресивні ділянки хромосом, крім корисних генів, часто містять генетичний матеріал, який може негативно впливати на прояв агрономічно цінних ознак.

Тому найчастіше в селекції на стійкість як донорів використовують сорти та лінії з відомими ефективними головними генами стійкості, щодо яких розроблені молекулярні маркери.

Через незначну кількість інформації, що стосується ідентифікації ефективних генів стійкості у сортів пшениці української селекції, актуальним є розширення відповідних досліджень з застосуванням молекулярних маркерів.

За даними відділу фітопатології та ентомології СГІ в Україні високо-ефективними генами стійкості до листової та стеблової іржі є *Lr9*, *Lr19/Sr25*, частково ефективними — *Lr24/Sr24*, *Lr37/Sr38*, *Lr39 (=Lr41)*, *Lr42* і такі, що забезпечують помірну стійкість, — *Lr26/Sr31* (1BL.1RS) [18], *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>* (1AL.1RS) [18, 19, 20].

Ідентифікацію генів досліджуваної стійкості *Lr9*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31*, *Lr37/Sr38*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>* проводили у 80 сортів та 15 ліній пшениці м'якої озимої, створених з 2000 року у СГІ за допомогою молекулярних маркерів [7]. У зв'язку з тим, що в якості джерел стійкості при створенні сортів Княгиня Ольга, Вихованка та відповідних ліній використовували види *Triticum tauschii*, *Aegilops cylindrica*, *Triticum erebuni*, які мають D геном, проводили ідентифікацію генів *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*. Ідентифікували також ген *Lr53* у ліній, отриманих від міжвидових схрещувань за участі *Triticum dicoccoides*.

У результаті дослідження виявлено, що в сортах та лініях, створених з 1991 року у відділі фітопатології та ентомології СГП, не ідентифіковані гени *Lr9*, *Lr19/Sr25*, *Lr37/Sr38*, *Lr39* та *Lr42*. У сортах Княгиня Ольга, Вихованка та 15 лініях не виявлено також генів *Lr22a*, *Lr32* та *Lr53*. Серед вивчених сортів та ліній виявлені носії генів *Lr21*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31* (1BL.1RS) та *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>* (1AL.1RS) окремо і в комбінації: Щедрість (*Lr26/Sr31*); КП 153/12 (*Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>*, *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>+Lr24/Sr24*); Княгиня Ольга, Вихованка одеська, КП 3/12, КП 15/12, КП 16/12, КП 64/12, СП 519/12, 5/55–91, 5/20–91 (*Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>+Lr24/Sr24*); КП 28/12 та КП 42/12 (*Lr21*, *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>+Lr24/Sr24*); КП 82/12 (*Lr21+Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>+Lr24/Sr24*); КП 83/12 (*Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>*, *Lr21+Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>*, *Lr21+Lr24/Sr24*, *Lr21+Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>+Lr24/Sr24*); КП 84/12 (*Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>*, *Lr21+Lr24/Sr24*, *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup> + Lr24/Sr24*); СП 520/12 (*Lr24/Sr24*, *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>+Lr24/Sr24*). На рисунку 2 показано результати ампліфікації при використанні універсального маркера *Xscm9*, який дозволяє, за даними Weng et al. [19], одночасно виявляти транслокації 1BL.1RS від сорту Кавказ і 1AL.1RS від сорту Amigo.

Отже, в результаті проведеного скринінгу за наявністю ефективних генів стійкості до листової та стеблової іржі виявлені сорти та лінії — носії чужорідних генів і їхніх комбінацій, які можна буде використовувати в селекції.

Однак досліджені сорти пшениці, в яких не виявлено ефективних в Україні генів стійкості, все ж володіють польовою стійкістю, яка, скоріш за все, забезпечується залишковими ефектами стійкості, які проявляються кожним подоланим геном та їхньою адитивною дією, а також поєднанням з генами загальної нерасоспецифічної стійкості.

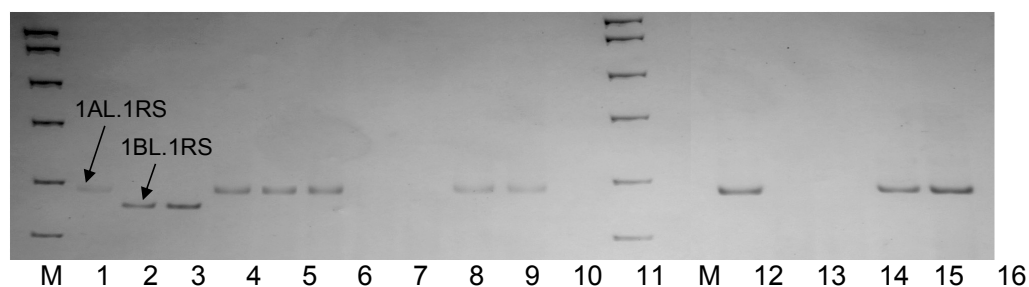


Рис. 2. Електрофореграма в 12 % неденатуруючому ПААГ продуктів ампліфікації ДНК сортів і ліній СГП з праймерами до локусу *Xscm9*: М — маркер молекулярної маси *pUC19/MspI*; 1– Amigo, 2, 3 — Щедрість; 4–6 — Вихованка одеська; 7–8 — Антонівка; 9–10 — Княгиня Ольга; 11–12 — Зорепад; 13–17 — СП 520/12

### 3. Ідентифікація алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної нерасоспецифічної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38* у сортів пшениці української і російської селекції.

Останнім десятиріччям популярності набуває стратегія селекції пшениці м'якої на стійкість до грибкових захворювань, яка базується на поєднанні у сортах генів вертикальної (расоспецифічної) та горизонтальної

(нерасоспецифічної) стійкості, що забезпечує високий рівень стійкості протягом тривалого часу.

Незважаючи на те, що расоспецифічна стійкість забезпечує високоєфективний захист, проте стійкість, яка не ґрунтується на специфічному упізнаванні між господарем і збудником, часто виявляється більш стабільною та довготривалою. Нерасоспецифічна стійкість характеризується не надчутливістю, а частковою стійкістю, пов'язаною з тривалим латентним періодом розвитку захворювання [21, 22]. Найбільш важливе значення в селекції пшениці мають локуси загальної стійкості до листової та жовтої іржі і борошнистої роси *Lr34/Yr18/Pm38* (локалізовано на хромосомі 7DS) і *Lr46/Yr29/Pm39* (локалізовано на хромосомі 1BL), оскільки вони дозволяють одночасно добирати нерасоспецифічну і потенційно тривалу стійкість до трьох найбільш важливих біотрофних патогенів у пшениці, що завжди успадковується разом, як одна менделююча ознака [23, 24]. Локус *Lr34/Yr18/Pm38* в комбінації з іншими расоспецифічними генами забезпечує високий рівень стійкості протягом багатьох десятиріч [3,4], також асоційований з толерантністю до вірусу жовтої карликовості ячменю *Bdv1* [25, 26]. У зв'язку з цим набуває великого значення *генотипування сортів пшениці м'якої різного географічного походження за алелями локусу csLV34 для виявлення гена Lr34/Yr18/Pm38.*

Проаналізовано колекцію із 198 сортів української та 30 російської селекції, які створені в основних селекційних центрах з 1959 року (виведення Безостої 1) по 2011-й рік, на наявність гена стійкості *Lr34/Yr18/Pm38* [8]. За результатами ПЛР з парою праймерів до локусу *csLV34* [27] виявлено тільки два однозначні алелі: *csLV34a* довжиною 229 п. н. та *csLV34b* довжиною 150 п. н., асоційованих, відповідно, з відсутністю та присутністю гена *Lr34/Yr18/Pm38*.

У більшості українських та російських сортів пшениці, відповідно 87,9 % та 93,3 %, виявлено один з двох алелів локусу *csLV34*. Гетерогенні за цим геном сорти склалися з двох генотипів *aa* та *bb* з різним співвідношенням часток генотипів. Найбільшого поширення алель *csLV34b* набув серед сортів Півдня України (67,8±3,9 %). На Півночі і в Центрі України серед сортів пшениці м'якої озимої найбільш поширений алель *csLV34a* (від 58,3 до 80,0 %) (рис. 3). На Сході України частота алелів *csLV34a* (54,5±15,0 %) та *csLV34b* (45,5±15,0 %) достовірно однакова. У російських сортах Західного Сибіру та Поволжя частота алеля *csLV34b* дорівнює 29,4±11,0 %, на Північному Кавказі — 38,5±13,5 %. Висока частота алеля *csLV34b*, асоційованого з геном *Lr34/Yr18/Pm38*, в сортах Півдня України пов'язана з активним використанням в селекційних програмах сортів-носіїв зазначеного алеля: Безоста 1, Одеська 51, Одеська напівкарликова, Зірка, Альбатрос одеський, Вікторія одеська, Українка одеська та Селянка. Висока частота алеля *csLV34a*, асоційованого з відсутністю гена *Lr34/Yr18/Pm38*, у сортах Півночі, Центру України та Західного Сибіру пов'язана з активним використанням в селекційних

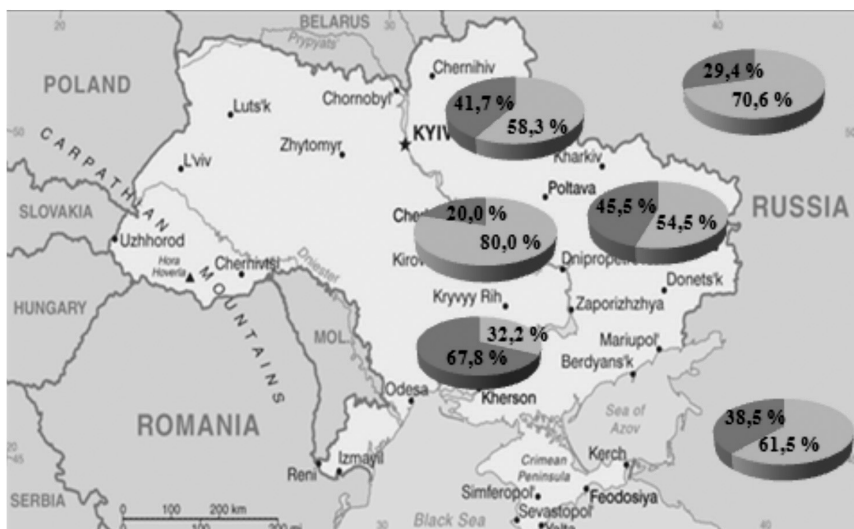


Рис. 3. Розподіл алелей локусу *csLV34* у сортів м'якої пшениці України та Росії:

■ — алель *csLV34a*; ■ — алель *csLV34b*

програмах адаптованих для даних регіонів морозозимостійких сортів-носіїв зазначеного алеля: Ульянівка, Миронівська 808, Багратіонівка.

Слід зауважити, що ген *Lr34/Yr18/Pm38* не є ефективним у сортах України та Росії. Такі пшениці уражаються листовою іржею в межах 15–90 % [4; 28; 29]. Експресія гена *Lr34/Yr18/Pm38* залежить від температури доквілля та стадії онтогенезу рослини. Прояв гена *Lr34/Yr18/Pm38* відбувається у польових умовах у діапазоні від 0 до 20°C, при збільшенні температури експресія гена інгібується [30]. Незважаючи на низьку ефективність гена *Lr34/Yr18/Pm38*, рядом авторів показано, що комбінація його з іншими расоспецифічними генами, такими як *Lr13*, *Lr22a*, *Lr26*, *Lr35* та *Lr37*, значно підвищує рівень польової стійкості [6, 7]. Також відомий позитивний вплив гена *Lr34/Yr18/Pm38* на гени стійкості до стеблової іржі [31]. При розподілі досліджених сортів пшениці м'якої озимої, створених у СГІ за етапами селекції, згідно з М. А. Литвиненком [32], виявлено зростання частоти алеля *csLV34b* з кожним новим етапом (рис. 4). Це свідчить про збереження ефективності гена *Lr34/Yr18/Pm38* на Півдні України (за присутності інших генів расоспецифічної стійкості), яка пов'язана зі стійкістю до листової і жовтої іржі, борошністої роси та вірусу жовтої карликовості ячменю, що сприяло добору селекціонерами генотипів рослин з цим геном.

**4. Виявлення комбінації генів, що забезпечують стійкість до листової іржі в умовах Півдня України.** У результаті проведеного скринінгу за наявністю ефективних генів стійкості до листової іржі виявлено сорти та лінії — носії чужорідних генів *Lr21*, *Lr24*, *Lr26* та *Lr<sup>Amigo</sup>* і їх комбінацій (пункт. 2). У зв'язку з тим, що в сортах м'якої пшениці селекції СГІ найбільш поширений алель *csLV34b*, асоційований з присутністю гена *Lr34/Yr18/Pm38* ( $67,8 \pm 3,9$  %) [8], то доцільно було провести іден-

тифікацію цього гена в 15 лініях, отриманих від міжвидових схрещувань. З-поміж ліній виявлені носії гена *Lr34*: КП 3/12, КП 16/12, КП 28/12, КП 42/12, КП 64/12, КП 82/12, КП 84/12, КП 153/12 та 378/2000. Найбільш важливі для вивчення взаємодії генів стійкості *Lr21*, *Lr24*, *Lr34*, *Lr<sup>Amigo</sup>* є гетерогенні лінії, в яких виявлені кілька комбінацій *Lr* генів.

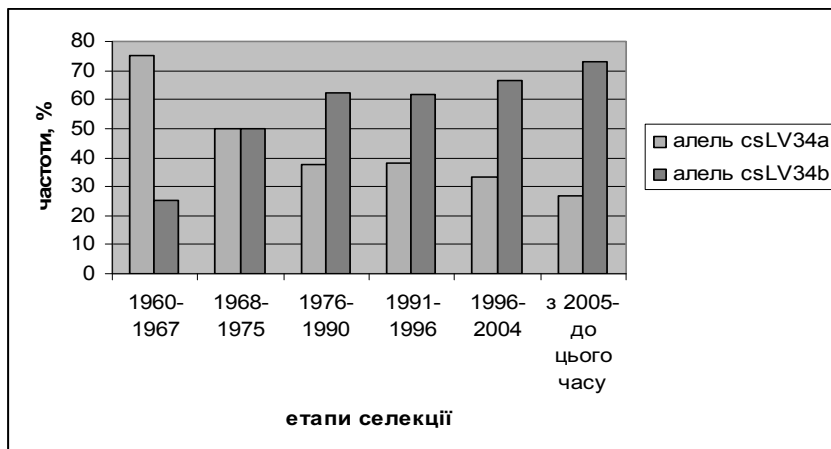


Рис. 4. Гістограма розподілу частот алелей локусу *csLV34* в сортах пшениці м'якої СГП різних етапів селекції

Рослини гетерогенних селекційних ліній по-різному реагували на листову іржу. Порівняння результатів молекулярно-генетичного аналізу з фенотиповим проявом стійкості до листової іржі на стадії проростків показало, що стійкість забезпечується різними комбінаціями *Lr* генів. Рослини з комбінацією *Lr24+Lr34+Lr<sup>Amigo</sup>* (T1AL.1RS) були стійкі. Серед рослин з комбінацією *Lr21+Lr24+Lr34* три були стійкі і дві помірно стійкі. Рослини з комбінацією *Lr<sup>Amigo</sup>+Lr24* були стійкі, з комбінаціями *Lr21+Lr<sup>Amigo</sup>+Lr24* і *Lr21+Lr24* — помірно стійкі. З-поміж рослин з комбінацією *Lr<sup>Amigo</sup>+Lr34* дві були стійкі, одна — чутлива. Рослини з комбінацією *Lr21+Lr<sup>Amigo</sup>*, а також з одним геном *Lr24* — помірно чутливі. Рослини з комбінацією *Lr21+Lr34*, а також з одним геном *Lr<sup>Amigo</sup>* чи *Lr34* були чутливі (табл. 2) [7].

У досліджуваному матеріалі ключовим геном, що забезпечує стійкість до бурої іржі, був *Lr24* (T1BL.1BS — 3Ae # 1L), який в окремому використанні забезпечує помірно чутливий тип стійкості. Гени *Lr21*, *Lr34* і транслокація T1AL.1RS в окремому використанні дають чутливість. У поєднанні їх з *Lr24* (T1BL.1BS — 3Ae # 1L) рослини показали стійкість або помірну стійкість. Згідно з повідомленням Huerta — Espino et al. [33], *Lr21* залишається ефективним у Канаді, Північній Америці, Південній Африці, на Середньому Сході, у Північній Африці та Центральній Азії; локально вірулентність до гена *Lr21* була виявлена в Європі, де він продовжує залишатися ефективним у багатьох країнах. Ген *Lr34* залишається ефективним у Північній Америці, Південній та Північній Африці, на Близькому Сході, в Центральній Азії. Також, згідно з повідомленнями багатьох до-

слідників, *Lr34* в комбінації з іншими генами може посилювати стійкість до бурої іржі [34, 35]. У наших дослідженнях виявлено також, що поєднання генів з частковою стійкістю або кількох неефективних/ефективних генів з геном *Lr34* забезпечує достатній рівень стійкості [7].

Таблиця 2

Порівняння результатів молекулярно-генетичного аналізу з фенотиповим проявом стійкості до листової іржі гетерогенних селекційних ліній [7]

Лінія	Рослина, №	Тип реакції	Ген				Рослина, №	Тип реакції	Ген			
			<i>Lr21</i>	<i>Lr<sup>Amigo</sup></i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr34</i>			<i>Lr21</i>	<i>Lr<sup>Amigo</sup></i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr34</i>
КП 28/12	1	R	-	+	+	+	4	S	+	-	-	+
	2	R	-	+	+	+	5	R	-	+	+	+
	3	R	-	+	+	+	6	R	-	+	+	+
КП 42/12	1	R	-	+	+	+	4	R	-	+	+	+
	2	S	+	-	-	+	5	R	-	+	+	+
	3	R	-	+	+	+						
КП 83/12	1	MR	+	+	+	-	6	S	-	+	-	-
	2	MS	+	-	+	-	7	MS	+	+	-	-
	3	MS	+	+	-	-	8	MR	+	+	+	-
	4	MR	+	+	+	-	9	MS	+	+	-	-
	5	MR	+	+	+	-	10	MR	+	+	+	-
КП 84/12	1	R	+	-	+	+	7	R	-	+	+	+
	2	R	-	+	+	+	8	R	+	-	+	+
	3	MR	+	-	+	+	9	R	-	+	+	+
	4	S	-	+	-	+	10	S	-	+	-	+
	5	MS	+	-	+	+	11	R	+	-	+	+
	6	S	-	-	-	+						
КП 153/12	1	R	-	+	-	+	5	R	-	+	+	+
	2	R	-	+	+	+	6	S	+	-	-	+
	3	R	-	+	+	+	7	R	-	+	+	+
	4	R	-	+	+	+	8	R	-	+	+	+
СП 520/12	1	MS	-	-	+	-	4	R	-	+	+	-
	2	R	-	+	+	-	5	MS	-	-	+	-
	3	MS	-	-	+	-	6	R	-	+	+	-

Примітка: R — стійкі, MR — помірно стійкі, MS — помірно чутливі, S — чутливі.

Виходячи з цього, ми можемо припустити, що селекційний матеріал з комбінацією генів *Lr24+Lr34+Lr<sup>Amigo</sup>*, *Lr21+Lr24+Lr34*, *Lr24+Lr<sup>Amigo</sup>* та *Lr21+Lr24+Lr<sup>Amigo</sup>* може мати ефективний і надійний рівень стійкості не тільки на Півдні України, а й у багатьох інших кліматичних зонах. Лінії з такою комбінацією генів є цінним вихідним матеріалом для селекції пшениці на стійкість до бурої іржі.

**Висновки.** Отже, в результаті досліджень доведена реальна ефективність використання молекулярних маркерів для маркування та картування нового гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від

*Ae. cylindrica* в геномі пшениці, ідентифікації головних расоспецифічних та нерасоспецифічних генів стійкості до листової та стеблової іржі у сортах та лініях пшениці м'якої.

Проведеним скринінгом стійкості до листової іржі виявлені комбінації генів та зразки сортів і ліній — носіїв цих комбінацій, які варто використовувати у вітчизняній селекції при залученні стратегії MAS.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волуевич Е. А. Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине / Е. В. Волуевич // Молекулярная и прикладная генетика. — 2013. — Том 14. — С. 36–45.
2. Lillemo M. Multiple rust resistance and gene additivity in wheat: lessons from multi-location case studies in the cultivars Parula and Saar / M. Lillemo, R. P. Singh [et al.] // Global Rust Initiative Meeting, St. Paul. — 2011. — P. 111–120.
3. Kolmer J. A. Genetics of resistance to wheat leaf rust / J. A. Kolmer // Annu. Rev. Phytopathol. — 1996. — 34. — P. 435–455.
4. Штубей Т. Ю. Цитофизиологические аспекты возрастной устойчивости мягкой пшеницы к возбудителю бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss : автореф. дис. ... к. б. н. / Т. Ю. Штубей. — Москва, 2009. — 24 с.
5. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: науч.-метод. руководство. — К. : Аграр. наука, 1998. — 156 с.
6. Галаев А. В. Молекулярное картирование и маркирование гена устойчивости к твердой головне, перенесенного от *Aegilops cylindrica* в мягкую пшеницу / А. В. Галаев, Л. Т. Бабаянц, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 3–11.
7. Gorash A. Leaf rust resistance of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines derived from interspecific crosses / A. Gorash, A. Galaev, O. Babayants, L. Babayants // Zemdirbyste-Agriculture. — 2014. — V. 101, No. 3. — P. 295–302.
8. Галаев О. В. Характеристика сортів пшениці м'якої української і російської селекції за алелями локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38* / О. В. Галаев, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2015. — Т. 49, № 1. — С. 18–25.
9. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. — Прага, 1988. — С. 178–188.
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — М. : Колос, 1973. — 327 с.
11. Мутерко О. Ф. Можливість використання мікросателітних маркерів пшениці в ПЛР-аналізі геному *Aegilops cylindrica* Host / О. Ф. Мутерко, О. В. Галаев // Вісник ОНУ. — 2010. — Том 15, вип. 17. — С. 59–64.
12. Галаев О. В. Особливості змін геному *Triticum aestivum* внаслідок гібридизації з *Aegilops cylindrica* / О. В. Галаев, Ю. М. Сиволап // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — Том. 4, № 1. — С. 31–39.
13. Галаев А. В. Контроль переноса генетического материала геномов С и D *Ae. cylindrica* в геномы А, В и D мягкой пшеницы / А. В. Галаев, Ю. М. Сиволап // Збірник наукових праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології». — Київ, 2007. — Том 2. — С. 251–255.
14. Галаев О. В. Маркери до інтрогресивних фрагментів геному *Aegilops cylindrica* та їх використання для поліпшення стійкості сортів пшениці м'якої



- до фітопатогенів / О. В. Галаєв, Л. Т. Бабаянц, Ю. М. Сиволап // Наукові праці південного філіалу «Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні». — Сімферополь, 2008. — Випуск 107. — С. 132–135.
15. Gandhi H. Hybridization between wheat and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) under field conditions / H. Gandhi, C. A. Mallory-Smith, C. J. W. Watson [et al.] // *Weed Sci.* — 2006. — Vol. 54. — P. 1073–1079.
  16. Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap / P. Stam // *Plant Journal.* — 1993. — V. 3. — P. 739–744.
  17. Galaev A. V. DNA-markers for resistance to common bunt transferred from *Aegilops cylindrica* Host to hexaploid wheat / A. V. Galaev, L. T. Babayants, Yu. M. Sivolap // XV<sup>th</sup> Biennial Workshop on the Smut Fungi, Research Institute of Crop Production (June 11–14, 2006) Prague, Czech Republic. — 2006. — P. 30–32.
  18. Бабаянц О. В. Основы селекции и методология оценок устойчивости пшеницы к возбудителям болезней / О. В. Бабаянц, Л. Т. Бабаянц; НААН, СГІ–НЦСС. — Одесса: БМБ, 2014. — 401.
  19. Weng Y. PCR-based markers for detection of different sources 1AL, 1RS and 1BL, 1RS wheat-rye translocations in wheat background / Y. Weng, P. Azhaguel, R. N. Devkota, J. C. Rudd // *Plant Breeding.* — 2007. — V. 126. — P. 482–486.
  20. Садовая А. С. Характеристика устойчивости к возбудителю бурой ржавчины сортов и линий мягкой пшеницы из коллекции ВИР, несущих чужеродный генетический материал / А. С. Садовая, Е. И. Гульяева, О. П. Митрофанова [и др.] // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* — 2014. — Том 18, № 4/1. — С. 739–750.
  21. Caldwell R. M. Breeding for general and/or specific plant disease resistance / R. M. Caldwell // Finlay KW, Shepherd KW (eds) *Proc 3rd Int Wheat Genet Symp*, Australian Academy of Science, Canberra, Australia. — 1968. — P. 263–272.
  22. Rubiales D. Characterisation of *Lr34*, major gene conferring non-hypersensitive resistance to wheat leaf rust / D. Rubiales, R. E. Niks // *Plant Dis.* — 1995. — 94. — P. 1208–1212.
  23. Spielmeyer W. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat / W. Spielmeyer, R. A. McIntosh, J. Kolmer, E. S. Lagudah // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — 111. — P. 731–735.
  24. Lillemo M. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar / M. Lillemo, B. Asalf, R. P. Singh, J. Huerta-Espino [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2008. — 116. — P. 1155–1166.
  25. Singh R. P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat / R. P. Singh // *Phytopathology.* — 1992. — V. 82. — P. 835–838.
  26. Singh R. P. Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat / R. P. Singh // *Crop Sci.* — 1992. — 32. — P. 874–878.
  27. Lagudah E. S. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat / E. S. Lagudah, H. McFadden, R. P. Singh [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2006. — V. 114. — P. 21–30.

28. Kolmer J. A. Inheritance of leaf rust resistance in the wheat cultivars AC Majestic, AC Splendor, and AC Karma / J. A. Kolmer, J. Q. Liu // *Can. J. Plant Pathol.* — 2002. — V. 24. — P. 327–331.
29. Бабаянц Л. Т. Расовый состав *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* в степи Украины и сортоустойчивость пшеницы / Л. Т. Бабаянц, О. В. Бабаянц, А. А. Васильев, В. А. Трасковецкая // Збірник наукових праць СГІ. — 2004. — Вип. 6 (46). — С. 279–288.
30. Marshall D. Virulence of *Puccinia recondita* in Texas from 1988 to 1990 / D. Marshall // *Plant Disease.* — 1992. — V. 76. — P. 296–299.
31. Kerber E. R. Leaf resistance gene *Lr34* associated with non suppression of stem rust resistance in the wheat cultivate Canthatch / E. R. Kerber, T. Aung // *Phytopathology.* — 1999. — V. 88. — P. 518–521.
32. Литвиненко М. А. Відділ селекції та насінництва пшениці в 100-річній історії інституту / М. А. Литвиненко // Збірник наукових праць СГІ–НЦНС. — 2012. — Вип.20 (60). — С. 11–27.
33. Huerta-Espino J. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* /
34. J. Huerta-Espino, R. P. Singh, S. German [et al.] // *Euphytica.* — 2011. — V. 179 (1). — P. 143–160.
35. Keller B. How has *Lr34/Yr18* conferred effective rust resistance in wheat for so long? / B. Keller, E. S. Lagudah, L. L. Selter [et al.] // *Borlaug Global Rust Initiative. Technical Workshop. Beijing, China, 2012.* — 2012. — P. 49–56.
36. Singh R. P. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats / R. P. Singh, J. Huerta-Espino, S. Bhavani [et al.] // *Euphytica.* — 2011. — V. 179 (1). — P. 175–186.

Надійшла 10.09.2015.

UDC 577.21:575.113:632.4

**Galaev O. V., Babayan L. T.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**MOLECULAR-GENETIC MARKERS FOR IDENTIFICATION OF GENES  
RESISTANCE TO FUNGAL DISEASES OF BREAD WHEAT  
(*Triticum aestivum* L.)**

Molecular-genetic markers was used for marking and mapping the new gene resistance to common bunt transferred from *Ae. cylindrica* into wheat genome, identification of the main raso-specific genes for resistance to leaf and stem rust in 80 varieties and 15 lines of bread wheat created 1991 in the PBGI-NCSCI, and identifying the gene multi pathogenic non race-specific resistance *Lr34/Yr18/Pm38* in wheat varieties Ukrainian and Russian breeding. Varieties and lines with genes *Lr21*, *Lr24 / Sr24*, *Lr26 / Sr31* (1BL.1RS), *Lr34 / Yr18 / Pm38* and *Lr<sup>Amigo</sup> / Sr<sup>Amigo</sup>* (1AL.1RS) individually or in combination were found. The combination of genes *Lr24+Lr34+T1AL.1RS*, *Lr24+Lr34+Lr21*, *T1AL.1RS+Lr24* and *Lr21+T1AL.1RS+Lr24* conferred resistance varieties and lines in South Ukraine are promising donors in Ukrainian breeding programs.

УДК 577.21:575.113:632.4

**Галаев А. В., Бабаянц Л. Т.**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ  
ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ГРИБКОВЫМ  
ЗАБОЛЕВАНИЯМ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.)**

Представлены результаты использования молекулярно-генетических маркеров для маркирования и картирования нового гена устойчивости к твердой головне, перенесенного из *Ae. cylindrica* в геном пшеницы, идентификации главных расоспецифических генов устойчивости к листовой и стеблевой ржавчине в 80 сортах и 15 линиях пшеницы мягкой, созданные с 1991 года в СГИ–НЦСС, а также выявление гена мультипатогенной нерасоспецифической устойчивости *Lr34/Yr18/Pm38* в сортах пшеницы украинской и российской селекции. Выявлено наличие у изученных сортов и линий генов *Lr21*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31* (1BL.1RS), *Lr34/Yr18/Pm38* и *Lr<sup>Amigo</sup>/Sr<sup>Amigo</sup>* (1AL.1RS) отдельно и в комбинациях. Показано, что сорта и линии с комбинацией генов *Lr24+Lr34+Lr<sup>Amigo</sup>*, *Lr21+Lr24+Lr34*, *Lr24+Lr<sup>Amigo</sup>* и *Lr21+Lr24+Lr<sup>Amigo</sup>* обеспечивают эффективный и надежный уровень устойчивости на Юге Украины и могут использоваться в качестве доноров в селекционных программах Украины.

УДК 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

М. С. БАЛЬВІНСЬКА<sup>1</sup>, к. б. н., ст. наук. співроб.,  
Р. М. КАЛЕНДАР<sup>1,2</sup>, доц., к. б. н., зав. лаб.,  
І. А. БАЛАШОВА<sup>1</sup>, к. б. н., пров. наук. співроб.,  
О. Р. СТРАТУЛА<sup>1</sup>, мол. наук. співроб.,  
О. Ф. БРИК<sup>1</sup>, к. б. н.,  
О. О. ЗАХАРОВА<sup>1</sup>, к. б. н.,  
Ю. Ю. СУЛІМА<sup>1</sup>,  
О. В. БІЛИНСЬКА<sup>3</sup>, к. б. н., ст. наук. співроб., пров. наук. співроб.,  
В. П. НЕЦВЕТАЄВ<sup>1,4</sup>, д. б. н., проф., зав. лаб.

<sup>1</sup> СГІ–НЦНС, Одеса

balvinska@mail.ru

<sup>2</sup> РДП «Національний центр біотехнології», респ. Казахстан

ruslan.kalendar@mail.ru

<sup>3</sup> Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, Харків

bilinska@ukr.net

<sup>4</sup> Белгородський НДІ сільського господарства РАСГН

## ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦІЙНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ ЯЧМЕНЮ (*Hordeum vulgare* L.) В СГІ–НЦНС

*На основі ПЛР-аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму різноманітних генотипів ячменю одержано ДНК-маркери для теоретичного і практичного використання. З залученням методів молекулярної генетики і геноміки проведено картування геному, диференціацію генотипів за ступенем їхньої спорідненості на внутрішньовидовому рівні, визначення однорідності генетичного матеріалу і детекцію алелів важливих генів ячменю, зокрема в-амілаз, типів і темпів розвитку, гордеїнів, вмісту амілоз. Показана можливість детекції потенційних ДНК-маркерів генів низькотемпературної чутливості, андрогенної здатності ячменю.*

Ключові слова: ячмінь, молекулярно-генетичний поліморфізм, ПЛР, молекулярні маркери, картування геному, маркування генів.

**Вступ.** Ячмінь — економічно важлива культура в Україні і в світі, є вдалим модельним об'єктом для вивчення молекулярних, генетичних і фізіологічних особливостей злаків, зокрема *Triticeae*. В генетичному відношенні ячмінь — це самозапильний диплоїд. Генофонду цього цінного злаку властива значна генетична варіабельність [1, 2].

Наразі молекулярно-генетичні дослідження відносяться до пріоритетних напрямів розвитку теорії і практики селекції найважливіших видів рослин, зокрема ячменю. Значна кількість досліджень геному ячменю

заснована на результатах аналізу змін тих чи інших ділянок ДНК. Поліморфізм нуклеотидних послідовностей між окремими зразками може бути наслідком точкових мутацій, вставок, делецій або інверсій в ДНК-матриці [1]. В ефективності пізнання і розширення теоретичної бази, а також у можливості практичного застосування результатів найважливіша роль належить вибору відповідних методів та інструментів аналізу [2, 3].

До 1994 року основним методом одержання ДНК-маркерів геному ячменю слугував ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів, англ. — AFLP). Останніми двома десятиліттями найбільш ефективними для виявлення молекулярних маркерів є методи, засновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Широке застосування знайшли варіанти ампліфікації ДНК зі специфічними праймерами і праймерами довільної послідовності, за допомогою яких можна швидко виявити варіабельність певної кількості локусів геному рослини [1, 4, 5].

ДНК-маркери, які визначаються шляхом ПЛР-аналізу, можна розділити на кодомінантні, монолокусні, поліалельні і доміантні, полілокусні, біалельні [6]. Представниками монолокусної поліалельної кодомінантної системи маркерів є мікросателіти (SSRs). Завдяки своїм особливостям мікросателітні маркери набули найбільшого поширення в картуванні геномів, маркуванні локусів простих і кількісних ознак, ідентифікації і реєстрації сортів, зокрема ячменю, визначенні рівня гібридності, генетичної чистоти селекційного матеріалу та ін. Полілокусні системи (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP та ін.) знайшли широке застосування у визначенні генетичних дистанцій, розподілі генотипів за рівнем генетичної спорідненості, визначенні ідентичності зразків, а також у маркуванні генів агрономічних ознак та ін., оскільки дозволяють дослідити значну кількість локусів одночасно [1, 5, 6]. Використання того чи іншого варіанту ПЛР-аналізу залежить від задачі дослідження. Зазвичай у вирішенні проблем селекційного поліпшення рослин, моно- і полілокусні маркерні системи доповнюють одне одного.

В Україні проведені численні дослідження, результат яких показує доцільність тих чи інших ПЛР-підходів у одержанні молекулярних маркерів геному ячменю, які можуть бути застосовані для вирішення як теоретичних питань, так і у селекційній практиці [6–15]. У цьому зв'язку дана робота є узагальненням аналізу поліморфізму ампліфікованої ДНК ячменю (*Hordeum vulgare* L.), що детектується шляхом різних ПЛР-методів для одержання ДНК-маркерів з метою побудови карт зчеплення, дослідження внутрішньовидових взаємовідносин представників виду *Hordeum vulgare* L., вивчення варіабельності та ідентифікації алелів генів цінних ознак, зокрема  $\beta$ -амілази (*Bmy1*), типів (*Vrn*) і темпів (*Ppd*) розвитку, гордеїнів (*Hrd*), вмісту амілози (*waxy*), низькотемпературної чутливості (*Dhn*, *Cbf*).

**Матеріали і методи.** Генетичним матеріалом дослідження слугували:

— представники виду *Hordeum vulgare* L.: 150 ліній самозапильної популяції № 106 ( $F_7$  і  $F_8$ , Одеський 1 15 x Гольф), що містили біохімічні мар-

кери ізоферментів (*Est 5*, *Bmy1*, *Est 1* і *Amy 1*), лінії отримані в СГІ–НЦНС, м. Одеса; 100 ліній дигаплоїдів Shiry x Galena, які відрізнялися стійкістю до *Puccinia hordey*, *Puccinia striiformis*, *Rhynchosporium secalis*, *BYDV* та 95 дигаплоїдів Oregon Wolfe Barley, OWB (вихідні форми — Dominant, Recessive — містили набір з 15 домінантних або відповідних рецесивних маркерних генів (*n/N*, *wx/Wx*, *lk/Lk-2*, *re2/Re2*, *v/V*, *wst/Wst*, *zeo/Zeo*, *al/Al*, *bt/Bt*, *pub/Pub*, *hs/Hs*, *κ/K*, *cer-yy/Cer-yy*, *o/O*, *s/S*, *r/R*) морфологічних ознак у гомозиготному стані і 93 лінії потомства, що містили різні комбінації маркерних генів батьків (люб'язно надані П. Хейсом, ун-т штату Орегон, США); батьківські форми (Харківський 67, Харківський 74, Екзотик, Фенікс) з різною здатністю до андрогенезу і цінними ознаками та дигаплоїди потомства (51 лінія) від схрещувань батьківських форм (надані к. б. н. О. В. Білинською, Ін-т рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, м. Харків); різні частини колекції сортів ярого та озимого ячменю давньої та сучасної селекції України, починаючи з 1931 р. (106 генотипів, зокрема 57 сортів ярого ячменю СГІ–НЦНС), матеріал наданий ЦГР, м. Харків, а також акад. А. А. Лінчевським, відділ селекції та насінництва ячменю СГІ–НЦНС, м. Одеса); колекція з 249 сортів ячменю, які районовані у різний час на території Східноєвропейської і Центральноазійської зон у межах колишнього СРСР (зібрана у ВІРі, люб'язно надана д. б. н. В. П. Нецветаєвим, д. б. н. О. О. Поморцевим); сорти іноземного походження, зокрема Джау Кабутак, Джау Сефадек, Betzes, Calsberg II, Тамми, Томмас, Іррі, Вавилон; сорти McGuire, Henley (відрізняються за локусами *Hrd A*, *Hrd B* і *Hrd C*) і гібриди потомства від McGuire x Henley (надані д. б. н. О. І. Рибалкою, відділ генетичних основ селекції СГІ–НЦНС);

— представники інших видів *Hordeum* L.: *H. spontaneum* C. Koch., *H. bulbosum* L., *H. murinum* L., *H. leporinum* L.

ДНК виділяли з етіольованих паростків або з ячмінної зернівки згідно з [4]. Детекцію молекулярно-генетичного поліморфізму досліджуваного генетичного матеріалу проводили шляхом різних варіантів ПЛР-аналізу (RAPD, ISSR, SSR, IRAP, REMAP, STS), використали термоциклери «Біотерм» (Росія) та «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Склад реакційної суміші, послідовності праймерів та умови ампліфікації в залежності від дослідження згідно з [4, 6, 7, 11, 13–23]. ПЛР-продукти розділяли методом електрофорезу в 2–4 %-му агарозному і 10 %-му денатуруючому поліакриламідному гелях в 1хTBE у залежності від ПЛР-методу [7, 11]. Для фрагмент-аналізу мікросателітних локусів ячменю (AWBMS56, UMB503, EBmac501, EBmac602, EBmac701, Bmac93, Bmac96, Bmac310, Bmag120, Bmag225, Bmag321, Bmag341) використали автоматизовану систему AlfExpress II («Amersham Biosciences», Швеція) з комп'ютерним програмним забезпеченням Fragment-analyser 1.03 [13].

Статистичний аналіз проміжних даних проводили за допомогою критерію  $\chi^2$ , t-критерію Ст'юдента та F-критерію Фішера [24]. Для SSR-локусів розраховували індекс поліморфності (PIC) [3, 11].

Комп'ютерний аналіз здійснювали за допомогою програм: *PCR* — для оптимізації умов відпалу RAPD-праймерів, *FastPCR* — для дизайну праймерів і оптимізації умов ПЛР; *TREE*, *MEGA* — для розрахунків генетичних дистанцій і кластерного аналізу методом *UPGMA* (Unweighted-Pair-Group Method); *MAPMAKER/EXP*, ver.3.0, *MAP\_QTL* — для створення карт зчеплення [2, 4, 25], *Multain* - для вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів  $\beta$ -амілаз [2, 23], *ALFWin Software* — для проведення обчислень і документування даних фрагмент-аналізу мікросателітних локусів [13]. Біоінформативний аналіз проводили за алгоритмом *Blast* [2].

### **Результати дослідження та обговорення.**

**Аналіз внутрішньовидового поліморфізму ячменю (*H. vulgare* L.)** Одним з напрямків використання молекулярно-генетичного поліморфізму є аналіз генетичного розмаїття видів, що дозволяє здійснювати розподіл і класифікацію генетичного матеріалу в залежності від рівня їхньої спорідненості [2].

З використанням найбільш доступних систем ДНК-маркерів на основі ПЛР, таких як RAPD, SSRP, IRAP і REMAP, оцінено рівень внутрішньовидового поліморфізму ячменю і показано генетичні зв'язки між представниками виду. Так, за допомогою ПП-ПЛР досліджено 19 сортів ярого ячменю, що походять з різних еколого-географічних зон. Застосуванням 9 інформативних RAPD-праймерів детектовано 156 ПЛР-локусів, з яких 61 виявився поліморфним. Рівень поліморфізму в середньому склав 39 % [7], що характерно і для інших злаків [4]. За аналізом 27 інших сортів ячменю з використанням IRAP- і REMAP-підходів детектовано поліморфізм 84 IRAP- і 105 REMAP-локусів, що в обох випадках достатньо для диференціації досліджених сортів [5]. Рівень поліморфізму за IRAP- і REMAP-аналізом, в середньому, був вищий, ніж за RAPD, що співвідноситься з даними інших авторів [2, 3]. З використанням різноманітного генетичного матеріалу (дигаплоїди, сорти) досліджено фракцію геному ячменю, що містить в основному динуклеотидні мікросателітні повтори. Рівень генетичної мінливості (індекс поліморфності, PIC) 20 досліджених мікросателітних локусів ячменю (HVM) варіював значною мірою і в середньому склав 0,41 [26].

Досліджені групи генотипів ячменю розподілено згідно з їх молекулярно-генетичними особливостями і генетичною подібністю. Так, 19 сортів ярого ячменю з різних еколого-географічних зон об'єдналися в 6 кластерів за походженням, формулою гордеїнів і територією районування [8]. Досліджені за допомогою IRAP- і REMAP-аналізів 27 сортів ячменю з колекції СГІ–НЦНС диференційовані на 2 кластери за такими ознаками, як ярові — озимі [6] (рис. 1).

За результатами кластеризації SSR-маркерів 32 сорти селекції СГІ сформували один великий кластер до якого окремою гілкою приєдналися дві дигаплоїдні лінії OWB [26]. У межах основного кластера найбільша віддаленість характерна для сортів, що створені на основі батьків





Гольф (популяції № 106) [7, 8] та двох популяцій дигаплоїдних ліній (Shiry x Galena і OWB (Oregon Woolf Barley) за допомогою різних ПЛР-підходів (RAPD, ISSR, SSRP) проведено картування геному ячменю [10, 11]. На основі одержаних ПЛР-маркерів, а також інших типів (ПДРФ, AFLP, ізоферментних, морфологічних) створено первинні карти досліджених популяцій, основні параметри яких наведено в таблиці 1.

Так, за даними ПЛР- і генетичного аналізів 150 ліній популяції № 106 ідентифіковано 25 варіабельних локусів (4 ізоферменти та 21 RAPD), з яких 21 (2 ізоферменти та 19 RAPD) утворили 6 груп зчеплення [8]. Карта, яка побудована на основі аналізу дигаплоїдів Shiry x Galena, що відрізнялись стійкістю до ряду захворювань, включає 107 маркерних локусів, з яких 33 RAPD увійшли до 7 груп зчеплення [10]. З комплексним ПЛР-підходом (RAPD, ISSR, SSR) детектовано 81 поліморфний ПЛР-локус в модельній популяції множинно маркованих дигаплоїдних ліній ярого ячменю OWB (Oregon Woolf Barley), з яких 36 утворили 7 груп зчеплення і ототоженні з конкретними хромосомами ячменю [11]. Мінімальна відстань між тісно зчепленими маркерами на одержаних картах складала від 1,0 сМ (для популяції № 106 і дигаплоїдів Shiry x Galena) до 4,3 сМ (для дигаплоїдів OWB).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика первинних карт зчеплення досліджуваного матеріалу

Генетичний матеріал	N1 <sup>1</sup>	N2 <sup>2</sup>	Різноманіття і кількість зчеплених маркерів								N3 <sup>3</sup>	Покриття карти, сМ	
			всього	RAPD	SSR	ISSR	RFLP	AFLP	ізозимів	морфологічних			
Популяція № 106	150	21	21	19	–	–	–	–	–	2	–	6	237
Дигаплоїди Shiry x Galena	100	99	107	33	1	–	14	56	1	1	7	1047,3	
Дигаплоїди OWB	95	81	51	22	3	11	–	–	–	15	7	926,4	

Примітки: <sup>1</sup> — кількість досліджених генотипів; <sup>2</sup> — кількість детектованих поліморфних ПЛР-локусів; <sup>3</sup> — кількість утворених груп зчеплення.

Покриття карт популяції № 106, дигаплоїдів OWB і Shiry x Galena складає відповідно 19,0, 74,1 і 83,3 % від загального розміру геному, якщо вважати його рівним 1250 сМ [7, 10, 11].

За аналізом зчеплення маркерів з залученням популяції № 106 ідентифіковано RAPD-фрагмент Р6\_900 п. н., який виявився тісно зчепленим

(1,0 сМ) з геном *Vmy1* [9]. Особливості гомозиготного дигаплоїдного матеріалу OWB дозволили ідентифікувати ПЛР-фрагменти, які тісно зчеплені з алелями маркерних генів морфологічних ознак на хромосомах 3, 6, 7 відповідно: P89\_522 п. н. — *A1* (4,3 сМ), HVM74\_192 п. н. — *O* (4,3 сМ), ORS1a\_390 — *S* (4,4 сМ) [11]. Морфологічні ознаки, що корелюють з виявленими ПЛР-фрагментами або їхнім альтернативним проявом, мають таксономічне значення, деякі з них використовуються для опису культурних сортів ячменю.

Покритий виявленими ДНК-маркерами розмір геному є достатнім для визначення зчеплення з *QTLs* [27]. За аналізом зчеплення маркерних ПЛР-локусів популяції № 106 ідентифіковані RAPD-маркери, які виявлятимуть достовірну різницю між кількісними показниками низки агрономічних ознак (маса 1000 зерен, кущистість, озерненість, продуктивність, кількість зерен з рослини) і можуть бути залучені до аналізу селекційно-генетичного матеріалу. За результатами дослідження виявлено, що для посушливих зон можуть бути рекомендовані генотипи, які мають такий набір ПЛР-маркерів: P63\_700 п. н., P57\_1000 п. н., P9\_680 п. н., P66\_2320 п. н., P52\_700 п. н., P6\_0 (900) п. н., P2\_604 п. н., а для зон з достатнім зволоженням — P39\_1188 п. н., P39\_2300 п. н., P69\_1050 п. н., P52\_700 п. н., P44\_560 п. н., P2\_1300 п. н., P57\_1000 п. н., P2\_604 п. н. Маркери досліджених локусів кількісних ознак ідентифіковані в 3, 4 та 6 групах зчеплення [7, 8].

Отже, використання ПЛР-аналізу та спеціально створеного генетичного матеріалу дозволило одержати ДНК-маркери та визначити їхню хромосомну локалізацію шляхом виявлення зчеплення між ними і маркерами генів біологічно цінних ознак, що може бути використано в подальших теоретичних дослідженнях і практиці. Показана перспективність аналізу з використанням генетично однорідних дигаплоїдних ліній.

**Вивчення поліморфізму і маркування генів господарсько цінних ознак ячменю.** Наразі технологія ДНК-аналізу надає можливість досліджувати організацію та поліморфізм генів важливих ознак ячменю на молекулярному рівні та проводити активний пошук молекулярних маркерів цих генів. У результаті ПЛР-аналізу з праймерами, які розроблені нами на основі послідовностей генів гордеїнів, виявлено здатність детектувати поліморфізм гордеїнкодуєчих локусів між батьківськими сортами McGuire, Henley, які відрізняються за локусами *Hrd A*, *Hrd B* і *Hrd C*, а також виявляти гібридні генотипи в потомстві  $F_2$  [28]. Показано, що детектований поліморфізм пов'язаний з локусом *Hrd B* і може бути використаний у подальшому для аналізу сортів ячменю.

Досліджено наявність інерційно-делеційного поліморфізму 30 сортів ярого і озимого ячменю української селекції за локусом *waxy*, що контролює вміст амілози. У більшості проаналізованих сортів ярого ячменю і у всіх озимих зустрічався алель 800 п. н., що відповідає, як і очікувалось, домінантному алелю *Waxy* і генотипу з нормальним вмістом

амілози. Цікавим є факт, що у низки сортів ярого ячменю (Адапт, Донецький 650 та ін.), переважно сучасної селекції, детектований алель *new-Waxy* — 1000 п. н., а також обидва алелі 800/1000 п. н. (Одеський 9) у різному співвідношенні (20–80 %). До появи алеля *new-Waxy* (1000 п. н.) призводить інсерція 193 п. н. в інтроні I гена *GBSS I*, яка, як відомо, фенотипово не виявляється і не впливає на якість ознаки [18], але це докладно не досліджено. Алель 600 п. н. (делеція 403 п. н.), який відповідає за восковидний ендосперм (*waxy*), у даному генетичному матеріалі не знайдено. Маркерні алелі *waxy*-локусу можуть бути використані для аналізу гібридних форм ячменю (*waxy/Waxy*) і селекції сортів на низький вміст амілози [13].

Відомо, що алельний поліморфізм гена *Bmy1* зумовлений інерцією MITE (Miniature inverted-repeat transposable element) 126 п. н. (Stowaway-транспозон) у третьому інтроні гена *Bmy1*, яка призводить до пригнічення активності ферменту β-амілази [16]. З використанням інтрон III-специфічного маркера алелів гена *Bmy1* показано, що серед досліджених 106 сортів ярого ячменю давньої і сучасної селекції України, які зареєстровані як пивоварні, більшість мають алель активної β-амілази 516 п. н., а зернові — несуть мутантний алель 643 п. н., з інсерцією, що відповідає наявності низькоактивної β-амілази [29]. Деякі ярі сорти, як пивоварні, так і зернові, є гетерогенними за даним локусом і містять обидва алелі в різному співвідношенні. У всіх озимих сортів, що є, до речі, цілком генетично однорідними за цим локусом, і невеликої кількості ярих пивоварних сортів детектований алель 643 п. н. Серед проаналізованих інших видів ячменю різного географічного походження у дикуна *H. spontaneum* PI 296897 з ізраїльської провінції Іудея підтверджено наявність алеля високоактивної β-амілази 477 п. н.

Сучасні досліджувані ресурси дозволяють перейти до визначення мінливості ознак на основі нових технологій функціональної геноміки. За результатами секвенування і біоінформатичного аналізу нами сконструйовані алель-специфічні праймери, що походять з консервативних білоккодуєчих ділянок генів β-амілаз *Bmy1* і *Bmy2* ячменю. EPIC-праймери (від англ. EPIC — exon-primed intron-crossing) [30] генерують появу відповідних продуктів ампліфікації ДНК локусу *Bmy1* у ячменю (3152 п. н. — без вставки, 3278 п. н. з інсерцією 126 п. н. і, передбачено, 3113 п. н.) та представників *Poa seae*, а також ПЛР-продуктів локусу *Bmy2* (2260 п. н.) [23]. За допомогою інтрон-III-специфічного маркера і EPIC-маркерів ідентифікували генотипи ячменю — носії алелів, що зумовлюють різну активність ферменту β-амілази сортів колекції, що районовані у різний час на території колишнього СРСР [23, 31]. Загалом, найбільшого розповсюдження набув алель активної β-амілази, частка якого склала 69 % (рис. 2, а).

За дослідженням географічного поширення алелів гена *Bmy 1* ячменю [23, 31] визначена суттєва перевага алеля активної β-амілази в північних

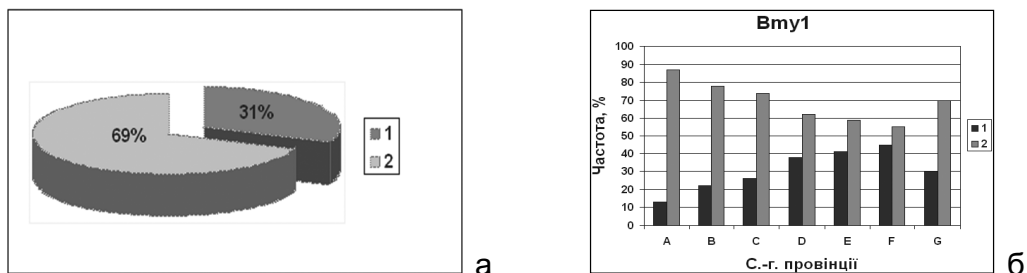


Рис. 2. Розповсюдженість і співвідношення алелів  $\beta$ -амілазного локусу *Vmy1*: а — загальне; б — частота на території сільськогосподарських провінцій (А — Європейська, В — Прибалтійська, С — Білоруська, D — Середньоросійська, Е — Західносибірська, F — Далекосхідно-Усурійська, G — Передалтайська) у межах колишнього СРСР; 1 — алель з інсерцією 126 п. н.; 2 — алель активної  $\beta$ -амілази

регіонах (рис. 2, б), що співпадає з сучасними даними про кліматичні умови Північно-європейської частини, як бажаними для вирощування пивоварних сортів. З просуванням на південь збільшується частота алеля низькоактивної  $\beta$ -амілази.

З метою визначення оптимального розвитку сортів у певних кліматичних регіонах і ефективної селекції високоврожайних генотипів актуальним є одержання ДНК-маркерів генів яровизації та фотоперіоду ячменю, а також стійкості до несприятливих умов вирощування [14].

Показано можливість встановлення алельного стану трьох генів *Vrn* і *ppd-H1* у озимих сортів і дворучок шляхом ПЛР-аналізу зі специфічними праймерами, що генерують ПЛР-фрагменти певного розміру, які відповідають наявності домінантного або рецесивного алелів [18–20]. Нуль-алель зумовлює відповідний альтернативний варіант. Так, у всіх досліджених 14 сортів озимого ячменю і 6 дворучок з використанням специфічних праймерів до регуляторного елемента HvVM5 в інtronі I гена *Vrn-H1* виявлено ПЛР-фрагмент 1500 п. н., що відповідає рецесивному алелю. За ПЛР-аналізом локусу *Vrn-H2* в 12 з 14 досліджених озимих сортів детектований ПЛР-фрагмент 208 п. н., який відповідає домінантному алелю *Vrn-H2*. Сорти Кондрат та Майстер, а також 6 сортів-дворучок мали нуль-алель, що свідчить про наявність у них альтернативного алеля (*vrn-H2*). У всіх досліджених сортів, і озимих і дворучок, за ПЛР-аналізом визначено ПЛР-фрагмент 770 п. н., який відповідає рецесивному алелю *vrn-H3*, що підтверджує їхню приналежність до відповідного типу розвитку [12, 19]. Щодо результатів ПЛР-аналізу локусу *Ppd-H 1* — у двох (Наоміе, Вінмалът) з 14 досліджених сортів озимого ячменю детектований ПЛР-фрагмент розміром 1012 п. н., що відповідає домінантному алелю і є виключенням. Інші озимі сорти, а також дворучки мали нуль-алель за даним локусом.

Отже, ПЛР-аналізом підтверджено приналежність низки сортів (Трембіта, Сармат, Михайло, Добриня, Майбрит, Зимовий, Трудівник,

Буревій, Академічний, Селена Стар) до істинно озимих з типовою комбінацією алелів: *vrn-H1Vrn-H2vrn-H3*, до дворучок з типовою комбінацією рецесивних алелів *vrn-H1vrn-H2vrn-H3* (Росава, Основа, Достойний, Абориген, Снігова королева, Дев'ятий вал), а також виявлені генотипи, які мали нетипові, домінантні алелі *Vrn-H2* та *Ppd-H1*.

Згідно з літературними даними, ідентифіковано низку генів холодового стресу, які індукуються у відповідь на низькотемпературний стрес, досліджено їхній вплив на рівень низькотемпературної стійкості [32, 33].

При використанні комбінованих праймерів до ділянок перших екзонів генів *Dhn 4* і *Dhn 7*, що містять мутації [22], можуть генеруватися такі ПЛР-фрагменти: у озимих — 204 п. н., 210 п. н. і у ярих — 198 п. н., 240 п. н. За результатами ПЛР-аналізу 30 досліджених генотипів з даними праймерами, у сімнадцяти з яких 15 ярих і 2 озимих, виявлено ПЛР-фрагменти 198 п. н. і 240 п. н., тринадцять інших озимих мали ПЛР-фрагменти 204 п. н. та 210 п. н. Нетипову картину детектовано для двох озимих сортів (Ігри і Вавілон), що засвідчує наявність ПЛР-фрагментів, характерних для групи ярих генотипів. Такі відмінності, імовірно, потенційно можуть виявитися у будь-яких інших озимих генотипів або дворучок, що може впливати на їхню чутливість до низької температури. Щодо ярих — поліморфізм досліджених ділянок і мутаційні зміни у вивчених ділянках ДНК даної вибірки сортів не виявлено.

ПЛР-аналіз з парою праймерів на основі сиквенсів гена *Dhn5* показав ДНК-поліморфізм у низки ярих та озимих сортів ячменю. Виявлено кілька алельних варіантів: 190 п. н. і 210 п. н. Так, для озимих сортів характерним був ПЛР-фрагмент розміром 210 п. н. Серед 30 проаналізованих ярих сортів у більшості детектовано ПЛР-фрагмент 190 п. н., і у незначній частині — 210 п. н., як у озимих. Деякі ярі сорти були гетерогенними за даним локусом і мали обидва ПЛР-фрагменти. Такий розподіл, можливо, вказує на наявність у сортів ярого ячменю генетичного потенціалу (алель 210 п. н.) підвищеної толерантності до дії абіотичних чинників, зокрема низьких температур. Однак прямої залежності між наявністю певного алеля і ознакою стійкості до певного абіотичного фактора поки що не встановлено.

Згідно з літературними даними [21], ПЛР-аналізом детектований поліморфізм ділянок ДНК низки генів, зокрема, *pAF93*, *Blt 14*, *Blt 4.9*, *Cor14b*, *pAO986*, які індукуються у відповідь на низькотемпературний стрес, що визначається наявністю у генотипів ПЛР-фрагментів певного розміру або нуль-алелем за кожним з цих локусів. За результатами ПЛР-аналізу 30 сортів ярого та озимого ячменю української селекції у чотирьох досліджених генотипів спостерігається внутрішньосортова гетерогенність за локусами *Blt 4.9*, *Blt 14*, а також різниця в алельному стані за локусом *Blt 4.9*. Для сортів Галактик і Соборний нуль-алель виявлено у 10 % досліджених зразків ДНК, для сортів Одеський 9, Донецький 650 — у 20 %. Наявність нуль-алелю пов'язана з мутаціями у сайтах праймування, які,

імовірно, можуть мати функціональне значення. Шляхом ПЛР-аналізу дослідженого генетичного матеріалу виявлено відсутність таких мутацій у локусах *pAF 93*, *Cor14b*, *pAO986*, що, згідно з літературними джерелами, виявляються у генеруванні ПЛР-фрагментів певного розміру [21].

*Cbf*-гени ячменю розміщені в 5HL хромосомі, в зоні, близькій до гена *Fr-H2*, і контролюють відповідь на стресові умови, пов'язані з впливом холоду, а також морозостійкість, чутливість до яровизації, акліматизацію тощо [32, 15]. Одним з цільових генів чинника транскрипції *CBF2* є ген ячменю *Hva1*, що активується у відповідь організму на стрес і запускає «холодовий шлях». Секвенування та аналіз секвенованого фрагмента дозволив нам виявити послідовність ДНК, яка є ідентичною *cis*-активному елементу гена *Hva1* ячменю [15]. ПЛР-аналізом зі спрямованими праймерами до гена *Cbf2*, а також гена *Hva1* детектовано поліморфізм між генотипами ячменю, які є контрастними за низькотемпературною толерантністю [15, 16]. Профілі STS-ПЛР показують, що у ярих сортів, на відміну від озимих та дворучок, за локусом *Cbf2* детектуються поліморфні фрагменти розміром 450 п. н. та 50 п. н. відповідно. За локусом *Hva1* у озимих і дворучок детектований амплікон в ділянці 480 п. н., який відсутній у ярих сортів, що зумовлено, ймовірно, змінами у сайті праймування на матриці ДНК. Наявність зазначених фрагментів у спектрах ампліфікації ДНК ячменю дозволяє ідентифікувати генотипи ярого або озимого ячменю та дворучок у загальній вибірці. Передбачається, що виявлені поліморфні локуси ДНК зумовлені присутністю досліджених генів у різному алейному стані у генотипів з різною низькотемпературною стійкістю [14].

Отже, наразі вивчення низькотемпературної толерантності спрямоване, в основному, на ідентифікацію стресових генів, виявлення особливостей їхньої організації та функціональної важливості, значно меншою мірою — для підвищення ефективності аналізу селекційного матеріалу.

Значної уваги заслуговує вивчення генетичного контролю здатності до культури *in vitro* і виділення форм серед генотипів вітчизняного ячменю, що поєднують високу андрогенну здатність з комплексом цінних ознак [34]. Проведено тестування дигаплоїдів батьківських форм Екзотик, Харківський 74, Фенікс, Харківський 67 з різною здатністю до андрогенезу і ліній потомства, які отримані від схрещувань вищезазначених генотипів з використанням мікросателітного маркера *HVM 36* [35], що асоційований з андрогенною здатністю. Показано, що значна частина дигаплоїдів потомства успадкувала переважно алелі, що походять від генотипів з високою андрогенною здатністю, зокрема 84 % ліній ДГ-популяції мали алель 116 п. н. сорту Екзотик, у тому числі лінія ДГ00–126 з трансгресивним успадкуванням за кількістю морфогенних пиляків і частотою регенерації. Це співвідноситься з оцінкою мінливості ДГ-ліній у порівнянні з батьківськими формами гібридів щодо відхилення за частотою індукції морфогенних структур (калюсу, ембріоїдів) і рослин-регенерантів у бік

батьківського сорту з більш високою андрогенною здатністю. Але це не є достатнім для пояснення трансгресивного успадкування, особливо за здатністю до регенерації зелених рослин [34].

Отже, можна виявити певні окремі алелі дослідженого МС-локусу, які найбільш типові для генотипів з високим рівнем андрогенної здатності, що, згодом, є потенційними маркерами системи детекції здатності до культури *in vitro* різних генотипів ячменю.

**Висновки.** Продемонстровано праймер-специфічність ділянок гібридизації та різний рівень внутрішньовидової специфічності зразків ампліфікованої ДНК ячменю, що визначено з використанням різноманітних ПЛР-підходів. Розроблено ДНК-маркери для внутрішньовидової диференціації і класифікації генотипів. При використанні моно- і полілокусних систем ПЛР-маркерів досліджені генотипи можуть бути сгруповані за схожістю ознак, зокрема такими, як походження, територія районування, формула гордеїнів, яровість–озимість. Картовано локуси поліморфних ПЛР-продуктів, визначено їх зчеплення з біохімічними і морфологічними маркерами. При створенні первинних карт для визначення зчеплення молекулярних маркерів з іншими маркерами та ототожнення їх з хромосомами показана можливість ефективного використання як дигаплоїдів, так і самозапильних ліній. Для одержання ефективних маркерів полігенних ознак необхідним є аналіз рослин однієї комбінації в різних еколого-географічних зонах. На основі біоінформатичних методів, секвенування і ПЛР-аналізу розроблена система детекції алелів гена *Vmu1* ячменю та інших представників *Poa* spp., детектовано алельний поліморфізм гордеїнокодуючих локусів (*Hrd B*), *waxy*, *Dhn*, визначено алельний стан генів *Vrn* і *Ppd-H1*, а також різницю в алельному стані генів *Cbf*, *Hva1* у контрастних за низькотемпературною чутливістю генотипів. Показано можливість виявлення потенційних ДНК-маркерів, зокрема андрогенної здатності ячменю, на основі мікросателітів. Одержані ДНК-маркери можуть бути використані для подальших теоретичних досліджень та аналізу селекційного матеріалу.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Календарь Р. Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. — 2002. — Т. 34, № 4. — С. 279–295.
2. Сиволап Ю. М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календарь. — Одесса : Астропринт, 2011. — 336 с.
3. Agarwal M. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences / M. Agarwal, N. Shrivastava, H. Padh // Plant Cell Reports. — 2008. — Vol. 27. — P. 617–631.
4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : науч.-метод. рук-во / [под ред. Ю. М. Сиволапа]. — К. : Аграрна наука, 1998. — 156 с.

5. IRAP и REMAP-анализ сортов ячменя Одесской селекции / А. Ф. Брик, Р. Н. Календарь, О. Р. Стратула, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2006. — № 3. — С. 24–33.
6. Varshney R. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications / R. Varshney, A. Graner, M. E. Sorrells // Trends Biotechnology. — 2005. — Vol. 23. — P. 48–55.
7. Календарь Р. М. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму геному ячменю (*Hordeum vulgare* L.) методом полімеразної ланцюгової реакції [Текст] : дис. ... к. б. н. / Р. М. Календарь. — Київ, 1996. — 26 с.
8. Сиволап Ю. М. Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare*) / Ю. М. Сиволап, Р. Н. Календарь, В. П. Нецветаев // Генетика, 1997. — Т. 33, № 1. — С. 43–49.
9. Маркерный анализ некоторых QTL ячменя с помощью RAPD и изоферментов / Ю. М. Сиволап, Р. Н. Календарь, В. П. Нецветаев, А. Е. Чапля // Цитология и генетика. — 1997. — Т. 31, № 4. — С. 39–44.
10. Сулима Ю. Ю. Картирование генома ячменя RAPD-анализом с использованием дигаплоидных линий / Ю. Ю. Сулима, Р. Н. Календарь, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 41–49.
11. Бальвінська М. С. ПЛР-аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму ячменю (*Hordeum vulgare* L.) [Текст] : дис. ... к. б. н. / Бальвінська Марина Сергіївна. — Київ, 2002.
12. Молекулярні маркери у розвитку теорії і практики селекції ячменю : науково-методичний посібник / Ю. М. Сиволап, М. С. Бальвінська, О. О. Захарова, Р. М. Календарь, О. Р. Стратула. — Одеса : Астропринт, 2014. — 88 с.
13. Бальвінська М. С. Використання фрагмент-аналізу для ДНК-типівання сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) : методичні рекомендації / М. С. Бальвінська, І. Л. Холявіцька, Ю. М. Сиволап. — Одеса, 2010. — 18 с.
14. Использование ПЦР-анализа для маркирования генов семейства *Cbf*, контролирующих низкотемпературную акклиматизацию у ячменя и мягкой пшеницы / И. А. Балашова, М. С. Бальвинская, В. И. Файт, М. В. Галаева, Ю. М. Сиволап // Биополимеры и клетка. — 2008. — Т. 24, № 2. — С. 129–134.
15. Спосіб диференціації і ідентифікації ярого та озимого ячменю : деклар. пат. № 69102. Україна / Бальвінська М. С., Балашова І. А., Сиволап Ю. М. // Бюл. ВАК України. — 2012. — № 8. — 4 с.
16. Erkkila M. Allele-dependent barley grain  $\beta$ -amylase activity / M. Erkkila, R. Leah, H. Ahokas [et al.] // Plant Physiol. — 1998. — № 117. — P. 679–685.
17. Domon E. The insertion/deletion polymorphisms in the *waxy* gene of barley genetic resources from East Asia / E. Domon, M. Fujita, N. Ishikawa // Theor Appl Genet. — 2002. — Vol. 104. — P. 132–138.
18. Dubcovsky J. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley / J. Dubcovsky, C. Chen, L. Yan // Mol. Breed. — 2005. — Vol. 15. — P. 395–407.
19. Nowak M. Identyfikacja genów *Vrn* (*Hordeum vulgare* L.) / M. Nowak // Biuletyn instytut uhodowlii aklimatyzacji roślin. — 2009. — Vol. 252. — P. 179–185.
20. Lister D. L. Latitudinal variation in a photoperiod response gene in European barley: insight into the dynamics of agricultural spread from 'historic' specimens / D. L. Lister, S. Thawc, M. A. Bower, H. Jones // Journal of Archaeological Science. — 2009. — Vol. 36. — P. 1092–1098.



21. Haliloglu K. The novel approach towards estimation of frost tolerance in barley / K. Haliloglu, M. Tosun, T. Yildirim, M. Ayidin // *Biotechnol. & Biotechnol. eq.* — 2009. — Vol. 23, № 1. — P. 1131–1135.
22. Holkova L. Allelic Variations at *Dhn4* and *Dhn7* are Associated with Frost Tolerance in Barley / L. Holkova, P. Mikulkova, P. Hrstkova, I. T. Prášil [et al.] // *Czech J. Genet. Plant Breed.* — 2010. — Vol. 46, № 4. — P. 149–158.
23. Стратула О. Р. Аллельные варианты гена *Vmy1* ячменя в восточноевропейской и центральноазиатской зонах / О. Р. Стратула, Р. Н. Календарь, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика.* — 2015. — Т. 49, № 2. — С. 11–15.
24. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.
25. Sneath P. H. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification / P. H. Sneath, R. R. Socal — San Francisco: W. H. Freeman, 1973.
26. Бальвинская М. С. SSRP-анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя Южно-украинской селекции / М. С. Бальвинская, М. Reder, Ю. М. Сиволап // *Доклады РАСХН.* — 2001. — № 5. — С. 3–7. Фах. вид. ВАКУ.
27. Kleinhofs A. A Molecular, Isozyme, and Morphological Map of the Barley Genome (*Hordeum vulgare*) / A. Kleinhofs, A. Kilian, M. Saghai Maroof, R. M. Biyashev [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 1993. — Vol. 86. — P. 705–712.
28. Детекція господарсько цінних ознак насіння ячменю за ДНК-маркерами / М. С. Бальвінська, Р. М. Календар, О. Р. Стратула, І. В. Ланцман, Ю. М. Сиволап // зб. наук. праць «Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні». — Одеса, 2008. — С. 48–51.
29. Стратула О. Р. Аллельные характеристики гена  $\beta$ -амилазы сортов ячменя Украины / О. Р. Стратула, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика.* — 2007. — № 4. — С. 20–25.
30. Li C. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes / C. Li, J. M. Riethoven, L. Ma // *BMC Evolutionary Biology.* — 2010. — Vol 10. — P. 90.
31. Использование ДНК-маркеров для характеристики сортов и оценки агрономически важных признаков ячменя / М. С. Бальвинская, И. Л. Холявицкая, О. Р. Стратула, И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап // сб. науч. тр. по мат. Всеукраинской науч. конф. «Украинская научная мысль. Выпуск 1». — Киев, 2011. — С. 44–46.
32. Structural, functional, and phylogenetic characterization of large CBF gene family in barley / J. S. Skinner, J. Zitzewitz, L. Marquez-Cedillo, T. Filichkin [et al.] // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — V.59. — P.533–551.
33. Busconi M. The cold-regulated genes are involved in the physiological response of barley to cold environment / M. Busconi, Chr. Dal Bosco, Cr. Crosatti, P. Baldi [et al.] // *Buvisindi Icel Arg Sci.* — 2001. — Vol. 14. — P.17–27.
34. ДГ00–126 — модельний генотип для досліджень у галузі експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю ярого (*H. vulgare* L.) // Генетичні ресурси рослин для стабільного задоволення різноманітних потреб людей : матеріали Міжнародної наукової конференції. — Харків, 26–27 вересня 2012. — С.79.
35. Manninen O. M. Association between anther culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) [Text] / O. M. Manninen // *TAG.* — 2000. — Vol. 100. — P. 57– 62.

UDC 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

**Balvinska M. S., Kalendar R. M., Balashova I. A., Stratula O. R., Bryk O. F., Zakharova O. O., Sulima Yu. Yu., Bilinska O. V., Netsvetsev V. P.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **DNA TECHNOLOGY IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) GENETIC AND BREEDING RESEARCH SUMMARY AT PBGI–NCSCI**

Based on PCR-analysis of molecular and genetic polymorphisms of different barley genotypes DNA markers were obtained for the theoretical and practical applying. With the involvement of molecular genetics and genomics methods was conducted mapping of the genome, genotype differentiation in the degree of genetic relationship to intraspecies level, determination of genetic homogeneity and detection alleles of important barley gene, including b-amylase, development of types and rates, hordeins, content of amylose, resistance to low temperature, androgonic capacity of barley.

УДК 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

**Бальвинская М. С., Календарь Р. Н., Балашова И. А., Стратула О. Р., Брик А. Ф., Захарова О. А., Сулима Ю. Ю., Белинская Е. В., Нецветаев В. П.**

### **ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.) В СГИ–НЦСС**

На основе ПЦР-анализа молекулярно-генетического полиморфизма различных генотипов ячменя получены ДНК-маркеры для теоретического и практического использования. С привлечением методов молекулярной генетики и геномики проведено картирование генома ячменя, дифференциация генотипов по степени генетического родства на внутривидовом уровне, определение однородности генетического материала и детекция аллелей важных генов, в частности, в-амилаз, типов и темпов развития, гордеинов, содержания амилозы. Показана возможность выявления потенциальных ДНК-маркеров генов низкотемпературной чувствительности, андрогенной способности ячменя.

УДК 633.15:631.527

Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., с. н. с., гол. наук. співроб.,

Н. І. БУКРЕЄВА, к. б. н., наук. співроб.,

Г. І. СЛІЩУК, к. б. н., мол. наук. співроб.,

СГІ–НЦНС, Одеса

e-mail: natavolki@ukr.net

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ТА БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНОМУ КУКУРУДЗИ (*Zea mays* L.): РЕЗУЛЬТАТИ 25 РОКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ В СГІ–НЦНС**

*Досліджені різні фракції ядерного геному кукурудзи за молекулярними маркерами з метою диференціації, ідентифікації та реєстрації ліній/гібридів, маркування генів/локусів господарсько цінних ознак, прогнозування гетерозису.*

Ключові слова: *геном, молекулярні маркери, кукурудза, біотехнологія.*

**Вступ.** За масштабами поширення, універсальністю використання та енергетичної поживності кукурудза є однією з найважливіших продовольчих, кормових і технічних культур. Україна традиційно є однією з провідних країн світу з вирощування кукурудзи. Це обумовлено, насамперед, вигідним географічним розташуванням і сприятливими ґрунтово-кліматичними умовами. З появою нових біотехнологічних підходів у селекції рослин значення кукурудзи в світі та в Україні, зокрема, зростає ще більше.

В Україні молекулярно-генетичні дослідження геному кукурудзи започатковано академіком Ю. М. Сиволапом в Селекційно-генетичному інституті (м. Одеса). Результати вивчення організації та мінливості геному кукурудзи, що отримано до «ери ДНК-маркерів», узагальнено в монографії [1]. Аналіз поліморфізму різних фракцій геному кукурудзи за молекулярними маркерами методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) проводився під керівництвом академіка Ю. М. Сиволапа з початку 1990-х років.

Відносно молода галузь знань біоінформатика вже продемонструвала свою ефективність як потужний інструмент молекулярно-генетичних досліджень. Вона дозволяє робити теоретичні припущення з великою долею достовірності та значним прогностичним потенціалом. Вперше біоінформатичні дослідження кукурудзи, зокрема, дослідження структури та функціональних особливостей ядерного геному, також розпочато під керівництвом академіка Ю. М. Сиволапа.

**Мета** даної роботи полягала в узагальненні результатів дослідження різних ділянок ядерного геному кукурудзи за молекулярними маркерами для оцінки генетичного різноманіття, ідентифікації та реєстрації ліній/гібридів, маркування генів/локусів господарсько цінних ознак, прогнозування гетерозису.

**Матеріал і методи.** Для дослідження генетичного різноманіття використовували 145 інбредних ліній і 43 гібриди кукурудзи.

Для маркування локусів кількісних ознак використано елітні інбредні лінії ГК 26, Мо17, Одеська 308 МВ, Одеська 221 МВ, Одеська 329 та популяцію (ГК26 × Мо17)  $F_2$ . Подальший інбридинг популяції (ГК26 × Мо17)  $F_2$ – $F_6$  здійснювали шляхом індивідуальної ізоляції з самозапиленням кожної дібраної рослини.

Екстракція ДНК з проростків та листя, постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез в агарозних і поліакриламідних гелях здійснювали за загальноприйнятими методиками. Інформація щодо мікросателітних (МС) локусів та послідовностей праймерів наведена в електронній базі даних з генетики кукурудзи MaizeGDB.

**Результати.** Перші молекулярно-генетичні дослідження присвячені аналізу «поведінки» ПЛР-фрагментів в  $F_1$ -гібридах кукурудзи у порівнянні з батьківськими генотипами [2] та аналізу внутрішньовидової мінливості з використанням різних типів молекулярних маркерів на основі ПЛР [3–6]. За результатами тестування понад 100 МС локусів сформовано систему 20 молекулярних маркерів (за критеріями — локалізація локусів на різних хромосомах, значення індексу поліморфності (polymorphic index content, PIC) не менше 0,5, розмір повтору не менше 3 п. н., відтворюваність результатів).

Першим етапом досліджень є оцінка генетичної чистоти ліній та гібридів. Проведено тестування 145 інбредних ліній і 43 гібридів за трьома високополіморфними МС локусами phi064, phi079, phi015. Встановлено, що гетерогенність деяких ліній та гібридів не є генетично зумовленою. Проведено «вibraковування» нетипових зразків [7].

**Диференціація, ідентифікація, реєстрація ліній та гібридів.** За 20 МС локусами проаналізовано 188 ліній та гібридів кукурудзи, для кожного генотипу отримано унікальні комбінації алелів МС локусів, що дозволило представити кожний генотип у вигляді так званої «ідентифікаційної формули». МС локус кодовано буквою англійського алфавіту (А–Т). Як нижній індекс використано розмір алеля даного локусу у парах нуклеотидів. 188 ліній та гібридів кукурудзи зафіксовано ідентифікаційними формулами [8–12].

Оцінено генетичне різноманіття ліній за допомогою молекулярних маркерів для виявлення можливості *прогнозування гетерозису* простих гібридів. З використанням полілокусної маркерної системи, яка дозволяє одночасно охарактеризувати велику кількість локусів, а саме ПЛР-аналізу ділянок між МС повторами, проаналізовано 15 ліній середньої групи стиг-

лості. За значенням генетичних дистанцій ( $D$ ) між лініями пари ліній розділені на чотири групи. Проведено діалельне схрещування вихідних ліній і отримано дані врожаю зерна ліній та відповідних гібридів, які використано для розрахунку дійсного гетерозису гібридів. Порівняли групування ліній за генетичними дистанціями з рівнем гетерозису та виявили достовірну кореляцію між цими показниками. За припущенням впливу на прояв гетерозису сполучення алелів певних локусів, проведено ПЛР-аналіз 20 МС локусів. Порівняння алельного складу МС локусів лінії та середнього рівня гетерозису гібридів, отриманих від схрещування даної лінії з рештою, показало достовірну кореляцію за дев'ятьма МС локусами. Це дало можливість записати модельні ідентифікаційні формули ліній, що мають імовірно різну комбінаційну здатність. Для перевірки цього припущення порівняли формули модельної лінії з високим рівнем комбінаційної здатності, ліній-стандартів і проаналізованих ліній, гібриди від схрещування яких з рештою проявили середній рівень гетерозису вище 149 %. Лініями-стандартами були найбільш розповсюджені лінії, що входять до складу гібридів — національних стандартів середньої групи стиглості, до якої відносять і аналізовані нами лінії. Однаковий алельний склад більшості МС локусів у ліній-стандартів, модельної лінії і досліджених ліній, гібриди яких мали високий рівень гетерозису, підтвердив можливість використання даного підходу для прогнозування отримання високогетерозисних гібридів у комплексі з оцінкою генетичних дистанцій між вихідними лініями [13].

*Молекулярно-генетичний аналіз генів/локусів, пов'язаних з агрономічно важливими ознаками.* Для супроводу традиційної селекції добором за молекулярними маркерами необхідна ідентифікація генів/локусів цільової ознаки, зокрема толерантності до абіотичних та біотичних факторів навколишнього середовища, пов'язаних з кількістю та якістю врожаю зерна *etc.*

Одним з найбільш шкочинних патогенів кукурудзи є гриби роду *Fusarium*. З використанням BSA-підходу (Bulked Segregant Analysis) проведено генотипування  $F_2$ -популяції, отриманої від схрещування ліній кукурудзи Одеська 139 і R221, контрастних за стійкістю до фузаріозних гнилей. За допомогою різних типів молекулярних маркерів (ПЛР із 38 парами SSR-, п'ятьма STS-, 24 ISSR- та 23 довільними праймерами) тестовано ДНК ліній Одеська 139 і R221 та сумішей доміантних і рецесивних гомозиготних  $F_2$ -зразків на наявність поліморфізму. В результаті досліджень визначено локус RGA11, який зчеплений з локусом стійкості до фузаріозної гнилі на відстані 18,3 сМ [14–16].

У насінництві кукурудзи широко використовується явище цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС). Досліджено поліморфізм ділянок мітогеному, асоційованих з розвитком ЦЧС трьох типів (техаського, молдавського, чаруа), підтверджено їхній зв'язок з певним типом ЦЧС. Проведено молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму гена *whp1*, що входить до складу кластера гена-відновлювача фертильності пилку мол-

давського типу. Нами розроблено маркери VSG1A та VSG1C доміантного та рецесивного алелів гена *Rf3*: перший специфічний для регіону промотору, другий — для регіону інтрону. Отже, розроблено маркерну систему для комплексної оцінки генотипів кукурудзи за ознаками ЦЧС та відновлення фертильності пилку [17–21].

В умовах глобального потепління для підвищення врожайності кукурудзи в екстремальних умовах важливо використовувати гібриди, толерантні до високотемпературного стресу, який поєднується з дефіцитом вологи. За допомогою ПЛР-аналізу досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм *hsp*-генів, які кодують білки теплового шоку, зокрема і шаперони (*cpn*-гени): *hsp3*, *hsp90*, *hsp101*, *cpn10*, *hsp18a*, *hsp26/1*. Визначені набори алелів досліджених локусів, найбільш характерні для стійких і нестійких до посухи ліній кукурудзи [22].

Забезпечення людства якісним повноцінним харчуванням, збалансованим за складом і вмістом необхідних для організму елементів, є однією з найважливіших проблем сучасності. Нами розпочато молекулярно-генетичні дослідження генів, що пов'язані з біохімічним складом зерна кукурудзи, зокрема тих, що кодують ферменти синтезу каротиноїдів та крохмалю.

*Маркування локусів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci, QTL).* Вивчено мінливість кількісних агрономічно цінних ознак, серед яких ті, що формують габітус рослини, ознаки морфології волоті, складові продуктивності та біохімічні, на гібридних популяціях (ГК26 x Мо17)  $F_2$  та  $F_3$  з використанням SSR-, RAPD- та ISSR-маркерів. Отримані маркери використано для розроблення технології прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях кукурудзи на підставі їхнього зв'язку з ДНК-маркерами [23–27]. Детально цю роботу викладено у статті А. О. Белоусова з співавторами у цьому збірнику.

У рамках вивчення успадковування кількісної ознаки «урожайність зерна» у пізніх генераціях популяції кукурудзи рекомбінантних інбредних ліній (РІЛ) (ГК 26 x Мо17)  $F_4$ ,  $F_6$  та з метою маркування QTL продуктивності кукурудзи ідентифіковано генотипи інбредних батьківських ліній ГК26 і Мо17 за 47 МС локусами. Для подальшої роботи відібрано 10 локусів з чітко відтворюваними продуктами ампліфікації: *nc030*, *phi061*, *phi064*, *phi083*, *phi031*, *phi044*, *phi057*, *phi084*, *phi080*, *phi112*, що детектували поліморфізм у батьківських форм РІЛ, ліній ГК 26 і Мо17 у 8 хромосомах. За генотипування визначено алельний стан поліморфних SSR-локусів у РІЛ  $F_4$  та  $F_6$ , детектованих у вихідних форм ГК26 і Мо17.

З використанням підходів, описаних у [28], проведено маркування QTL у популяції РІЛ  $F_4$ ,  $F_6$ . Встановлено маркерні локуси, зчеплені з локусами, що асоціюються з відмінностями у прояві кількісних ознак. Пошук асоціацій 10 МС локусів з ознакою «урожайність зерна», детектованих у  $F_4$  та  $F_6$ , проводилися у різних умовах вирощування гібридів: ДГ «Дачна», 2005 р.; ДГ «Дачна», 2006 р.; ДГ «Новоселівське», 2006 р.

У тестерних гібридів РІЛ  $F_4$  з Од 308 МВ маркерними є алелі SSR-локусів з визначеною молекулярною масою: *phi 044\_76* (2,68); *nc 030\_112* (5,34); *phi 057\_158* (4,25); *phi 080\_158* (4,47); *phi 044\_72* (4,63); *phi 044\_76* (4,00); *phi 064\_86* (3,38); *phi 112\_161* (4,50); *phi 112\_137* (4,00). Визначені маркери, що детектують мінливість дослідної ознаки у тестерних гібридів РІЛ  $F_4$  з Од 329: *phi 031\_191* (3,68) *nc 030\_108* (3,68); *nc 030\_108* (5,36); *phi 084\_155* (5,66); *phi 083\_130* (3,56); *phi 061\_80* (5,98); *phi 064\_86* (3,57); *phi 064\_78* (6,57); *phi 112\_137* (4,41).

У гібридів РІЛ  $F_6$  з Од 308 МВ маркерними є локуси *phi 061\_80* (2,88); *phi 112\_161* (3,16); *phi 064\_86* (2,78); *phi 061\_80* (4,64); *phi 057\_154* (4,84); *phi 064\_86* (4,49); *phi 083\_161* (4,50). Маркери, що детектують мінливість дослідної ознаки у тестерних гібридів РІЛ  $F_6$  з Од 329: *nc 030\_108* (5,93); *nc 030\_108* (4,79); *phi 084\_159* (5,96); *phi 083\_130* (5,99); *phi 064\_86* (5,64); *phi 064\_86* (5,11); *phi 112\_161* (4,99) [29–32].

Отримані маркери використано для розробки схеми прогнозування групи гібридів з максимальною врожайністю, дібраних за маркерами QTL урожайності зерна на основі формування класів у популяціях РІЛ  $F_4$ ,  $F_6$  за генетичною дистанцією відносно ліній-тестерів Од 308 МВ, Од 221 МВ і Од 329, що дозволяє скорочувати обсяги сортовипробування і створення потенційно цінних генотипів [33].

Найбільш надійними маркерами можна вважати локуси, з якими зберігається достовірний зв'язок їхніх алелів з певним рівнем розвитку кількісної ознаки протягом кількох поколінь. Отримання кількох маркерних локусів для певної ознаки є найбільш об'єктивною інформацією з огляду на кількісний характер вивчених ознак. Такі маркерні локуси можуть міститися у різних хромосомах або ж успадковуватися як одне ціле у випадку попадання в одну групу зчеплення.

Дані з маркування кількісних ознак за результатами досліджень 2000–2006 років узагальнено у таблиці. Результати демонструють, що детектовані у сегрегуючих популяціях маркери ознак групи продуктивності одночасно є маркерами ознаки «урожайність зерна». Тобто, у  $F_4$  і  $F_6$  не відбулося відокремлення цих локусів у ході рекомбінації. За даними [34, 35] це свідчить про те, що між цими локусами і QTL продуктивності встановився значний зв'язок і таке зчеплення можна використовувати у якості надійного маркера для добору потенційно високопродуктивних форм.

Порівняння інформативності маркерних локусів у суміжних сегрегуючих популяціях ( $F_2$ - $F_3$ ) та несуміжних РІЛ з популяцій  $F_4$ ,  $F_6$  дозволило виявити МС маркери QTL, що впливають на формування ознак продуктивності кукурудзи у різних умовах вирощування. Найбільш інформативним за кількістю відтворених асоціацій з ознаками продуктивності протягом п'яти поколінь ( $F_2$ - $F_6$ ) виявився маркер *nc 030\_108*. Він відображає мінливість локусів, що впливають на формування таких ознак продуктивності: «маса 100 зерен», «глибина зернини», «довжина качана»,

Таблиця

Результати маркування ознак продуктивності у популяціях (ГК26 / Мо17)  $F_2$ - $F_6$ 

Маркерний локус	Ознака, маркована у РІЛ $F_4$ і $F_6$	Ознака, маркована у РІЛ $F_2$ і $F_3$			
	урожайність зерна	маса 100 зерен	довжина качана	глибина зернини	індивідуальна продуктивність
phi044	+	–	–	–	–
nc030	+, #	*	–	*	*
phi084	+, #	–	–	–	–
phi061	+, #	–	*	*	*
phi057	+, #	–	–	–	–
phi031	+	–	–	–	–
phi080	+	–	–	–	–
phi112	+, #	–	–	–	–
phi083	+, #	*	*	*	*
phi064	+, #	–	*	*	*

Примітки: + — зчеплення маркерних локусів у РІЛ  $F_4$ ; # — зчеплення маркерних локусів у РІЛ  $F_6$ ; \* — зчеплення маркерних локусів у популяціях  $F_2$ ,  $F_3$ ; — — відсутність асоціації.

«індивідуальна продуктивність» та «урожайність зерна». Маркер *phi 064\_86* пов'язаний з локусами, що впливають на мінливість двох ознак — «глибина зернини» і «урожайність зерна». Такі асоціації можуть свідчити про зчеплення даних локусів зі специфічними генами продуктивності. А враховуючи контрастні умови вирощування цих популяцій, збереження маркуючої здатності поліморфних локусів ДНК, можна вважати суттєвим доказом тісного зчеплення маркера з локусом кількісної ознаки.

Отже, у батьківських компонентів виявлено МС локуси, тісно пов'язані з ознаками продуктивності. Отримані результати пропонується застосовувати для індивідуального генотипового прогнозування розвитку певних агрономічних ознак, що дозволяє значно прискорити добір потрібного матеріалу вже за рік, починаючи з  $F_2$ , та для моделювання добору генотипів з високим рівнем розвитку ознак у субпопуляціях за маркерними алелями, що дозволить генетично поліпшувати базові популяції кукурудзи і використовувати їх як вихідний матеріал для гетерозисної селекції.

На сучасному етапі молекулярні маркери, розроблені в результаті дослідження поліморфізму різних ділянок геному кукурудзи, дозволяють проводити комплексну оцінку лінії чи гібрида кукурудзи — його генетичної чистоти, гетерозисного потенціалу, аутентичності, наявності генів певних агрономічно важливих ознак. Супровід традиційної селекції добром за молекулярними маркерами свідчить про сучасний та якісно новий рівень селекційного процесу.



*Біоінформатичний аналіз геному кукурудзи.* Біоінформатичні підходи використано для комплексного аналізу геному кукурудзи як для дослідження особливостей еволюції певних генів, їх філогенії, пошуку мікросателітів, інших повторів, поліморфних ділянок генів, дизайну праймерів, *in silico* ПЛР, також і для моделювання — вторинних структур протеїнів транскриптів, їх взаємодій.

Так, повний комплексний аналіз генів *Rf1* та *Rf2*, що відповідають за відновлення фертильності пилку у кукурудзи з техаським типом ЦЧС, дозволив нам вивчити їхні філогенію та особливості еволюції [36–38]. Знайдено, що ген *Rf1* належить до родини генів, що кодують білки з пентатрикопептидним мотивом, розроблений унікальний дизайн праймерів, що дозволяє диференціювати домінуючі та рецесивні алелі цих генів. Також саме біоінформатичний аналіз дозволив провести комплексне вивчення гена *whp1* з кластера гена-відновлювача фертильності пилку молдавського типу. Досліджено його філогенію, знайдено нові мікросателіти в промоторній та інтронній ділянках цього гена, розроблений дизайн шести пар праймерів до промотору, інтрону та екзону. Окрім того, саме за допомогою моделювання вторинної структури транскриптів інтрону цього гена, а також моделювання взаємодії цих транскриптів з ЦЧС-асоційованими транскриптами розроблено гіпотетичний механізм відновлення фертильності у кукурудзи з молдавським типом ЦЧС [39, 40].

Методами біоінформатики досліджували гени, що асоційовані зі структурою ендосперму кукурудзи. Так, вивчено ген *waxy1* кукурудзи, особливості його еволюції, поліморфізм, виявлено вплив на нього доместикації; розроблено дизайн праймерів, досліджено вторинну структуру мобільного елемента *Ds*, що локалізований в гені *waxy1* [41–43]. Проаналізовано також поліморфізм генів *Brittle1*, *Brittle2*, *shrunken1* [44, 45].

Біоінформатичні підходи застосовано у дослідженні гена фітоінсинтази кукурудзи, що асоційований з концентрацією каротиноїдів у зерні. Досліджено патерни нуклеотидних замін цього гена, нейтральність еволюції та потужність добору за певними кодонами за аналізом синонімічних та несинонімічних замін; розроблено дизайн праймерів, проведено моделювання структури активного центру даного ензиму [46–48].

Результати наведених молекулярно-генетичних та біоінформатичних досліджень знайшли вихід як молекулярні біотехнології для практичного застосування в селекції та насінництві кукурудзи, пріоритет яких захищено патентами України на винахід або корисну модель.

**Висновки.** Молекулярні маркери, розроблені в результаті дослідження поліморфізму різних ділянок геному кукурудзи, дозволяють проводити комплексну оцінку лінії чи гібрида кукурудзи: його генетичної чистоти, гетерозисного потенціалу, аутентичності, наявності генів певних агрономічно важливих ознак. Супровід традиційної селекції добором за молекулярними маркерами свідчить про сучасний та якісно новий рівень селекційного процесу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сиволап Ю. М. Геном растений и его улучшение / Ю. М. Сиволап. — К. : Урожай, 1994. — 191 с.
2. Кожухова Н. Э. Наследование продуктов амплификации ДНК у  $F_1$ -гибридов кукурузы и подсолнечника / Н. Э. Кожухова, А. Е. Солоденко, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 1998. — № 4. — С. 26–31.
3. Сиволап Ю. М. Исследование генетических взаимоотношений у линий кукурузы при помощи RAPD и зеинов / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Ю. А. Асыка // Цитология и генетика. — 1997. — Т. 31, № 1. — С. 16–20.
4. Вербицкая Т. Г. Дифференциация линий кукурузы при помощи молекулярных маркеров / Т. Г. Вербицкая, Н. Э. Кожухова, Д. И. Гужва и др. // Кукуруза и сорго. — 1997. — № 6. — С. 7–11.
5. Кожухова Н. Э. Молекулярно-генетический полиморфизм кукурузы / Н. Э. Кожухова, Т. Г. Вербицкая // Научно-методическое руководство «Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях» / под ред. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграрна наука, 1998. — С. 96–102.
6. Ефименко В. Г. Полиморфизм микросателлитной ДНК и изучение генетических ресурсов кукурузы / В. Г. Ефименко, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2005. — № 2. — С. 10–15.
7. Кожухова Н. Э. Определение «гибридности» простых гибридов кукурузы методом SSR-ПЦР / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап, Б. Ф. Вареник // Цитология и генетика. — 2001. — Т. 35, № 2. — С. 43–48.
8. Сиволап Ю. М. Идентификация инбредных линий кукурузы с помощью произвольно праймированной ПЦР и SSR-ПЦР / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Б. Ф. Вареник // Доклады РАСН. — 1999. — № 6. — С. 3–6.
9. Kozhukhova N. Maize genotypes differentiation, identification and registration by SSR-markers / N. Kozhukhova, Yu. Sivolap // Report on the Seventh Session of Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT) of UPOV. — Hanover, Germany. 21–23.11.2001. Document BMT/7/19. — 2002. — Annex III. — P. 11–15.
10. Кожухова Н. Э. Молекулярно-генетическая характеристика инбредных линий и простых гибридов кукурузы *Zea mays* L. / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап, Б. Ф. Вареник // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». — 2003. — С. 345–350.
11. Кожухова Н. Э. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Генетика. — 2004. — Т. 40, № 1. — С. 59–66.
12. Ефименко В. Г. Молекулярно-генетична характеристика генотипів кукурудзи за складом мікросателітних локусів / В. Г. Ефименко, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 21–30.
13. Кожухова Н. Э. Прогнозирующий потенциал ДНК-маркеров в гетерозисной селекции кукурузы / Н. Э. Кожухова, Б. Ф. Вареник, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2005. — № 1. — С. 14–20.
14. Кожухова Н. Э. Ідентифікація локусів геному кукурудзи, що детермінують стійкість до фузаріозної гнилі / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап, Б. Ф. Вареник // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». — 2006. — Т. 3. — С. 113–117.

15. Кожухова Н. Е. Маркування локусів, що детермінують стійкість кукурудзи до фузаріозних гнилей / Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап, Б. Ф. Вареник [та ін.] // Цитология и генетика. — 2007. — № 2. — С. 37–41.
16. Кожухова Н. Е. ДНК-маркер стійкості кукурудзи до фузаріозних гнилей та роль мобільних елементів в стійкості до фітопатогенів / Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Вісник ОНУ (Біологія). — 2007. — Т. 12, вип. 5. — С. 148–156.
17. Сліщук Г. І. Молекулярно-генетичний аналіз регіонів мітохондріону, асоційованих з ЦЧС, у кукурудзи / Г. І. Сліщук, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 3. — С. 15–19.
18. Сліщук Г. І. Біоінформатичний аналіз вторинної структури транскриптів інтрона 1 гена *whp1* кукурудзи / Г. І. Сліщук, Н. Е. Волкова, Ю. М. Сиволап // Biopolymers and Cell. — 2012. — Vol. 28, № 2. — P. 156–160.
19. Slischuk G. Maize restorer of fertility genes analysis by PCR-markers / G. Slischuk, N. Volkova // Збірник наукових праць СГІ–НЦНС. — 2013. — Вип. 21 (61). — С. 155–161.
20. Сліщук Г. І. Аналіз локусів, асоційованих з відновленням фертильності ЦЧС техаського типу кукурудзи / Г. І. Сліщук, Н. Е. Волкова // Наукові доповіді НУБіП України. — 2014. — Т. 48. — № 6. — Електронне видання.
21. Slischuk G. Molecular-genetics analysis of maize *whp1* gene and determination of its effect on pollen fertility restoring / G. Slischuk, N. Volkova // Modern Science. — 2014. — № 3. — P. 10–17.
22. Луцик А. П. Гени, що кодують білки теплового шоку кукурудзи: структура та поліморфізм / А. П. Луцик, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». — 2008. — Т. 4. — С. 173–177.
23. Belousov A. A. Heterosis of maize hybrids developed using DNA technologies / A. Belousov, V. M. Sokolov, Y. M. Sivolap [et al.] // Acta Agronomica Hungrica. Budapest. — 2006. — P. 391–396.
24. Доменюк В. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы / В. Доменюк, А. Белоусов, Ю. Сиволап // Цитология и генетика. — 2002. — № 6. — С. 12–19.
25. Доменюк В. Маркерный анализ количественных признаков кукурузы при помощи ISSR-ПЦР / В. Доменюк, Т. Вербицкая, А. Белоусов, Ю. Сиволап // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 9. — С. 1–9.
26. Доменюк В. П. Добір за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак в селекції кукурудзи / В.П. Доменюк, А. О. Белоусов, Ю. М. Сиволап // Вісник Харківського національного аграрного університету. — 2003. — № 3 (2). — С. 87–91.
27. Патент України на винахід № 86180. Спосіб прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях злакових культур / А. О. Белоусов, Ю. М. Сиволап, В. М. Соколов, В. П. Доменюк // Південний біотехнологічний центр в рослинництві. Дата публ. 10.04.2009 р. Бюл. № 7.
28. Tanksley S. D. Mapping polygenes / S. D. Tanksley // Annu. Rev. Genet. — 1993. — Vol. 27. — P. 205–233.
29. Сторчеус Н. І. Створення та ПЛР-аналіз генетичного матеріалу в дослідженні гетерозису кукурудзи / Н. І. Сторчеус, А. О. Белоусов, Ю. М. Сиволап // Вісник ОНУ. — С. 55.

30. Букреєва Н. І. Кластерно-кореляційний аналіз популяцій рекомбінантних ліній і гібридів кукурудзи на основі SSR-ПЛР / Н. І. Сторчеус, А. О. Белоусов, Ю. М. Сиволап // Вісник ОНУ. — 2011. — Т. 16, вип. 6. — С. 23–33.
31. Букреєва Н. І. ДНК-прогнозування добору батьківських генотипів для отримання високопродуктивних гібридів кукурудзи / Н. І. Букреєва, А. О. Белоусов, В. М. Соколов, Ю. М. Сиволап // Збірник наукових праць СГІ–НЦНС. — 2012. — Вип. 19 (59). — С. 82–93.
32. Букреєва Н. І. Алельний склад поліморфних локусів ліній і гібридів та його зв'язок з рівнем гетерозису у кукурудзи / Н. І. Букреєва, А. О. Белоусов, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2014. — Т. 48, № 2. — С. 12–19.
33. Деклараційний патент України на корисну модель № 72116. Спосіб ДНК-прогнозування добору батьківських компонентів для отримання високопродуктивних гібридів кукурудзи / А. О. Белоусов, Ю. М. Сиволап, В. М. Соколов, Н. І. Букреєва // Південний біотехнологічний центр в рослинництві. Дата публ. 10.08.12, Бюл. № 15.
34. Schrag T. A. Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses / T. A. Schrag, A. E. Melchinger // Theor. Appl. Genet. — 2009. — Vol. 118. — P. 741–751.
35. Albrecht T. Genome-based prediction of maize hybrid performance across genetic groups, testers, locations, and year / T. Albrecht, H.-P. Piepho, C.-C. Schön // Theor. Appl. Genet. — 2014. — Vol. 127. — P. 1375–1386.
36. Сліщук Г. І. Біоінформатичний аналіз генів мітохондріальних альдегіддегідрогеназ представників родини *Poaceae* / Г. І. Сліщук, Н. Е. Кожухова // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». — Київ : Логос, 2011. — Т. 9. — С. 93–97.
37. Слищук Г. И. Филогенетический анализ митохондриальной альдегиддегидрогеназы кукурузы (*Zea mays* L.) / Г. И. Слищук // XVIII Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «ЛОМОНОСОВ». — РФ, Москва, 11–15.04.2011 р. — С. 37–38.
38. Slischuk G. Polymorphism of maize *Rf1* locus, revealed by bioinformatics method / G. Slischuk // V Міжнародна конференція молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція». — Одеса, 13–17.06.2011 р. — С. 124–125.
39. Сліщук Г. І. Біоінформатичний аналіз *whp1* гена кукурудзи (*Zea mays* L.) / Г. І. Сліщук, Н. Е. Кожухова // Міжнародна конференція «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека» («Геном рослин VI»). — Одеса, 07–10.09.2010 — С. 55.
40. Сліщук Г. І. Щодо можливого механізму відновлення фертильності у кукурудзи з молдавським і техаським типом ЦЧС / Г. І. Сліщук, Н. Е. Волкова // Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур». — Одеса, 28–30.10.2014 р. — С. 65–66.
41. Баранов Ю. О. Біоінформатичний аналіз гена, що кодує гранулоасоційовану крохмальсинтазу, кукурудзи / Ю. О. Баранов, Г. І. Сліщук, Н. Е. Волкова [та ін.] // Цитология и генетика. — 2014. — Т. 48, № 3. — С. 18–23.
42. Baranov Y. Bioinformatic analysis of maize *waxy1* gene / Y. Baranov, G. Slischuk, N. Kozhukhova // The 4th International IMBG conference for young scientists «Molecular biology: advances and perspectives», Kyev, 14–17.09.2011. — P. 202.

43. Baranov Y. Maize waxy gene and Ds mobile element secondary structure polymorphism / Y. Baranov, G. Slischuk, N. Volkova // 54th Annual Maize Genetics Conference, Portland, USA, 15–18.03.2012. — P. 202.
44. Baranov Y. Maize *Brittle1* and *Brittle2* genes polymorphisms bioinformatic analysis / Y. Baranov, G. Slischuk, N. Volkova, Y. Sivolap // 55th Annual Maize Genetics Conference, St. Charles, USA, 14–17.03.2013. — P. 114.
45. Баранов Ю. О. Філогенетичний аналіз гена *shrunkен1* кукурудзи / Ю. О. Баранов, Г. І. Сліщук, Н. Е. Волкова та ін. // Збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології». — 2012. — Т. 4. — С. 18–22.
46. Жуков Б. С. Біоінформатичний аналіз *у1* гена кукурудзи / Б. С. Жуков, Г. І. Сліщук // ІІІ Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології», Донецьк, 24–27.02.2014 р. — С. 245–246.
47. Жуков Б. С. Аналіз поліморфізму гена *у1* кукурудзи біоінформатичними методами / Б. С. Жуков, Г. І. Сліщук // Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур», Одеса, 28–30.10.2014 р. — С. 51–52.
48. Жуков Б. С. Філогенетичний аналіз *у1* гена кукурудзи / Б. С. Жуков, Г. І. Сліщук, Н. Е. Волкова // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. — 2014. — № 2. — С. 7–14.

Надійшла 13.05.2015.

UDC 633.15:631.527

**Volkova N., Bukreeva N., Slischuk G.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**MOLECULAR-GENETICS AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF MAIZE (*Zea mays* L.) GENOME POLYMORPHISM: RESULTS OF 25 YEARS' RESEARCH IN PBGI-NCSCI**

As a result of molecular-genetic and bioinformatic research of maize genome different regions polymorphism molecular markers developed that allow for a comprehensive definition of maize line or hybrid: its genetic purity, heterosis potential, authenticity, presence of genes of certain agronomically important traits.

УДК 633.15:631.527

**Волкова Н. Э., Букреева Н. И., Слищук Г. И.**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ  
АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМА КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.):  
РЕЗУЛЬТАТЫ 25 ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ В СГИ–НЦСС**

В результате молекулярно-генетических и биоинформатических исследований полиморфизма различных участков генома кукурузы разработаны молекулярные маркеры, которые позволяют проводить комплексную оценку линии или гибрида кукурузы: генетической чистоты, гетерозисного потенциала, аутентичности, наличия генов определенных агрономически важных признаков.

УДК 575.11.113:854.78

А. Є. СОЛОДЕНКО<sup>1</sup>, к. б. н., пров. наук. співроб.,

Б. Ф. ВАРЕНИК<sup>1</sup>, к. с.-г. н., зав. від.,

В. В. БУРЛОВ<sup>2</sup>, д. б. н.,

К. В. ВЕДМЕДЄВА<sup>3</sup>, к. б. н., зав. лаб.

<sup>1</sup>СГІ– НЦНС, Одеса

<sup>2</sup>ТОВ АПФ «Флора», Одеса

<sup>3</sup>Інститут олійних культур НААН України, Запоріжжя

e-mail: angelika\_solo@yahoo.com

## **ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦІЙНИХ ПРОГРАМАХ СОНЯШНИКУ (*Helianthus annuus* L.)**

*Досліджено поліморфізм генотипів соняшнику української та закордонної селекції з застосуванням молекулярних маркерів. Запропоновані методичні підходи для диференціації та класифікації різноманітного вихідного матеріалу, ідентифікації певних генів стійкості соняшнику до вовчка, несправжньої борошністої роси (НБР), до АНАС-інгібуючих гербіцидів. Обговорюється можливість використання запропонованих ДНК-маркерів у генетико-селекційних програмах.*

*Ключові слова: соняшник, ДНК-маркери, класифікація, стійкість, несправжня борошніста роса, вовчок, гербіциди.*

**Вступ.** Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму певних ДНК-локусів є ефективним заходом в генетиці та селекції сільськогосподарських рослин. Аналіз означеного поліморфізму соняшнику дозволяє оцінити генетичне різноманіття, класифікувати вихідний селекційний матеріал, маркувати гени господарсько цінних ознак, а також вести генетичний моніторинг у селекції та насінництві [1].

Соняшник — одна з найбільш рентабельних культур в Україні, все ж потребує удосконалення певних етапів селекційного процесу та насінництва, використання сучасних досліджень специфічності генотипів та розробки і впровадження маркерних технологій. Одним з найбільш перспективних джерел кодомінантних маркерів для застосування в маркеропосередкованій селекції є поліморфізм мікросателітної ДНК.

Ефективність селекції досліджуваної культури чимало залежить від допосівної діагностики генетично детермінованої стійкості до найбільш шкочинних патогенів: рослини-паразита вовчка (*Orobanche cymosa* L.) та паразита грибної природи — несправжньої борошністої роси (*Plasmopara helianthi* Novot.). Екологічно безпечним та економічно вигідним способом боротьби з вовчком та несправжньою борошністою

росою є селекційний — створенням і вирощуванням сортів та гібридів з високою генетичною стійкістю.

Стійкість до вовчка контролюється доміантними генами *Or*. Стійкість до найагресивніших доміантних рас НБР контролюється низкою генів *Pl*, які згруповані в декілька кластерів: тісно зчеплені гени *Pl1*, *Pl2*, *Pl6*, *Pl7*, що картовані на 8 групі зчеплення генетичної карти соняшнику; кластер генів 13-ї групи зчеплення *Pl5/Pl8*; гени *Pl13* та *Pl<sub>ARG</sub>*, локалізовані на 1 групі зчеплення [2]. Найбільш об'єктивна оцінка потенційної стійкості соняшнику до вовчка та *Plasmopara helianthi* пов'язана з можливістю виявляти наявність у геномі рослини генетичних детермінант стійкості — генів *Or* та *Pl*. Застосування ДНК-маркерів до генів *Or* дозволить скоротити терміни тестування стійкості генотипів, а також, що важливо в селекції, проводити такий аналіз на будь-якій стадії розвитку рослини.

Реалізація потенційної продуктивності вітчизняних гібридів соняшнику можлива лише за умов, коли гібриди поєднуюватимуть її з генетично зумовленою стійкістю до високоефективних гербіцидів. Найбільш вживані гербіциди, які належать до імідазолінонової та сульфонілмочевинної груп, інгібують фермент синтезу амінокислотних ланцюгів — синтазу ацетогідроксикислоти (acetohydroxycidsynthase, AHAS), що призводить до фатального порушення метаболізму у чутливих до дії гербіцидів рослин [3]. Стійкість до гербіцидів, які інгібують AHAS, виникає в рослин у результаті точкових мутацій у генах, що кодують синтез даного ферменту. У соняшнику мутантні гени AHAS інтрогресовані зі зразків дикорослих популяцій (ANN-PUR та ANN-KAN) в елітні інбредні лінії з метою створення стійких сортів та гібридів [4, 5]. Досліджена молекулярна структура генів *AHAS1*, *AHAS2*, *AHAS3* [6]. Аналіз послідовності гена *AHAS1* у 23 інбредних ліній дозволив виявити 48 SNPs та варіацію за кількістю [ACC] n повторів [7].

**Метою** нашої роботи була оцінка молекулярно-генетичного поліморфізму соняшнику та розробка системи ДНК-маркерів генів *Or*, *Pl*, *AHAS* для використання в генетико-селекційних програмах, спрямованих на створення генотипів з потрібними запрограмованими господарсько цінними ознаками.

**Матеріали та методи.** Матеріалом дослідження слугували представники дикорослих видів *Helianthus* L.; самозапилені лінії та гібриди різних років створення, колекційні зразки СГІ–НЦНС, Інституту олійних культур НААН (ІОК), Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (ІР); лінії-диференціатори стійкості соняшнику до певних рас несправжньої борошністої роси (НБР): HA-288, RHA-265, RHA-274, DM-2, PM-13, PM-17, 803-I, QHP-1, FT-226 (аналог QHP-1), HA-R4, HA-R5, HA-335, RHA-419, які входять до міжнародного стандарту для ідентифікації патотипів збудника НБР *Plasmopara helianthi* Novot. та оцінки стійкості культури до різних рас НБР, а також зразки *H. argophyllus* з колекцій СГІ–НЦНС і ІОК.; 16 субліній соняшнику, виділених з комерційних ліній-закріплювачів стериль-



ності X1002, X2111, X2122, X1006 селекції IP; лінія КЛВ 80/1 та її спонтанні мутантні форми, отримані в ІОК; лінії, отримані з National Germplasm Resources Laboratory (North Central Regional PI Station, North Dakota, USA) для використання в селекційних програмах СГІ–НЦНС зі створення стійких до гербіцидів батьківських ліній та гібридів: SURES-1, HA-425, RHA-426, RHA-427, HA-442, RHA-443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, IMISUN-4, Sumo-1, Sumo-2, а також нестійкі до гербіцидів лінії селекції СГІ–НЦНС ОС1011 та ОС1013, які залучаються до програми створення гербіцидостійких гібридів, адаптованих до умов України.

ДНК виділяли цетавлоновим методом. Ампліфікацію здійснювали на приладі «Терцик» (ДНК–технологія, Росія). Електрофорез продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) проводили в 10 % поліакриламідних гелях з наступною візуалізацією азотнокислим сріблом. Документували отримані електрофореграми цифровою відеокамерою. Частоту стрічальності та індекс поліморфності (Polymorphic Index Content, PIC) розраховували за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2,$$

де  $f_i^2$  — частота і-го алеля.

**Результати досліджень та обговорення.** Різні варіанти полімеразної ланцюгової реакції використані для дослідження геному соняшнику з метою вирішення ряду теоретичних та прикладних питань.

**Молекулярно-генетичний поліморфізм соняшнику на між- та внутрішньовидовому рівнях.** Досліджено генетичне різноманіття представників роду *Helianthus*, а також генотипів соняшнику української та закордонної селекції з використанням полілокусних та монолокусних маркерних систем [8, 9]. Проаналізовано поліморфізм довільно ампліфікованої ДНК 35 видів та підвидів роду *Helianthus* [10]. Порівняльний аналіз спектрів ампліфікації дозволив визначити генетичні дистанції між різними *Helianthus sp.* Розподіл видів у цілому відповідає морфологічному поділу даного роду на секції. Відзначено, що селекційні лінії відрізняються одна від іншої більше, ніж представники різних підвидів дикорослих видів *Helianthus*.

Аналіз генетичних дистанцій, що розраховані на підставі даних поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК, дозволив класифікувати інбредні лінії соняшнику згідно ступеню генетичної віддаленості, розподілити лінії на групи материнських та батьківських форм [11]. Інформація про генетичну спорідненість ліній, що базується на результатах молекулярно-генетичного аналізу, може бути застосована в гібридній селекції при доборі батьківських пар. Виявлена можливість прогнозування низькогетерозисних гібридів, що дозволяє їхню відбраковуку на початкових етапах селекційного процесу, базуючись на результатах дослідження поліморфізму ДНК батьківських ліній [12].

Проаналізовано поліморфізм мікросателітної ДНК 21 виду роду *Helianthus*, які активно залучаються до міжвидової гібридизації з культурним соняшником як донори агрономічно цінних ознак [13]. Виявлено видоспецифічні алелі, які є потенційними маркерами наявності чужорідного генетичного матеріалу в геномі віддалених гібридів.

Аналіз поліморфізму мікросателітної ДНК використали для дослідження різноманіття селекційного матеріалу. Виявлені 77 алелів 16-ти мікросателітних локусів дозволили диференціювати інбредні лінії згідно їхнього походження [9]. Визначено алелі, що є характерними для генетичного матеріалу певного селекційного центру: алелі 164 п. н. і 173 п. н. (локус *Ha1608*) виявлено лише у інбредних ліній селекції ІОК; алель 172 п. н. (локус *ORS4*), алель 252 п. н. (локус *Ha1796*) і алель 204 п. н. (локус *ORS509*) зустрічаються лише у генотипів селекції СГІ–НЦНС. В одному з найбільш варіабельних локусів (*ORS595*) детектовано вісім алелів, з яких алель 179 п. н. виявлено тільки у генотипів ІОК та СГІ–НЦНС, алелі 185 п. н. і 140 п. н. зустрічаються лише у генотипів СГІ–НЦНС, алелі 168 п. н., 127 п. н. і 173 п. н. є характерними для ліній і гібридів Інституту рослинництва.

Порівняння даних аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму селекційних форм різних років створення дозволило виявити звуження генетичного різноманіття генотипів соняшнику, які використовуються для створення сучасних українських гібридів [14, 15]. В середньому у ліній, які занесені в Реєстр сортів рослин України після 2006 р., виявлено 3 алелі на мікросателітний локус, індекс поліморфності дорівнює 0,48. Для порівняння, на вибірці з двадцяти елітних інбредних ліній, які є батьківськими формами високопродуктивних українських гібридів соняшнику селекції кінця 90-х років, інформаційні показники досліджених мікросателітних локусів значно вищі: 5,5 алеля в локусі, PIC=0,72 (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняння показників інформативності мікросателітних локусів, отриманих для ліній різних років створення

Локус	Кількість алелів		Індекс поліморфності	
	лінії селекції 90-х років	лінії, зареєстровані після 2006 р.	лінії селекції 90-х років	лінії, зареєстровані після 2006 р.
<i>Ha 1796</i>	3	3	0,62	0,43
<i>Ha 1608</i>	8	2	0,84	0,50
<i>ORS 3</i>	5	2	0,72	0,51
<i>ORS 4</i>	3	3	0,64	0,51
<i>ORS 78</i>	5	5	0,74	0,68
<i>ORS 509</i>	8	4	0,78	0,63
<i>ORS 595</i>	7	1	0,80	0
<i>ORS 599</i>	8	3	0,77	0,49
<i>ORS 1024</i>	5	5	0,69	0,68
<i>ORS 409</i>	4	2	0,67	0,44
<i>ORS546</i>	5	3	0,70	0,36

Властива мікросателітним маркерам кодомінантна природа успадкування дозволяє досліджувати алейне різноманіття певних локусів геному та виявляти гетерозиготи. Саме тому цей тип маркерів є незамінним при ідентифікації генотипів. Високий ступінь гетерозиготності за гіперваріабельними мікросателітними локусами сприяє їхньому використанню як кодомінантні маркери при визначенні гібридності простих гібридів соняшнику  $F_1$ . Нами запропоновано надійний, точний та швидкий спосіб оцінки рівня гібридності в партіях насіння простих гібридів за результатами молекулярно-генетичного тестування [16], а також технологія ідентифікації і реєстрації інбредних ліній і гібридів у вигляді генетичної формули генотипу за результатами ПЛР-аналізу мікросателітної ДНК [17, 18].

Високий рівень однорідності та можливість її прискороного досягнення для самозапильних ліній соняшнику завжди були актуальними. Останнім часом зросла значущість однорідності ліній у зв'язку з підвищеними вимогами при їхньому патентуванні. Генетична неоднорідність інбредних ліній призводить до того, що в більшості випадків індивідуальний добір у межах так званих чистих ліній створює нові лінії чи сорти. Неоднорідність ліній може пояснюватися випадковим перезапиленням, прихованою гетерозиготністю, появою мутацій. В практичній селекції поняття «чистої лінії» замінили визначенням «лінії». Головною відмінністю лінії від чистої лінії можливо вважати її відносну гомозиготність, що дає можливість здійснювати внутрিলінійний добір, в першу чергу за господарсько цінними ознаками. В наших дослідженнях полілокусний маркерний ДНК-аналіз застосовано для контролю однорідності самозапильних ліній соняшнику в процесі їхнього насінництва [19]. Метою роботи було визначення поліморфізму між сублініями, які відрізняються візуально за низкою морфологічних і селекційно-цінних ознак. Застосуванням ДНК маркерів вивчили 16 субліній, які були виділені за показниками продуктивності та комбінаційної здатності з комерційних ліній-закріплювачів стерильності: X1002, X2111, X2122, X1006. В деяких випадках виявлено значний рівень генетичних розбіжностей між дібраними сублініями.

Проведено дослідження молекулярних і цінних селекційних ознак мутантних ліній соняшнику у порівнянні з вихідними лініями [20]. Спонтанні природні мутанти, які значно відрізнялися за низкою морфологічних ознак та селекційних параметрів від похідної лінії, показали найбільші генетичні відстані від неї за результатами аналізу поліморфізму ДНК. Так, наприклад, максимальну віддаленість від вихідної форми лінії КЛВ80/1, за даними молекулярного аналізу, показала мутантна форма М-10. Такий результат добре корелює з тим, що між цими зразками виявлені достовірні відмінності за низкою селекційних показників, насамперед важливим є достовірне збільшення загального врожаю лінії М-10. Мутантна форма М-23, для якої виявлено значну відмінність за ДНК-маркерами від вихідної лінії КЛВ 80/1, показала достовірне збільшення за важливим селекційним показником — масою 1000 насінин. Мінімально відрізня-

лися КЛВ 80/1 і М-17, і саме вони не показали жодних розбіжностей за 12 проаналізованими морфометричними та селекційними показниками. Використання молекулярного дослідження дало можливість виявити генетичну мінливість мутантних ліній та оцінити кількісно потенціал відмінності останніх від вихідної форми.

**Маркування генів стійкості соняшнику до вовчка та несправжньої борошнистої роси.** Виявлені ДНК-маркери, що диференціюють контрастні за стійкістю до раси С зразки соняшнику, а також зчеплення отриманих маркерів та локусу *Or3*, який контролює стійкість до рас А-С [21, 8]. Визначення алельного складу ліній та гібридів за локусами геному соняшнику *RTS 338\_A*, *RTS 338\_C*, *RTS 338\_D*, *ORS1036* запропоновано нами як спосіб ідентифікації стійких до вовчка генотипів [22]. Найбільш ефективним для тестування наявності генетично детермінованої стійкості до вовчка рас А-С визнано мікросателітний локус *ORS1036*. Означений ДНК-маркер зчеплено з локусом *Or3* на відстані 8 сМ. Продемонстровано ефективність маркера у 90,7 % проведених тестувань [23].

Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм ліній-носіїв генів *Pl* та ліній, які не мають генів стійкості, за алелями мікросателітних локусів, локалізованих на 1, 8, 13 групах зчеплення генетичної карти соняшнику [24]. Генотипування ліній-диференціаторів, а також селекційних ліній 9A, 108A та OC1029B проведено за 34 мікросателітними локусами, які локалізовані на відстані не більше 10 см від кластерів генів *Pl*.

За даними літератури кілька мікросателітних локусів з 8-ї групи зчеплення, а саме: *ORS1043*, *ORS166*, *ORS37*, виявилися ефективними маркерами при аналізі успадковування в селекційних популяціях  $F_3$  гена *Pl6*, джерелом якого слугувала інтрогресивна лінія НА-336 [25]. У наших дослідженнях виявлено поліморфізм, який не пов'язаний з присутністю в генотипі ліній генів *Pl1*, *Pl2*, *Pl6*. Проте деякі визначені алелі можуть бути корисними як маркери генетичного матеріалу лінії-носія гена стійкості, яка залучається в селекційні схеми отримання нових, стійких до НБР ліній і гібридів соняшнику. Так, наприклад, лінії НА-335, 803-І, НА-R4, НА-R5, QHP-1, RHA-419 виявилися поліморфними за локусом *ORS328*. Дослідження расового складу популяції НБР на півдні України свідчать про актуальність залучання в селекційний процес саме цих ліній як донорів генів, які забезпечують надійну стійкість [26]. Детекція певних алелів мікросателіта *ORS328* у зразків з популяцій, які отримані із використанням як батьківської форми лінії НА-335, дозволить ідентифікацію тих, що несуть генетичний матеріал, характерний саме для цієї лінії-носія гена *Pl6*.

14 мікросателітних локусів були залучені нами до пошуку маркерів генів стійкості до НБР, локалізованих на 13-й групі зчеплення. Виявлено характерний для лінії QHP-1 алель розміром 410 п. н. локусу *ORS781*, який може бути корисним при маркерному доборі рекомбінантів, враховуючи активне використання цієї лінії як донора гена *Pl8*.

16 мікросателітів, які картовані на 1 групі зчеплення генетичної карти, досліджені з метою ідентифікації маркерів гена  $PI_{ARG}$  [27]. Ген  $PI_{ARG}$  надає універсальної стійкості проти всіх відомих на даний час рас НБР. Даний ген інтродуковано в геном культурного соняшнику з дикорослого виду *H. argophyllus*. RHA-419 — є однією з ліній-носіїв гена стійкості  $PI_{ARG}$ . Дикорослі споріднені види, зазвичай, використовують в селекційних програмах як донорів генів стійкості до різноманітних абіотичних стресів та несприятливих біотичних чинників. *H. argophyllus* і лінія RHA-419 активно залучаються в селекцію з метою створення нових стійких генотипів. Детекція певних ДНК маркерів у зразків з гібридних популяцій та бекросів, які отримані із використанням в якості батьківської форми *H. argophyllus* або лінії RHA-419, дозволить ідентифікацію тих, що несуть генетичний матеріал, характерний саме для донора гена  $PI_{ARG}$ . В нашому дослідженні виявлені маркерні алелі, характерні для *H. argophyllus*: 190 п. н. (локус *ORS605*), 220 п. н. (*ORS1039*), 315 п. н. (*ORS716*), а також для лінії RHA-419: 197 п. н. (*ORS605*), 130 п. н. (*ORS610*), 190 п. н. (*ORS1039*). Алелі 207 п. н. (локус *ORS509*), 165 п. н. (*ORS1182*) і 220 п. н. (*ORS675*) дозволяють ідентифікувати фрагмент першої групи зчеплення, який має походження від *H. argophyllus* або лінії RHA-419. Так, наприклад, у локусі *ORS1039* виявлено три алеля, один з них характерний для *H. argophyllus*, другий — для лінії RHA-419, третій — для всіх інших досліджених ліній (рис. 1).

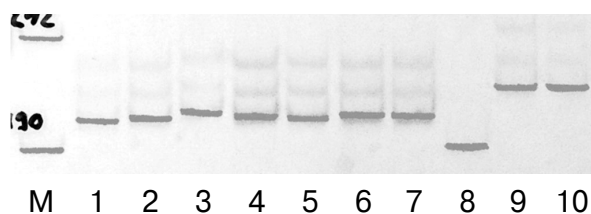


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *ORS1039*: 1 — HA-228; 2 — QHP-1; 3 — FT-226; 4 — HA-335; 5 — Од9А; 6 — Од108А; 7 — ОС1029В; 8 — RHA-419; 9 — *H. argophyllus* (зразок 1); 10 — *H. argophyllus* (зразок 2); М — маркер молекулярної маси ДНК рUC 19 / *MspI* (фрагменти 190 та 242 п. н.)

На генетичній відстані 15,6 сМ від гена  $PI_{ARG}$  картований ген стійкості *PI13*, який фланковано мікросателітами *ORS1008* та *ORS965–1* [28]. Носіями гена *PI13* є лінії HA-R4, HA-R5, які походять з аргентинських сортів, та створеної у Франції лінії QHP-1. У нашому дослідженні в локусі *ORS1008* визначено три алеля: 330 п. н., 297 п. н. та 295 п. н. Для ліній PM-17 та QHP-1 характерні два алеля: 330 п. н. і 297 п. н. У лінії HA-R4 виявлено лише алель 297 п. н. (позначено стрілкою на рисунку 2).

Лінія HA-R5 відрізняється від HA-R4 та QHP-1 відсутністю алеля 297 п. н. Алель 295 п. н. присутній лише у нестійких до НБР ліній HA-228 та 108-А. У локусі *ORS965–1* визначено два алелі. Алель 300 п. н. виявлено

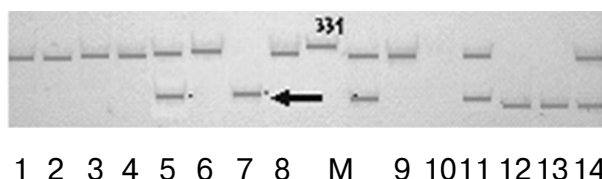


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній-диференціаторів за мікросателітним локусом *ORS1008*: 1 — RHA-265, 2 — RHA-274, 3 — DM-2, 4 — PM-13, 5 — PM-17, 6 — 803-I, 7 — HA-R4, 8 — HA-R5, 9 — QHP-1, 10 — HA-335, 11 — RHA-419, 12 — HA-228, 13—108A, 14 — OC1029B. M — маркер молекулярної маси ДНК pUC19 / MspI (фрагмент 331 п. н.)

у HA-R4 і QHP-1, алель 310 п. н. — у всіх інших досліджених ліній. При залученні ліній HA-R4 і QHP-1 у селекційні схеми виведення стійких форм характерні для них алелі локусів *ORS1008* та *ORS965–1* можуть слугувати маркерами при ідентифікації зразків з генетичним матеріалом ліній-донорів гена стійкості *PI13*.

Використання виявлених маркерів певних генів *PI*, а також алелів, характерних для генотипів конкретних ліній-донорів стійкості, дозволить шляхом маркерної селекції прискорити цільовий добір зразків у процесі створення стійких до НБР ліній і гібридів соняшнику.

**Маркери гена *AHAS1* для використання в селекції соняшнику на стійкість до гербіцидів.** Ідентифіковані маркерні алелі гена *AHAS1* у генотипів соняшнику, які використовуються в селекції на стійкість до гербіцидів імідазолінової та сульфонілмочевинної груп.

Таблиця 2

Генотипи досліджених ліній за алелями (п. н.) локусів *pAHAS 16–17* та *pAHAS 18–19*

Лінії	<i>pAHAS 16–17</i>	<i>pAHAS 18–19</i>
HA 425, RHA 426, RHA 427, HA 442, RHA 443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3, OC1011, OC1013	176	313
Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4	184	320
SURES-1	191	328

За алелями локусів *pAHAS 18–19* та *pAHAS 16–17* досліджені лінії розподілені на три групи. До першої групи увійшли HA-425, RHA-426, RHA-427, HA-442, RHA-443, IMISUN-1, IMISUN-2, IMISUN-3 та лінії української селекції OC1011 і OC1013, другу групу склали лінії Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4. Лінія SURES-1 за алелями досліджених локусів відокремлена від усіх інших генотипів (табл. 2).

Ідентифікація певних мікросателітних алелів для груп ліній, які залучаються селекціонерами СГІ–НЦНС до створення нових генотипів соняшнику зі стійкістю до страхових гербіцидів, дозволить проводити маркерний добір зразків з гібридних та бекросних популяцій, в яких донорами стійкості слугуватимуть лінії Sumo-1, Sumo-2, IMISUN-4 та SURES-1.

**Висновки.** Молекулярно-генетичні дослідження дозволили розробити ДНК-технології тестування поліморфізму та генетичної спорідненості, ідентифікації генотипів, оцінки генетичної чистоти інбредних ліній та рівня гібридності простих гібридів, маркування генів стійкості до вовчка *Or3*, генів стійкості до несправжньої борошністої роси  $PI_{ARG}$ , *PI13*, алелів мутантного гена *AHAS1*, що надає стійкості до гербіцидів.

Для підвищення ефективності селекції соняшнику та конкурентоспроможності українських гібридів пріоритетними напрямками роботи на наступні роки є маркування генів стійкості до нових рас вовчка, генів, що контролюють синтез олеїнової кислоти, локусів кількісних ознак урожайності та вмісту олії.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях // Научно-методическое руководство / под ред. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграрна наука, 1998. — С. 9.
2. Jovic S. Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower / S. Jovic, D. Miladinovic, I. Imerovski [et al.] // *Helia*. — 2012. — 35, N 56. — P. 61–72.
3. Duggleby R. G. Acetohydroxyacid synthase / R. G. Duggleby, S. S. Pang // *J. Biochem. Mol. Biol.* — 2000. — V. 33. — P. 1–36.
4. Al-Khatib K. Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidasolinone herbicides / K. Al-Khatib, J. F. Miller // *Crop. Sci.* — 2000. — V. 40. — P. 869–870.
5. Miller J. F. Two express resistant sunflower genetic stocks / J. F. Miller, K. Al-Khatib // *Crop. Sci.* — 2004. — V. 44. — P. 1037.
6. Sala C. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidasolinone resistance in sunflower / C. Sala, M. Bulos, M. Echarte // *Theor. Appl. Genet.* — 2008. — V. 118. — P. 105–112.
7. Kolkman J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidasolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower / J. Kolkman, M. Slabaugh, J. Bruniard [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — V. 109. — P. 1147–1159.
8. Солоденко А. Система ДНК маркерів для використання в селекції та насінництві соняшника / А. Солоденко, А. Трояновська, Ю. Сиволап // *Геном рослин : збірник наукових статей*. — Одеса, 2008. — С. 121–124.
9. Солоденко А. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров / А. Солоденко, А. Саналатий, Ю. Сиволап // *Цитология и генетика*. — Т. 40, № 4. — 2006. — С. 37–43.
10. Sivolap, Yu. Inter- and intraspecies differentiation in the genus *Helianthus* by RAPD analysis / Yu. Sivolap, A. Solodenko // *Helia*. — 1998. — № 21. — P. 9–18.
11. Сиволап Ю. М. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus*) / Ю. М. Сиволап, А. Е. Солоденко, В. В. Бурлов // *Генетика*. — 1998. — № 2. — С. 37–43.
12. Сиволап Ю. Исследование молекулярно-генетического разнообразия инбредных линий и уровня гетерозиса у гибридов / Ю. Сиволап, А. Солоденко, В. Бурлов // *Цитология и генетика*. — 1998. — № 6. — С. 6–12.
13. Solodenko A. Genotyping of *Helianthus* based on microsatellite sequences / A. Solodenko, Yu. Sivolap // *Helia*. — V. 28, № 42. — 2005. — P. 19–26.

14. Солоденко А. Є. Мікросателітні маркери в дослідженні генетичного різноманіття ліній та гібридів соняшника / А. Є. Солоденко // Вісник Одеського національного університету. — Т. 16 (вип. 6. Біологія.). — 2011. — С. 42–48.
15. Саналатий А. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров / А. Саналатий, А. Солоденко, Ю. Сиволап // Цитология и генетика. — 2006. — Т. 40, № 4. — С. 37–43.
16. Деклараційний патент на винахід № 63265А. Спосіб встановлення типовості та рівня гібридності генотипів соняшника ; отримано 15.01.2004. — Бюл. № 1.
17. Сиволап Ю. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшника за допомогою аналізу мікросателітних локусів / Ю. Сиволап, В. Волкодав, М. Бальвінська [та ін.] // Методичні рекомендації. Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2004. — 14 с.
18. Деклараційний патент на винахід № 68813А. Спосіб ідентифікації генотипів соняшника ; отримано 16.08.2004. — Бюл. № 8.
19. Солоденко А. Е. Оценка генетических различий между сублиниями-закрепителями стерильности подсолнечника / А. Е. Солоденко, В. А. Весёлый, В. В. Кириченко, Ю. М. Сиволап // VI Intern. Conf. «Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety (Plant genome VI)» (September, 7–10, 2010, Odessa, Ukraine). — Odessa, 2010. — P. 57.
20. Ведмедева К. В. Генетична відстань між лініями-аналогами соняшника / К. В. Ведмедева, А. Е. Солоденко, В. В. Толмачов // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. — 2010. — № 10. — С. 11–17.
21. Солоденко А. Е. Маркирование гена устойчивости к заразихе Or3 у подсолнечника / А. Е. Солоденко, А. В. Саналатий, В. В. Толмачев [и др.] // Цитология и генетика. — 2005. — Т. 39, № 5. — С. 9–12.
22. Солоденко А. Ідентифікація стійких до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.) генотипів соняшника / А. Солоденко, А. Трояновська, Ю. Сиволап // Методичні рекомендації. Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2007. — 7 с.
23. Солоденко А. Є. Оцінка стійкості соняшнику до вовчка раси С за допомогою молекулярних маркерів / А. Є. Солоденко // Вісник Харківського національного аграрного університету. — 2011. — Вип. 3 (24). — С. 61–66.
24. Солоденко А. Є. Мікросателітні маркери генів стійкості соняшнику до несправжньої борошністої роси / А. Є. Солоденко, Ю. М. Сиволап // Вісник Одеського національного університету. (Серія : Біологія). — 2014. — Т. 19, вип. 1 (34). — С. 46–54.
25. Development of co-dominant amplified polymorphic sequence markers for resistance of sunflower to downy mildew race 730 / D. Pancovic, N. Radovanovic, S. Jovic [et al.] // Plant Breeding. — 2007. — 126. — P. 440–444.
26. Солоденко А. Є. Расовий склад несправжньої борошністої роси та стійкість ліній соняшнику / А. Є. Солоденко, Б. Ф. Вареник, О. Є. Александрова, Ю. М. Сиволап // Збірник наукових праць СГІ–НЦНС. — Одеса, 2013. — Вип. 22 (62). — С. 117–123.
27. Солоденко А. Є. Маркери гена стійкості соняшнику до несправжньої борошністої роси / А. Є. Солоденко, В. В. Бурлов, Ю. М. Сиволап // Вісник



Харківського національного аграрного університету. (Серія Біологія). — 2014. — Вип. 3 (33). — С. 59–65.

28. Mulpuri S. Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, *P113* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) / S. Mulpuri, Z. Liu, J. Femg // Theor. Appl. Genet. — 2009. — V. 119. — P. 795–803.

Надійшла 25.05.2015.

UDC 575.11.113:854.78

**SOLODENCO A. Ye., VARENYK B. F., BURLOV V. V., VEDMEDEVA K. V.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **DNA MARKERS FOR USING IN SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) GENETIC AND BREEDING**

Polymorphism of sunflower genotypes of Ukrainian and foreign breeding were investigated with using of different types of molecular markers. Approaches for differentiation and classification of breeding material, identification of resistance genes to broomrape and downy mildew, to AHAS-inhibiting herbicides were proposed. The possibility of using the developed DNA markers in genetics and breeding programs are discussed.

УДК 575.11.113:854.78

**Солоденко А. Е., Вареник Б. Ф., Бурлов В. В., Ведмедева Е. В.**

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ПРОГРАММАХ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*Helianthus annuus* L.)**

Полиморфизм генотипов подсолнечника украинской и зарубежной селекции исследован с использованием разных типов молекулярных маркеров. Предложены методические подходы для классификации и дифференциации разнообразного исходного материала, идентификации определенных генов устойчивости подсолнечника к заразице, ложной мучнистой росе, к AHAS-ингибирующим гербицидам. Обсуждается возможность применения предложенных ДНК-маркеров в генетико-селекционных программах.

УДК 633.34:575.162

Н. Е. ВОЛКОВА<sup>1</sup>, д. б. н., с. н. с., гол. наук. співроб.,

О. Ф. БРИК<sup>1,2</sup>, к. б. н., наук. співроб.,

А. М. ВЕНГЕР<sup>1</sup>, мол. наук. співроб.

<sup>1</sup>СГІ–НЦНС, Одеса

<sup>1,2</sup>The Institute for Prevention and Occupational Medicine of the German Social Accident Insurance

natavolki@ukr.net

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ СОРТІВ СОЇ КУЛЬТУРНОЇ (*Glycine max* (L.) Merr) ТА АНАЛІЗ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ СУБОДИНИЦІ ГЛІЦИНІНУ

*Досліджено поліморфізм різних регіонів ядерного геному сої культурної за молекулярними маркерами для диференціації, ідентифікації та паспортизації сортів. Проведено кластерний аналіз сортів сої різного еколого-географічного походження. Визначено алельний склад генів, що кодують субодиниці гліциніну, сортів та зразків світової, в т. ч. української селекції.*

Ключові слова: соя культурна, геном, молекулярні маркери, паспортизація, запасні білки, гліцинін.

**Вступ.** Соя культурна (*Glycine max* (L.) Merr) — важлива сільсько-господарська рослина, яка широко використовується в продовольчому, кормовому та технічному напрямках і має велике агротехнічне значення як азотфіксуюча культура [1]. Вона є однією з найбільш вивчених у генетичному відношенні рослиною. Оприлюднені в 2010 р. результати секвенування геному *G. max* [2] та ресеквенування геному *G. soja* [3] відкрили нові можливості функціонально характеризувати анотовані гени. Системний підхід (геноміка, транскриптоміка, протеоміка, метаболоміка, біоінформатика) до характеристики цих генів дозволяє визначити процеси, що контролюють такі складні ознаки, як врожайність, вміст олії, склад білка, відповіді на абіотичні й біотичні стреси та ін. [4, 5]. Для збереження та аналізу інформації з «оміків» сої є електронний ресурс «SoyBase and the Soybean Breeder's Toolbox» (<http://soybase.org/>).

У дослідженнях геному сої нині широко використовують різні типи молекулярних маркерів, які розроблено на основі поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), довжини ампліфікованих послідовностей ДНК (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), повторів простих послідовностей (Simple Sequence Repeats, SSR), міжмікросателітного поліморфізму (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR), однонуклеотидного поліморфізму (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) та ін. Уперше в Україні молекулярно-генетичні до-

слідження поліморфізму сої культурної з застосуванням молекулярних маркерів проведено в СГІ–НЦНС [6–8].

Прикладом впровадження молекулярних маркерів у такому важливому напрямі селекції сої, як поліпшення якості зерна (високий вміст білка, оптимізація його складу, низький вміст антипоживних речовин, покращені смакові властивості, певні технологічні показники), є ідентифікація генів, що кодують запасні білки, та створення системи генспецифічних маркерів. Один з двох основних запасних білків насіння сої — гліцинін (11S глобулін) є гексамером з шести субодиниць, розподілених на групи: група I (G1, G2, G3 або  $A_{1a}B_2$ ,  $A_2B_{1a}$ ,  $A_{1b}B_{1b}$ ), що кодується генами *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*; група IIa (G4 або  $A_5A_4B_3$ ), що кодується геном *Gy4*; група IIb (G5 або  $A_3B_4$ ), що кодується геном *Gy5*. Ідентифіковано та картовано два додаткових гліцинінових гени, а саме псевдоген *gy6* і функціональний ген *Gy7*, який кодує шосту субодиницю гліцинину G7. Для кожної субодиниці існує понад 84 % гомології в межах групи і 45–49 % між групами [9, 10].

**Мета** роботи: дослідження різних регіонів ядерного геному сої культурної за молекулярними маркерами для ідентифікації сортів та визначення генів, що кодують запасні білки насіння.

**Матеріал і методи.** Для дослідження генетичного різноманіття використовували 150 селекційних форм і сортів сої культурної, з яких 32 сорти з різних еколого-географічних зон: американського походження — Провар, Анока, Капітал, Магна, Амсой, А-100, Блекхок, Ада; далекосхідного походження — Грибовська місцева, Амурська 42, Амурська 111, Амурська 57, Амурська 51, Амурська 321, Амурська 154, Амурська 347; китайського походження — К 2601, Харбінська, К 2441, Ларедо, К 766, К 2408, Тзи-ті 4, К 2406; європейського походження — Ронест 104, Маусерова біла, Ронест 1, Дунайка, К 3–382, KZ-26, TSZ 14, Попельсдорфер (насіння люб'язно надано відділом селекції, генетики та насінництва бобових культур СГІ–НЦНС). Для визначення аельного стану генів, що кодують запасні білки насіння, досліджували сорти сої культурної Сяйво, Одеська 150, Донька, Аркадія, Форватер, ВІР5048, Медея, Дельта, Валюта, зразки  $F_6$ -гібридів Медея х ВІР 5048 та Дельта х Валюта, насіння яких люб'язно надано відділом селекції, генетики та насінництва бобових культур СГІ–НЦНС, а також сорти Williams 82, Lai wa dou, Harovinton, насіння яких отримано з National Plant Germplasm System (США).

Екстракція ДНК з проростків, постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез в агарозних і поліакриламідних гелях здійснювали за загальноприйнятими методиками. В ПЛР використовували дев'ять довільних та сім ISSR-праймерів, вісім пар праймерів до мікросателітних локусів, шість пар праймерів до генів *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4*, *Gy5* [11, 12].

Кластерний аналіз даних молекулярно-генетичного аналізу проводили за програмою TREES 4.0 (у вільному доступі) незваженим парногру-

повим методом з арифметичним усередненням (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA).

**Результати.** Дослідження внутривидового поліморфізму сої культурної. Для вивчення генетичної спорідненості 150 селекційних форм сої досліджено «анонімні» регіони геному за допомогою ПЛР з довільними праймерами та подальшого кластерного аналізу. Генотипи розподілено на групи за рівнем генетичної спорідненості. У більшості випадків розподіл відповідав даним родоводів. Дібрані пари генотипів з найбільшими і найменшими генетичними дистанціями для залучення в селекційні програми.

При дослідженні 32 сортів сої різного еколого-географічного походження за різними регіонами геному («анонімні» регіони, ділянки між простими повторами, мікросателітні локуси) розподіл на дендрограмі співпадав з даними щодо їхнього походження.

*Ідентифікація генотипів сої.* Застосуванням ПЛР-аналізу восьми мікросателітних локусів досліджено 32 сорти сої, першим етапом якого стала перевірка на генетичну чистоту. В подальшому вивченні використовували генотипи, гомозиготні за всіма локусами. Виявлено 25 продуктів ампліфікації, що дозволило диференціювати всі досліджені сорти.

При дослідженні SSR-локусу SOYHSP176 (Low MW Heat shock protein gene) у сортів з Китаю, Європи і Далекого Сходу виявлено алель розміром 109 п. н., у сорту американського походження виявляли також алель розміром 119 п. н. Для локусу SOYHSP179 (Heat shock protein gene, Gmhsp17.9-D) характерні два алеля — 92 і 212 п. н., причому останній спостерігали тільки у сортів китайської та європейської селекції. Розподіл алелів локусу SOYSC514 (Lipoxygenase gene) був таким: далекосхідні сорти мали тільки алель розміром 187 п. н., а в сортів європейської селекції виявлено алель 209 п. н., що не зустрічається у інших сортів сої. Для найваріабельнішого у даній вибірці сортів сої локусу SAT 1 детектовано п'ять алелів: 221, 241, 255, 267, 273 п. н. Алель довжиною 273 п. н. зустрічається тільки у далекосхідних сортів, крім того, у сортів цього походження не виявлено алель 241 п. н., який характерний для китайських сортів сої. У сортів американської і європейської селекції детектовано алель розміром 267 п. н., проте в американських сортів, крім цього, зустрічається алель 255 п. н., а в європейських — 241 п. н. У китайських і далекосхідних сортів за локусом SATT 1 характерний один тип алеля: 147 п. н. (тільки один китайський сорт мав алель 117 п. н.), тоді як сорти з Європи мають усі три типи алелів даного локусу (117, 147, 155 п. н.). Розподіл алелів SSR-локусів у генотипів різних еколого-географічних зон дозволив припустити можливе адаптаційне значення окремих алелів.

Розроблено принцип диференціації, ідентифікації та паспортизації генотипів сої. Відображення специфічності генотипу можливо проводити у вигляді літеро-числової генетичної формули, в якій фіксуються досліджений локус / ген та розмір алелів (у п. н.), характерних для даного

генотипу. За даними аналізу поліморфізму восьми мікросателітних локусів складено формули генотипів.

*ДНК-типування зразків сої за Gy-генами.* Маркери генів *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy5* є доміант-рецесивними (наявність / відсутність фрагментів ампліфікації розмірами 801, 1211, 1037 та 864 п. н. відповідно) [12]. Відсутність ген-специфічної ампліфікації показує, що інделі або варіації послідовностей цих генів призводять до відсутності певних субодиниць.

Для тестування гена *Gy4* можливо використовувати дві системи. 1) З використанням біфазної трьохпраймерної техніки ПЛР (Temperature-Switch Polymerase Chain Reaction, TS-PCR) можливо детектувати нормальний та мутантний  $A_4$ -алель (фрагменти ампліфікації 504 та 266 п. н.) [12]. 2) Класична ПЛР з трьома парами праймерів — локус-специфічні (продукт ампліфікації 307 п. н.) та алеле-специфічні (продукти ампліфікації розмірами 771 п. н. для мутантного та 324 п. н. для нормального алелів). Дані маркери кодомінантні (наявність фрагментів певної довжини) [11].

Сорти Harovinton, Lai wa dou та Williams 82 використано як позитивні контролю певного стану *Gy*-генів. Для Williams 82 характерний «дикий» алель гена *Gy4*, для Lai wa dou — мутантний алель гена *Gy4*, для Harovinton — повний комплект субодиниць гліциніна.

За результатами ПЛР-аналізу для сорту Harovinton виявлено продукти ампліфікації очікуваних розмірів: *Gy1*–801 п. н., *Gy2*–1211 п. н., *Gy3*–1037 п. н., *Gy4*–307 п. н., *Gy5*–864 п. н. [12]. Для сорту Williams 82 виявлено наявність продукту ампліфікації регіонів гена *Gy4* очікуваного розміру 324 п. н., характерного для «дикого» алеля, та відсутність продукту ампліфікації 771 п. н. Для сорту Lai wa dou виявлений продукт ампліфікації регіонів гена *Gy4* очікуваного розміру 771 п. н., характерний для мутантного алеля; продукт розміром 324 п. н. був відсутній [11].

Оскільки для сортів Harovinton, Lai wa dou та Williams 82, які використано як позитивні контролю певного стану *Gy*-генів, отримано очікувані результати, проведено ДНК-типування зразків сої за геном *Gy4*. У всіх сортів та гібридних зразків встановлено відсутній фрагмент ампліфікації розміром 771 п. н. Наявність 324 п. н.-фрагменту виявлено у сортів Сяйво, Одеська 150, Донька, Аркадія, Форватер, VIP 5048, Медея, Дельта, Валюта та у зразків  $F_6$  Дельта х Валюта та Медея х VIP5048. Отже, для сортів сої, які використовуються в СГП–НЦНС, характерний «дикий» алель гена *Gy4*.

Фрагмент ампліфікації гена *Gy4* розміром 324 п. н. — асоційований з наявністю, а фрагмент 771 п. н. свідчить про відсутність  $A_4$ -пептиду субодиниці групи IIa. Саме насіння сортів сої без  $A_4$ -пептиду придатне для виготовлення гіпоалергенних харчових продуктів.

Поєднання добору за допомогою маркерів з підходами традиційної селекції значно підвищить ефективність та результативність селекційних програм з поліпшення якості зерна сої.

**Висновки.** Групування сортів та зразків сої культурної за даними молекулярно-генетичних та кластерних аналізів відповідає їхнім родоводам та еколого-географічному походженню. Розроблено принцип реєстрації генотипу сої за ДНК-типунням мікросателітних локусів. Аналізом поліморфізму гена *Gy4*, який кодує G4 ( $A_4A_5B_3$ ) субодиницю гліциніна, виявлено присутність алеля «дикого» типу у сортах і зразках сої СГІ–НЦНС.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Soybean. Molecular aspects of breeding / Edit. A. Sudaric // InTech Europe, Croatia, 2011. — 514 p.
2. Schmutz J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean / J. Schmutz, S. Cannon, J. Schlueter [et al.] / J. Schmutz // Nature. — 2010. — Vol. 463. — P. 178–183.
3. Kim M. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome / M. Kim, S. Lee., K. Van [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107 (51). — P. 22032–22037.
4. Guo Y. Soybean Omics and Biotechnology in China / Y. Guo, X. Wang, W. He [et al.] // Plant Omics J. — 2011. — Vol. 4 (6). — P. 318–328.
5. Qiu L. A platform for soybean molecular breeding: the utilization of core collections for food security / L. Qiu, L. Xing, Y. Guo [et al.] // Plant Mol. Biol. — 2013. — Vol. 83. — P. 41–50.
6. Сиволап Ю. М. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сои (*Glycine max* L.) с помощью ПЦР-анализа / Ю. М. Сиволап, А. Ф. Брик, В. И. Сичкарь // Цитология и генетика. — 1998. — Т. 32, № 4. — С. 89–96.
7. Брик А. Ф. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация сортов сои / А. Ф. Брик, Ю. М. Сиволап // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 9. — С. 1265–1273.
8. Брик А. Ф. Молекулярно-генетический полиморфизм сои детектированный ПП-ПЦР, SSRP и ISSR / А. Ф. Брик, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2001. — Т. 35, № 5. — С. 3–10.
9. Beilinson V. Genomic organization of glycinin genes in soybean / V. Beilinson, Z. Chen, R. Shoemaker [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 2002. — Vol. 104. — P. 1132–1140.
10. Li C. Molecular evolution of glycinin and b-conglycinin gene families in soybean (*Glycine max* L. Merr.) / C. Li, Y. Zhang // Heredity. — 2011. — Vol. 106. — P. 633–641.
11. Rayhan M. Identification of *Gy4* nulls and development of multiplex PCR-based co-dominant marker for *Gy4* and  $\alpha'$  subunit of  $\beta$ -conglycinin in soybean / M. Rayhan, K. Van, D. Kim [et al.] // Gen. Genom. — 2011. — Vol. 33. — P. 383–390.
12. Jegadeesan S. Molecular analysis of glycinin genes in soybean mutants for development of gene-specific markers / S. Jegadeesan, K. Yu, L. Woodrow [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 2012. — Vol. 124. — P. 365–372.

Надійшла 06.04.2015.

UDC 633.34:575.162

**Volkova N. E., Brik O. F., Venger A. M.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**IDENTIFICATION OF SOYBEAN VARIETIES (*Glycine max* (L.) Merr) AND ANALYSIS OF GENES ENCODING SUBUNIT GLYCININS**

Soybean genome's different regions investigations by three types of molecular markers allowed to cluster the samples according to their pedigrees and eco-geographical origin. The principle of soybean genotypes registration based on the results of microsatellite loci DNA typing was developed. Polymorphism of gene *Gy4*, encoding G4 (A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>B<sub>3</sub>) glycinin subunit, was analyzed and established the presence of allele «wild» type varieties and soybean samples.

УДК 633.34:575.162

**Волкова Н. Э., Брик А. Ф., Венгер А. Н.**

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СОИ КУЛЬТУРНОЙ (*Glycine max* (L.) Merr) И АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЛИЦИНИНА**

Исследование различных участков генома сои с помощью трех типов молекулярных маркеров позволило кластеризовать образцы соответственно их родословных и эколого-географическому происхождению. Разработан принцип регистрации генотипа сои по результатам ДНК-типирования микросателлитных локусов. Исследован полиморфизм гена *Gy4*, кодирующего G4 (A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>B<sub>3</sub>) субъединицу глицинина, и установлено наличие аллеля «дикого» типа в сортах и образцах сои СГІ–НЦНС.

УДК 577.2:581.2:632.938.1: 633.181

О. В. ГАЛАЄВ<sup>1</sup>, к. б. н., пров. наук. співроб.,  
М. В. ГАЛАЄВА<sup>1</sup>, к. б. н., мол. наук. співроб.,  
Д. В. ШПАК<sup>2</sup>, к. с.-г. н., зав. від.

<sup>1</sup>СГІ–НЦНС, Одеса

e-mail: galaev7@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут рису

e-mail: shpak\_dmitry@mail.ru

## ВИЯВЛЕННЯ РАСОСПЕЦИФІЧНИХ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ПІРИКУЛЯРІОЗУ *PI-ta* ТА *PI-b* У СОРТІВ РИСУ (*Oryza sativa* L.)

*Кодомінантні внутрігенні молекулярно-генетичні маркери використані для детекції алельного стану расоспецифічних генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* у 103 сортів і ліній рису різного географічного походження з Національної колекції Інституту рису НААН України. Виявлено генотипи–носії домінуючих алелів генів *Pi-ta* та *Pi-b*, які забезпечують стійкість рису до пірикуляріозу.*

Ключові слова: *рис, пірикуляріоз, гени стійкості *Pi-ta* і *Pi-b*, молекулярні маркери.*

**Вступ.** З усіх грибкових захворювань найбільш шкідливою і найпоширенішою хворобою рису в умовах Півдня України є пірикуляріоз, збудником якого є недосконалий гриб *Pyricularia oryzae* Cav (син. *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr), що відноситься до класу *Deuteromycetes*. Патологічні симптоми хвороби на рослинах рису починають виявлятися з фази проростання до фази молочно-воскової стиглості рослин [1]. Ефективна та екологічно безпечна стратегія боротьби з даним захворюванням — створення генетично стійких сортів. У селекції стійких до пірикуляріозу сортів рису перед селекціонером стоїть ряд проблем: вибір донора стійкості, оцінка стійкості та добір стійких генотипів у гібридних популяціях.

Гени вертикальної стійкості можуть бути виявлені за допомогою аналізу реакції з відомими генами авірулентності сорту на інокуляцію моноізолятами *P. oryzae*. Але такий класичний фітопатологічний тест досить довготривалий і потребує значних матеріальних витрат. Також важливим лімітуючим чинником є нестабільність генів авірулентності збудника пірикуляріозу і перекривання спектра расоспецифічної стійкості. Отже, найефективнішим методом ідентифікації генів стійкості до пірикуляріозу є використання молекулярних маркерів внутрігенних або щільно зчеплених з цільовим геном.

В Україні дослідження з ідентифікації генів стійкості до пірикуляріозу в сортах рису не проводились. За багаторічними даними фітопатоло-



гів, для зони вирощування рису в Краснодарському краї Росії та України ефективними є гени расоспецифічної стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* [2]. Гени расоспецифічної стійкості *Pi-ta*, *Pi-b* у рису секвеновано. Ген *Pi-ta* розташований в області центромери 12 хромосоми; ген *Pi-b* — на довгому плечі хромосоми 2 [3].

**Мета** нашого дослідження полягала в ідентифікації алелів расоспецифічних генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* у сортів рису української селекції та в наборі сортів і ліній різного географічного походження з Національної колекції Інституту рису.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для досліджень слугували 73 сорти і лінії різного географічного походження та 30 сортів і ліній рису української селекції з Національної колекції Інституту рису. Позитивним контролем були сорти-носії генів *Pi-ta* (Katy, Madison) та *Pi-b* (Brazos, Katy, Labelle, Madison), надані National Plant Germplasm System (США).

ДНК виділяли з 5-денних проростків за допомогою СТАВ-буферу [4]. Досліджували ДНК п'яти індивідуальних рослин кожного сорту, лінії чи гібриду. Для виявлення алелів генів *Pi-ta* та *Pi-b* використано домінантні внутрігенні STS-маркери [5, 6]. Дві пари STS-маркерів *Pi-ta.F/Pi-ta.R* та *pi-ta.F/pi-ta.R* виявляють два алеля: домінантному алелю *Pi-ta*, який забезпечує стійкість до пірикуляріозу, відповідає продукт ампліфікації розміром 270 п. н.; рецесивному алелю *pi-ta* — продукт 563 п. н. Дві пари STS-маркерів *Pi-b.F/Pi-b.R* та *pi-b.F/pi-b.R* виявляють два алеля: домінантному алелю *Pi-b*, що зумовлює стійкість, відповідає фрагмент 490 п. н., а рецесивному алелю *pi-b* — 200 п. н.

ПЛР зі спрямованими праймерами проводили на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила буфер (67 мМ трис-НСІ рН 8,8; 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,03 % Tween-20); 0,2 мМ кожного dNTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 0,8 од. Taq-полімерази. Умови реакції для пар STS-маркерів згідно Дубініна та ін. [5]. Продукти ампліфікації (15 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 1,5 %-му агарозному гелі у 1xTBE буфері. Електрофорез в агарозному гелі проводили при постійній напрузі 150 V в апараті для горизонтального гель-електрофорезу (S-2N, «Helicon», Росія). Фрагменти ДНК у гелі забарвлювали бромистим етидієм. Калібрували молекулярну масу отриманих ампліконів з використанням стандарту pUC 19/Mspl.

Статистична обробка результатів — за загальноприйнятими методиками [7].

**Результати та обговорення.** На першому етапі роботи для усунення хибно негативних та позитивних результатів проводили ПЛР-аналіз контрольних сортів, що є носіями генів *Pi-ta* та *Pi-b*, з застосуванням вищезазначених STS-маркерів. Доведено, що сорти Katy, Madison є носіями домінантних алелів генів *Pi-ta* та *Pi-b*, а сорти Brazos, Labelle — домінантного алеля *Pi-b* (табл. 1). Результати ПЛР-аналізу сортів з парами праймерів, що виявляють алельний стан гена *Pi-ta* та *Pi-b*, показано на рисунку 1.

Таблиця 1

Генотипи контрольних сортів за алелями генів стійкості до пірикуляріозу рису *Pi-ta* та *Pi-b*

Генотип	Сорт	STS-маркери			
		<i>Pi-ta</i>	<i>pi-ta</i>	<i>Pi-b</i>	<i>pi-b</i>
		270п. н.	563 п. н.	490 п. н.	200 п. н.
<i>Pi-ta</i> , <i>Pi-b</i>	Katy	+	–	+	–
<i>Pi-ta</i> , <i>Pi-b</i>	Madison	+	–	+	–
<i>Pi-b</i>	Brazos	–	+	+	–
<i>Pi-b</i>	Labelle	–	+	+	–

Примітка: «+» — присутність алеля, «–» — відсутність алеля.

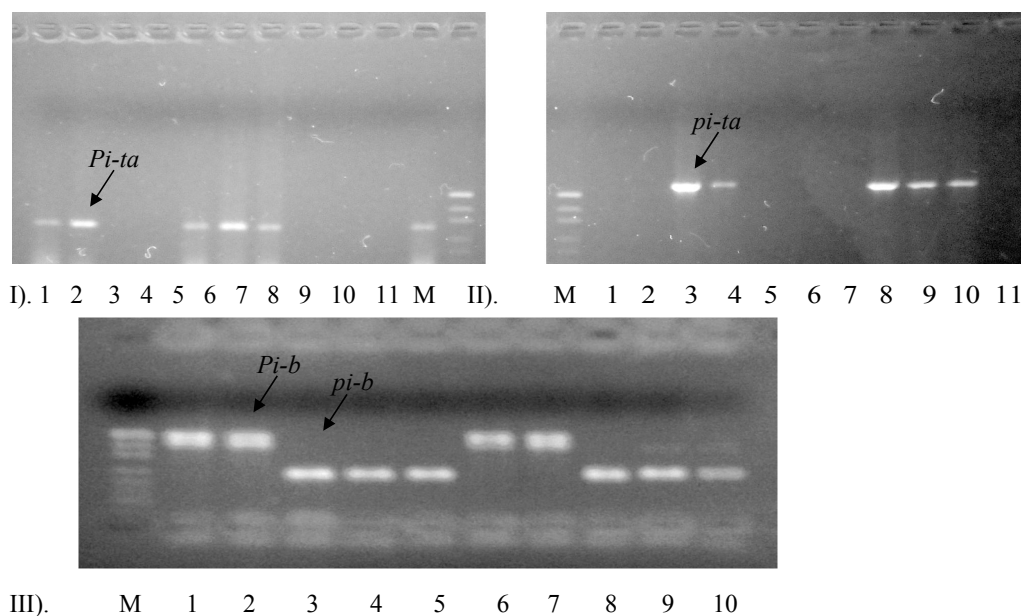


Рис. 1. Результати ПЛР-аналізу з парами праймерів, що виявляють алелі *Pi-ta* (I), *pi-ta* (II), *Pi-b* та *pi-b* (III) в 1,5 %-му агарозному гелі: М — рUC19 DNA/*Msp*I; I, II): 1 — Katy, 2 — Madison, 3 — Brazos, 4 — Labelle, 5 — Онтаріо, 6 — Пам'яті Гічкіна, 7 — Преміум, 8 — Еней, 9 — IRBL-21, 10–97-В, 11 — Престиж; III): 1 — Katy, 2 — Madison, 3 — Онтаріо, 4 — Пам'яті Гічкіна, 5 — Преміум, 6 — Brazos, 7 — Labelle, 8 — Престиж, 9 — Серпневий, 10 — Україна — 96

На другому етапі роботи за алелями генів *Pi-ta* та *Pi-b* досліджували 16 сортів і 14 ліній Інституту рису НААНУ. Результати наведено у таблиці 2. Серед сортів та ліній рису української селекції досить часто виявлявся домінуючий алель гена *Pi-ta*, який зумовлює стійкість до пірикуляріозу. З досліджених нами сортів та ліній 40 % характеризувались генотипом з домінуючим алелем *Pi-ta*, 53 % — генотипом з рецесивним алелем *pi-ta*, а 7 % були неоднорідними та склались з обох зазначених генотипів. Сорти Агат, Антей, Віконт, Дебют, Онтаріо, Пам'яті Гічкіна, Преміум, Престиж, Серпневий,

Україна — 96, Янтарний та лінія УІР 3470 є носіями домінантного алеля *Pi-ta*. Зазначені сорти можна використовувати як джерела гена стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta*. Слід зазначити, що всі сорти Інституту рису, що входять до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, мають генотип з домінантним алелем гена *Pi-ta*. Проте серед сортів української селекції не виявлено жодного сорту з домінантним алелем гена *Pi-b*.

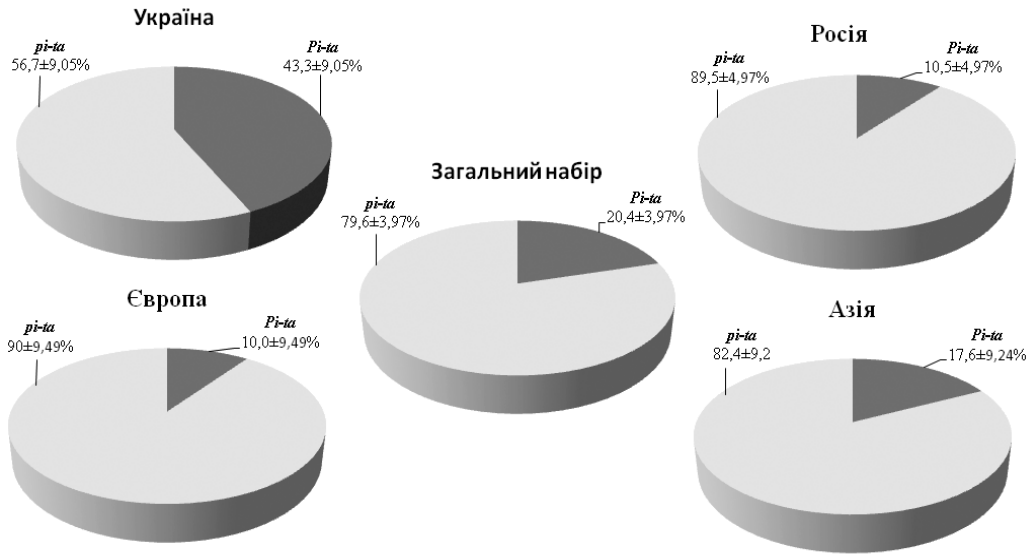
Таблиця 2

Генотипи сортів та ліній селекції Інституту рису НААНУ за алелями генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b*

Сорт, лінія	Рік створення	Алель				Сорт, лінія	Рік створення	Алель			
		<i>Pi-ta</i>	<i>pi-ta</i>	<i>Pi-b</i>	<i>pi-b</i>			<i>Pi-ta</i>	<i>pi-ta</i>	<i>Pi-b</i>	<i>pi-b</i>
Агат	2004	+	-	-	+	Янтарний	2002	+	-	-	+
Антей	2002	+	-	-	+	КОП-161-92	1992	-	+	-	+
Віконт	2007	+	-	-	+	УкрНДС 5079	1993	-	+	-	+
Дебют	2009	+	-	-	+	УкрНДС 6955	1998	-	+	-	+
Дніпровський	1999	+	+	-	+	УІР 2184	2010	-	+	-	+
Еней	1992	-	+	-	+	УІР 2775	2010	+	+	-	+
Онтаріо	2008	+	-	-	+	УІР 3470	2009	+	-	-	+
Пам'яті Гічкіна	2002	+	-	-	+	УІР 3472	2009	-	+	-	+
Пережат	1986	-	+	-	+	УІР 3475	2009	-	+	-	+
Преміум	2006	+	-	-	+	УІР 3481	2010	-	+	-	+
Престиж	2005	+	-	-	+	УІР 3482	2010	-	+	-	+
Прибій	1994	-	+	-	+	УІР 3483	2010	-	+	-	+
Серпневий	2008	+	-	-	+	УІР 5814	2009	-	+	-	+
Україна — 96	1996	+	-	-	+	УІР 5815	2009	-	+	-	+
Червоний	2007	-	+	-	+	УІР 8458	2010	-	+	-	+

Примітка: «+» — присутність алеля, «-» — відсутність алеля.

На третьому етапі досліджували сорти і лінії рису різного географічного походження (Європа, Азія, Африка, Америка). В дослідженому наборі з 73 сортів і ліній було виявлено ще 11 сортів, що несуть домінантний алель гена *Pi-ta* (табл. 3). Проте 6 сортів були неоднорідними та склались з двох генотипів з домінантним та рецесивним алелем гена *Pi-ta* відповідно. Однорідні сорти та лінії Малиш, Мутант 4207-75, ПФ-4186 (Росія), Chise Bind (Японія) та Delfino (Туреччина) мали генотип з домінантним алелем гена *Pi-ta*, який забезпечує стійкість. Зазначені сорти також можна використовувати в селекції на стійкість до пірикуляріозу. Слід зазначити, що частота алеля *Pi-ta* у сортів і ліній рису України ( $43,3 \pm 9,05$ ) істотно перевищувала аналогічний показник в наборі сортів з Росії, а також інших країн Європи та Азії (рис. 2). У сортів рису з Африки та Америки не виявлено генотипів з домінантним алелем *Pi-ta*.

Рис. 2. Частоти алелів гена *Pi-ta*

Ген стійкості *Pi-ta* забезпечує середню (на рівні 5–7 балів) стійкість сортів рису до пірикуляріозу в умовах Півдня України. Тому для створення стійких сортів необхідно схрещувати сорти, які несуть домінуючий алель гена *Pi-ta*, з сортами, що мають інші гени стійкості до цієї хвороби, наприклад з сортами-носіями домінуючого алеля *Pi-b*, який також забезпечує стійкість до пірикуляріозу. Проте у сортів української селекції домінуючого алеля *Pi-b* не виявлено. Основна частина досліджених нами сортів та ліній рису різного географічного походження також характеризувалась генотипом з рецесивним алелем *pi-b*. Домінуючий алель гена *Pi-b* ідентифіковано лише у трьох сортів та ліній рису: ВНІР 546 (Росія), 97-В (Індія) та IRBL-21 (Філіппіни). Зазначені сорти можна використовувати в схрещуваннях для створення нових стійких до пірикуляріозу сортів.

Отже, з метою створення стійких генотипів ми можемо рекомендувати для пірамідуювання генів стійкості *Pi-ta* та *Pi-b* використовувати в схрещуваннях адаптовані до місцевих умов рисосіяння сорти української селекції Інституту рису, що несуть домінуючий алель гена *Pi-ta* (Агат, Антей, Віконт, Дебют, Онтаріо, Пам'яті Гічкана, Преміум, Престиж, Серпневий, Україна — 96, Янтарний), з сортами-носіями домінуючого алеля гена *Pi-b* (ВНІР 546, 97-В, IRBL-21, Brazos, Katy, Labelle, Madison). При цьому використання кодомінуючих молекулярно-генетичних маркерів дозволить істотно скоротити селекційну схему створення вихідного матеріалу рису з ефективними генами стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* і *Pi-b*.

З вищезазначеною метою в Інституті рису створено  $F_2$  популяції 97-В/Віконт, 97-В/Онтаріо, IRBL-21/Віконт, IRBL-21/Преміум, IRBL-21/Онтаріо, у яких однією з батьківських форм були носії домінуючого алеля

Таблиця 3

Генотипи сортів та ліній рису різного географічного походження за алелями генів стійкості до пірикуляріозу рису *Pi-ta* та *Pi-b*

№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів				№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів			
			Pi-ta	Pi-ta	Pi-b	Pi-b				Pi-ta	Pi-ta	Pi-b	Pi-b
1	97-B	Індія	-	+	+	-	38	Віола	Росія	-	+	-	+
2	A'bel	Угорщина	-	+	+	+	39	Віраж	Росія	-	-	-	+
3	Arborio	Італія	-	+	+	+	40	ВНІР 10157	Росія	-	+	-	+
4	Ariette	Італія	-	+	+	+	41	ВНІР 10163	Росія	-	+	-	+
5	China His 15	Бурунді	-	+	+	+	42	ВНІР 4631-88	Росія	-	+	-	+
6	Chise Bind	Японія	+	+	-	+	43	ВНІР 546	Росія	-	+	+	-
7	Csing Feng 2	Китай	+	+	-	+	44	ВНІР 6080	Росія	-	+	-	+
8	Delfino	Туреччина	+	+	-	+	45	ВНІР 8847	Росія	-	+	-	+
9	Dong 18	В'єтнам	-	+	-	+	46	ВНІР 989	Росія	-	+	-	+
10	Edime	Туреччина	-	+	-	+	47	ВНІР 99-88	Росія	-	+	-	+
11	Elida	Румунія	-	+	-	+	48	Волгоградський	Росія	-	+	-	+
12	Европі	Греція	-	+	-	+	49	Гарант	Росія	+	+	-	+
13	Gizza 177	Єгипет	-	+	-	+	50	Ізумруд	Росія	-	+	-	+
14	IR-532-1-218	Філіппіни	-	+	-	+	51	Карат	Росія	-	+	-	+
15	IRBL-21	Філіппіни	-	+	+	-	52	КП – 15	Росія	-	+	-	+
16	Karolina	Угорщина	-	+	-	+	53	КП-40-71	Росія	-	+	-	+
17	M-103	США	-	+	-	+	54	КПСУ-91	Росія	-	+	-	+
18	Madina	Казахстан	-	+	-	+	55	Краснодарський 424	Росія	-	+	-	+
19	Magic	Румунія	+	+	-	+	56	Кулон	Росія	-	+	-	+
20	Mega	Болгарія	-	+	-	+	57	Лінія 84-1-35-2	Росія	-	+	-	+
21	Merle	Франція	+	+	-	+	58	Малиш	Росія	+	-	-	+
22	Nato x Valilla gr. grosse x Кубань	Росія	-	+	-	+	59	Мутант 4207-75	Росія	+	-	-	+

Закінчення таблиці 3

№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів				№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів			
			P-1a	P-1b	P-1c	P-1d				P-1a	P-1b	P-1c	P-1d
23	Onda	США	-	+	-	+	60	Новатор	Росія	-	+	-	+
24	Osmanskі 97	Туреччина	-	+	-	+	61	ПФ — 4186	Росія	+	-	-	+
25	PI502967 OR04AR SD	США	-	+	-	+	62	Раздольний	Росія	-	+	-	+
26	PI592507 OR95TX SD	США	-	+	-	+	63	Світлий	Росія	-	+	-	+
27	PI593892 OR07AR SD	США	-	+	-	+	64	Северний	Росія	-	+	-	+
28	Pingxi 16	Китай	-	+	-	+	65	Серпантин	Росія	+	+	-	+
29	Roogva	Індія	-	+	-	+	66	Сніжинка	Росія	-	+	-	+
30	Puonyang 15	Північна Корея	-	+	-	+	67	Солярис × O. Perenis	Росія	-	+	-	+
31	Puonyang 21	Північна Корея	-	+	-	+	68	CP 44–35	Росія	-	+	-	+
32	Puonyang 7	Північна Корея	+	+	-	+	69	Філіппіни	Філіппіни	-	+	-	+
33	Sakha 101	Єгипет	-	+	-	+	70	Флагман	Росія	-	+	-	+
34	Saturn × ВНИР 6082	Росія	-	+	+	+	71	Хайдарабад	Індія	-	+	-	+
35	Strimomas	Греція	-	+	-	+	72	Южанін	Росія	-	+	-	+
36	Боярин	Росія	-	+	-	+	73	Южний	Росія	-	+	-	+
37	Вікторія	Росія	-	+	-	+							

Примітка: «+» — присутність алеля, «-» — відсутність алеля.

*Pi-ta* української селекції (Віконт, Онтаріо, Преміум), а іншою батьківською формою — носії домінантного алеля *Pi-b* (97-B та IRBL-21). Нині з застосуванням молекулярних маркерів з рослин F<sub>2</sub> популяцій проводиться добір генотипів, які поєднують домінантні алелі генів *Pi-ta* та *Pi-b* в гомозиготному стані, що значно скорочує селекційний процес.

**Висновки.** Ідентифіковано генотипи сортів і ліній рису різного географічного походження за алелями генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* з використанням кододомінантних внутрігенних молекулярних маркерів. Виявлено генотипи-носії домінантних алелів зазначених генів, які рекомендується залучати в селекційні програми для підвищення стійкості рису до пірикуляріозу.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вожегова Р. А. Теоретичні основи і результати селекції рису в Україні : монографія / Р. А. Вожегова. — Херсон, 2009. — 348 с.
2. Дьяков Ю. Т. Общая и молекулярная фитопатология : учеб. пособие / Ю. Т. Дьяков. — М. : Общество фитопатологов, 2001. — 302 с.
3. McCouch S. R. Mapping of blast resistance genes in rice / S. R. McCouch, R. G. Nelson, J. Tohme, R. S. Zeigler // Rice blast disease. — 1994. — V.1. — P. 167–186.
4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : науч.-метод. руководство / под рук. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграр. наука, 1998. — 156 с.
5. Дубинина Е. В. Интрогрессия генов *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* в отечественный сорт риса Снежинка с применением метода маркерной селекции / Е. В. Дубинина, Ж. М. Мухина // Научный журнал КубГАУ. — 2011. — № 66 (02). — С. 1–11.
6. Мухина Ж. М. Создание внутригенных молекулярных маркеров риса для повышения эффективности селекционного и семеноводческого процессов / Ж. М. Мухина, С. В. Токмаков, Ю. А. Мягих, Е. В. Дубинина // Научный журнал КубГАУ. — 2011. — № 67 (03). — С. 1–10.
7. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — М. : Колос, 1973. — 327 с.

Надійшла 03.07.2015.

UDC 577.2:581.2:632.938.1:633.181

**Galaev O. V., Galaeva M. V., Shpak D. V.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**DETECTION OF RACE-SPECIFIC BLAST RESISTANCE GENES *PI-TA* AND *PI-B* IN RICE VARIETIES (*Oryza sativa* L.)**

An intragenic codominant molecular genetic markers for detection allelic state race-specific blast resistance genes *Pi-ta* and *Pi-b* is used for searching its donors among 103 varieties and lines rice of different geographical origin in the National Collection of the Institute of rice NAANU. Genotypes carrier resistant dominant alleles of genes *Pi-ta* and *Pi-b* were detected.

УДК 577.2:581.2:632.938.1:633.181

**Галаев А. В., Галаева М. В., Шпак Д. В.**

**ВЫЯВЛЕНИЕ РАСОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ *PI-TA* И *PI-B* В СОРТАХ РИСА (*Oryza sativa* L.)**

Кодоминантные внутригенные молекулярно-генетические маркеры использованы для детекции аллельного состояния расоспецифических генов устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta* и *Pi-b* в 103 сортах и линиях риса различного географического происхождения из Национальной коллекции Института риса НААНУ. Обнаружены генотипы–носители доминантных аллелей генов *Pi-ta* и *Pi-b*, обеспечивающие устойчивость риса к пирикуляриозу.



УДК 577.21:633.174

Г. Ю. ШЕВЧУК, к. б. н., асист.

Од. нац. мед. ун-т

e-mail: shanni2901@mail.ru

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВИДІВ РОДУ *SORGHUM MOENCH*

*Проведено аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму геному сорго на міжвидовому і внутрішньовидовому рівнях. Уточнено генетичне походження соризу. Створено тест-панель 15 мікросателітних маркерів з високою дискримінаційною здатністю. Оцінено генетичну чистоту ліній сорго за даними маркерами. Проаналізовано алейний склад SSR-локусів та створено базу даних ДНК-типуювання ліній сорго, що культивуються на Півдні України.*

Ключові слова: *Sorghum Moench*, полімеразна ланцюгова реакція, мікросателіти, геном, поліморфізм.

**Вступ.** Досягнення молекулярної генетики та геноміки зробили вагомий внесок у розвиток загальної біології та відкрили широкі можливості для використання новітніх технологій у сільськогосподарській практиці. Сучасний напрям у дослідженнях теоретичних і практичних проблем рослинництва базується на вивченні поліморфізму геному того чи іншого виду за допомогою молекулярних маркерів. До певного часу об'єктом генетичних і молекулярно-генетичних досліджень було обмежене коло видів рослин — горох, кукурудза. З розвитком технології вивчення ДНК розширився спектр сільськогосподарських культур — об'єктів геномних досліджень. Услід за пшеницею, ячменем, соняшником почались дослідження такої важливої культури, як сорго.

Сорго (*Sorghum bicolor* Moench) культивується в 85 країнах світу і є однією з п'яти найважливіших злакових культур [1]. Вирощування його в посушливих умовах Південного Степу України, як найбільш посухостійкої кормової та зернової культури, має велике значення. Сорго також виявилось придатною сировиною для виробництва біоетанолу. Йому властиві значне еколого-географічне та сортове різноманіття, велика кількість проміжних форм, що істотно ускладнює класифікацію. Наявна таксономія заснована на двох підходах: ботанічному (оцінка основних морфологічних ознак сорго) та практичному (опис господарських ознак) [2, 3]. При класифікації роду *Sorghum* Moench найбільш часто використовують другий підхід.

Кілька десятиліть тому в ряді селекційних центрів України та Молдови створено нову культуру — сорго рисозерне, сориз (*Sorghum oryzoidum*),

яка має високу харчову цінність і використовується для одержання високоякісних круп'яних виробів [4]. Походження та класифікація соризу на сьогодні недостатньо визначені, оскільки ідентифікація здійснюється за морфологічними та агрономічними ознаками. Застосування ж молекулярних маркерів в оцінці варіабельності видів та сортів рослин дозволяє виявити генетичні взаємовідносини та уточнити систематику родів рослин найважливіших сільськогосподарських культур [5, 6]. У цьому плані ДНК-маркери, які генеруються в результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), можуть виявитися важливим допоміжним інструментом і для класифікації сорго.

**Мета:** оцінка молекулярно-генетичного різноманіття видів роду *Sorghum* та розробка ідентифікаційної системи маркерів.

**Матеріал і методи.** Матеріалом слугували 15 ліній чотирьох видів сорго: сорго звичайного (НК-180; K35–Є5; НК–5418; НК–2517; НК–1486), цукрового (Одеська 1820; 1969 Буджак; Одеська 2111; Одеська 2113; 2179 Буджак), вінікового (2645 Буджак; 2806 Буджак; 2778 Буджак), суданського (2810 Буджак; Суданка 1); п'ять ліній соризу (4005 Буджак; 2265 Буджак; 721/I; 1/II; Одеська 302), п'ять сортів рису: Пам'яті Гічкіна, Преміум, Дебют, Віконт, Україна; лінія кукурудзи ГК 26.

Виділяли ДНК і ПЛР згідно відомої методики [8]. Продукти ПЛР фракціонували у 10,0 %-му поліакриламідному гелі в TBE-буфері. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили згідно [9]. Кластерний аналіз з графічною побудовою дендрограм здійснювали за комп'ютерною програмою «TREES 4.0». Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках — як відношення поліморфних ПЛР-локусів до загального числа детектованих ПЛР-локусів:

$$P = n_p / n_p + n_{np} \times 100 \%,$$

де  $n_p$  — кількість поліморфних ПЛР-локусів, а  $n_{np}$  — кількість неполіморфних ПЛР-локусів.

Для кожного SSR-локусу визначали індекс поліморфності (Polimorphic Index Content), PIC за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2,$$

де  $f_i^2$  — частота  $i$ -го алеля.

**Результати досліджень та обговорення.** Для виявлення генетичного різноманіття та філогенетичних відношень обрані зразки сімейства злакових — кукурудза та рис. Кукурудзу обрано для порівняльного аналізу у зв'язку з тим, що вона фенотипово і генетично найбільш близька до сорго, а рис — для оцінки достовірності однієї з гіпотез про походження соризу як гібрида звичайного хлібного сорго з дикорослими формами рису.

ПЛР-аналіз з застосуванням 10 довільних праймерів дозволив диференціювати досліджені види сімейства злаків. Отримані унікальні для кожного зразка спектри ампліфікації ДНК, які включали від 10 до 23 ком-

понентів. Проаналізовано 183 амплікони. Рівень поліморфізму між зразками вибірки, що належать до різних родів та видів, склав 99 %.

Дендрограма об'єднала зразки, що належать до трьох родів: *Sorghum*, *Zea*, *Oryza*. Генетична дистанція між кластером А, який містить зразки роду *Sorghum*, та представником роду *Zea* складає 0,925. Між тим, *Zea* і *Oryza* віддалені один від одного з коефіцієнтом 0,939 (рис. 1). Це ілюструє значну генетичну віддаленість роду *Sorghum* від його найближчих родичів. Такий розподіл співпадає з загальним уявленням систематики злаків.

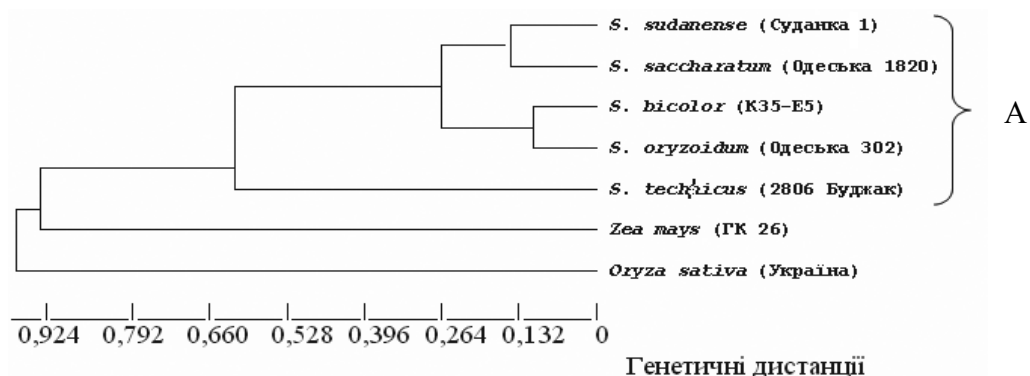


Рис. 1. Дендрограма між- та внутрішньородових взаємовідносин злакових за даними ДНК-типування за багатолокусними маркерами

Сориз знаходиться в одному кластері з іншими представниками роду сорго, на максимальних відстанях від кукурудзи та рису, мінімальна генетична дистанція виявлена між соризом та звичайним сорго. Отже, на основі молекулярно-генетичного аналізу можна зробити висновок, що сориз є формою сорго.

Використання ПЛР із 10 довільними праймерами дозволило диференціювати 20 генотипів сорго і оцінити між- та внутрішньовидовий поліморфізм цих зразків. Спектри ампліфікації ДНК були унікальні для кожної лінії і включали від 14 до 23 компонентів. Проаналізовано 188 ампліконів, з яких 180 — поліморфні. Рівень поліморфізму між зразками вибірки склав 96,2 %. Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,111 до 0,787 [9]. Кластеризація генотипів за даними багатолокусної системи маркерів відбиває належність зразків даної вибірки до груп, які відповідають ідентифікації за господарськими ознаками.

Для перевірки гіпотез походження соризу застосовували ПЛР-аналіз мікросателітних (МС) локусів. З метою детекції можливої присутності фрагментів рису в геномі соризу використовували 20 МС маркерів рису та 10 МС маркерів сорго. При ампліфікації послідовностей 10 МС локусів сорго отримали ДНК-спектри двох зразків соризу, чотирьох ліній сорго та чотирьох сортів рису. За МС локусами сорго Sb6–36 та Sb6–84 у всіх сортів рису виявлено продукти ампліфікації, аналогічні тим, що визна-

чені для зразків сорго. При ампліфікації 20 МС локусів рису отримано амплікони для всіх досліджуваних зразків. За сімома МС локусами рису (RM105, RM125, RM259, RM338, RM452, RM489 та RM552) виявлено продукти ампліфікації для двох зразків соризу та для деяких видів роду *Sorghum*. Для лінії Суданка 1 та ліній соризу Одеська 302 та 4005 Буджак визначені алелі МС локусів RM259 та RM338, які не характерні для досліджених зразків рису. Вищенаведене може свідчити про те, що сориз, отриманий унаслідок гібридизації видів сорго, несе фрагменти ДНК *Sorghum sudanense*. За сумарними даними ПЛР-аналізу МС локусів сорго та рису зразки на дендрограмі розподілились у два кластери (рис. 2). Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,226 до 0,994. Перший кластер містить представників роду *Sorghum*, при цьому найближчим до представників соризу є зразок *S. sudanense* — лінія Суданка 1. Другий кластер об'єднує зразки рису. На основі молекулярно-генетичного аналізу МС локусів сорго та рису виявлено, що у соризу нема фрагментів ДНК рису.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз різних фракцій геному сорго за молекулярними маркерами, що дозволило виявити високий рівень поліморфізму роду та близьку спорідненість соризу з звичайним та трав'янистим сорго [10].

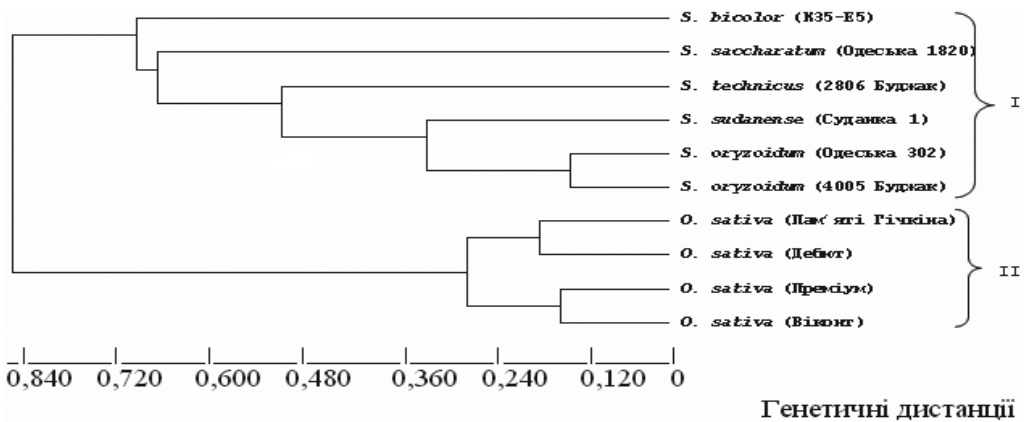


Рис. 2. Сумарна дендрограма генетичних взаємовідносин зразків сорго та рису за даними ПЛР-аналізу МС локусів сорго та рису

Запропоновано систему ідентифікації генотипів сорго за даними ДНК-профілювання 15 мікросателітних локусів, які локалізовані на різних хромосомах і виявляють поліморфізм у дослідженій вибірці генотипів. Для оцінки дискримінаційного потенціалу маркерної системи вивчали 20 ліній сорго та соризу. Число алелів на локус варіювало від трьох до восьми, середня кількість алелів на локус — 5. Середнє значення PIC 0,68 [11].

Рівень інформативності маркерної системи виявився достатнім для диференціації проаналізованих зразків. За трьома високополіморфними локусами — Sb4–121, Sb6–57, Sb6–84, які показують значення PIC 0,81,

0,79 та 0,76, відповідно оцінили генетичну однорідність ліній сорго. Внутрішньолінійної гетерогенності не виявлено [12, 13].

**Висновки.** Рівень міжродового поліморфізму видів сорго та інших злаків склав 99 %, що свідчить про значну генетичну віддаленість роду *Sorghum* від його найближчих родичів. Значний рівень між- та внутрішньовидового поліморфізму роду *Sorghum* (96,2 %) засвідчує широку мінливість ліній Півдня України. За багатолокусними та мікросателітними маркерами виявлено близьку спорідненість соризу зі звичайним і трав'янистим сорго та віддаленість його від рису. Сориз є формою сорго і не несе фрагментів ДНК рису. Розроблено систему реєстрації ліній сорго у вигляді молекулярно-генетичних формул — за алельним складом мікросателітних локусів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Islam-Faridi M. N. A molecular cytogenetic map of *Sorghum* chromosome 1: fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes / M. N. Islam-Faridi, K. L. Childs, P. E. Klein [et al.] // *Genetics*. — 2002. — Vol. 161, № 367. — P. 345–353.
2. Иванюкович Л. К. Обзор классификации сорго *Sorghum Moench* / Л. К. Иванюкович, Ю. А. Доронина // *Тр. по прикл. бот., ген. и сел.* — 1980. — Т. 69, вып. 1. — С. 18–27.
3. Демиденко В. Г. Сорго / В. Г. Демиденко. — Москва : Гос. изд-во сел. литературы, 1957. — 158 с.
4. Дремлюк Г. К. Сорго на изломе эпох. Приемы и методы селекции : монография / Г. К. Дремлюк. — Одесса : СГІ–НЦСС, 2008. — 243 с.
5. Кожухова Н. Э. Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика*. — 2006. — № 5. — С. 82–93.
6. Сиволап Ю. М. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів / Ю. М. Сиволап, В. В. Волкодав, М. С. Бальвінська, Н. Е. Кожухова, А. Є. Солоденко, С. В. Чеботар. — Одеса : Інтерпринт, 2004. — 14 с. (метод. рек.).
7. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г. Е. Сулимова // *Успехи современной биологии*. — 2004. — Т. 124, № 3. — С. 260–271.
8. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (науч.-метод. руковод.). — К. : Аграрная наука, 1998. — 156 с.
9. Шевчук А. Ю. Молекулярно-генетический анализ форм сорго, возделываемых в Украине / А. Ю. Шевчук, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика*. — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 47–53.
10. Галаев О. В. Молекулярно-генетический анализ геному соризу *Sorghum oryzoidum* / О. В. Галаев, Г. Ю. Шевчук, В. В. Дудченко, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика*. — 2011. — Т. 45, № 4. — С. 9–15.
11. Деклараційний патент на корисну модель 48475, Україна «Спосіб реєстрації генотипів сорго» / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, Г. Ю. Шевчук. Південний

- біотехнологічний центр в рослинництві, дата подання 13.07.09; дата публікації 25.03.10. Бюл. № 6.
12. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична ідентифікація та реєстрація ліній, сортів, гібридів сорго / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, Г. Ю. Шевчук. — Одеса : Інтерпринт, 2010. — 12 с.
  13. Шевчук Г. Ю. ДНК-технології в дослідженні геному сорго / Г. Ю. Шевчук, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Вісник Одеського національного університету. (Серія «Біологія»). — 2010. — Т. 15, вип. 6. — С. 57–63.

Надійшла 10.06.2015.

UDC 577.21:633.174

**Shevchuk G. Yu.** Odessa National Medical University

### **MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF SPECIES OF THE GENUS *SORGHUM MOENCH***

The analysis of molecular genetic polymorphism of sorghum genome on the interspecific and intraspecific levels. The genetic origin of sorghum was refined. The 15 SSR-marker test-panel with high discriminatory ability was created. The genetic purity of the investigated lines was evaluated according to the analyzed markers. The allelic composition of SSR-loci and DNA typing database of sorghum lines cultivated in the south Ukraine was created.

УДК 577.21:633.174

**Шевчук А. Ю.**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ РОДА *SORGHUM MOENCH***

Проведен анализ молекулярно-генетического полиморфизма генома сорго на межвидовом и внутривидовом уровнях. Уточнено генетическое происхождение сорго. Создана тест-панель 15 микросателлитных маркеров с высокой дискриминационной способностью. Оценена генетическая чистота линий сорго по данным маркерам. Проанализирован аллельный состав SSR-локусов и создана база данных ДНК-типирования линий сорго, культивируемых на Юге Украины.

УДК 633.63: 575.113:575.174.015.3

Л. В. ШАЮК<sup>1</sup>, к. б. н., зав. від. — зав. лаб.,

М. В. РОЇК<sup>2</sup>, д. с.-г. н., проф., акад. НААНУ, дир.

<sup>1</sup> Український інститут експертизи сортів рослин

<sup>2</sup> Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

e-mail: shaiuk@mail.ru

## **ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СКЛАДУ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ (*Beta vulgaris ssp. Saccharifera Dole*)**

*Залучення у селекційну практику великої кількості форм буряків для створення високопродуктивних сортів та гібридів потребує надійних методів їхньої ідентифікації. З цією метою широко використовується аналіз алельного складу мікросателітних локусів європейських форм. З використанням опублікованих даних щодо алельного складу поліморфних МС локусів європейських форм буряків дослідили українські лінії буряків та провели порівняльний аналіз. Виявлено значні розбіжності як за кількістю ідентифікованих алелів, так і за їхньою частотою.*

Ключові слова: буряки, порівняльний аналіз, МС локуси, частота алелів МС локусів.

**Вступ.** Одним з напрямів сучасних досліджень культурних рослин є аналіз та характеристика їхнього поліморфізму на основі ДНК. Молекулярно-генетичний аналіз структури генотипів дозволяє суттєво розширити уявлення щодо філогенетичного походження, таксономічної належності та удосконалити технологію ідентифікації на між- і внутрішньовидовому рівні [1]. Залучення у селекційну практику великої кількості форм буряків для створення високопродуктивних сортів та гібридів потребує надійних методів ідентифікації. У різних країнах, молекулярно-генетичні методи з успіхом використовуються для ідентифікації ліній та гібридів буряків [2–4]. Разом з цим зауважимо, що для оцінки та ідентифікації вітчизняного селекційного матеріалу нові методи використовуються недостатньо. Отже, актуальними є дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму мікросателітних локусів (МС локусів) для буряків вітчизняної селекції та порівняння їхнього алельного складу з виявленими для європейських форм.

**Матеріали та методи.** Матеріалом досліджень слугували вісім чоловічостерильних ліній та шість багатонасінних запилювачів цукрових буряків вітчизняної селекції. ДНК виділяли з триденних проростків ЦТАБ-методом [5]. Кожна лінія була представлена тридцятьма п'ятьма генотипами.

Підбір поліморфних МС локусів здійснювали за літературними публікаціями. Загалом було досліджено алельний стан п'яти локусів: GZM 017, GZM 058, GZM 086, Vm 3 та Vm 4 [2, 6]. Нуклеотидні послідовності праймерів, що фланкують ці мікросателіти, температурні режими для ампліфікації та алельний склад з частотними характеристиками для європейських культурних форм буряків наведені у працях Mörchen et al. (1996) та Dürnte (2001).

Реакцію ампліфікації проводили у програмованому термостаті «ТС 48» (Clever Scientific Ltd, Великобританія). Розподіл продуктів ампліфікації проводили у 4 %-му агарозному гелі (Agarose SFRTM, Amresco) за допомогою горизонтального електрофорезу [7]. Розміри алелів за дослідженими локусами визначали за комп'ютерною програмою Electrophoresis Visualization Studio (version 1.05).

Для характеристики МС локусів розраховували індекс поліморфності локусу polymorphism information content (PIC), а для алелів — частоту.

**Обговорення результатів дослідження.** Загалом за п'ятьма МС локусами виявлено двадцять вісім алелів (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика МС локусів у буряків різного походження

Локус	Українські лінії цукрових буряків			Європейські культурні форми		
	кількість алелів, шт.	розмір алелів, п. н.	PIC	кількість алелів, шт.	розмір алелів, п. н.	PIC
Vm 3	4	110–165	0,46	5	100–120	0,24
Vm 4	6	65–93	0,76	6	55–103	0,60
GZM 017	4	150–190	0,57	6	150–182	0,70
GZM 058	6	278–333	0,74	6	293–321	0,59
GZM 086	8	130–260	0,79	7	165–212	0,83

Ідентифіковані алелі рівномірно присутні у даній рослинній вибірці. Це дало змогу отримати високі значення PIC, що коливалися у межах від 0,46 до 0,79, а середній показник становив 0,66.

Порівняльний аналіз значень PIC для українських ліній цукрових буряків із визначеними для європейських форм свідчить про вищий їхній рівень для перших за переважною більшістю локусів. Так, більшим цей показник був для локусів Vm 3 (0,46 для українських ліній у порівнянні з 0,24 для європейських буряків), Vm 4 (0,76 та 0,60) та GZM 058 (0,74 у порівнянні з 0,59). Для локусів GZM 017 та GZM 086 значення PIC було дещо нижчим для вибірки вітчизняних ліній, ніж встановлений для європейських форм (табл. 1).

Вищий рівень значення PIC для вибірки свідчить про більше різноманіття генетичного матеріалу, що об'єднаний у ній. Також можна стверджувати про кращу спроможність диференціювати вітчизняні лінії за алельними варіантами цих мікросателітних локусів у порівнянні з європейськими формами. Однак зауважимо, що для дослідженого нами ма-



теріалу характерний внутрішньолінійний поліморфізм, що також певною мірою вплинуло на величину PIC. Отже, відповідно значенням PIC, для вітчизняного матеріалу характерне більше різноманіття за алелями MC локусів у порівнянні з європейськими формами, а відтак, використані MC локуси мають вищу диференційну здатність.

Аналіз алельного складу MC локусів дослідженої нами вибірки ліній цукрових буряків, порівняно з даними для європейських культурних форм, показав ряд відмінностей. Так, за MC локусом *Vm 3* для європейських культурних форм виявлено п'ять алелів, а для українських ліній — чотири (табл. 1). Для європейських культурних форм характерна наявність алеля розміром 110 п. н. з високою частотою (0,87). У нашій вибірці його частота мала низьке значення (0,09), а найпоширенішим був алель 125 п. н. (0,71) (рис. 1, А). Необхідно зазначити, що три алелі з чотирьох, виявлених у наших дослідженнях за цим локусом, а саме — 125 п. н., 135 п. н. та 165 п. н., — є унікальними, оскільки в європейських форм алелі такого розміру не ідентифіковано навіть серед диких форм [3].

Для MC локусу *Vm 4* у вибірці вітчизняних ліній з найбільшою частотою виявлено алелі розміром 79 п. н. та 69 п. н. (відповідно 0,37 та 0,24) (рис. 1, Б). Алелі з такими розмірами не ідентифіковані у вибірці, представлений культурними формами європейської селекції, проте вони присутні з невисокою частотою серед представників дикого виду *B.v. ssp. maritima* [3]. Європейські форми у своєму складі мали з високою частотою (0,59) алель розміром 83 п. н. Для українських ліній алель такого розміру не ідентифіковано.

У локусі *GZM 017* серед досліджених нами ліній з високою частотою (0,61) виявлено алель розміром 150 п. н., а серед європейських форм буряків він хоча і був нами ідентифікований, проте з низькою частотою (0,03) (рис., В) [2]. Алель розміром 190 п. н. виявлено лише у вибірці українських ліній.

За локусом *GZM 058* для українських ліній цукрових буряків, як і для європейських культурних форм, з найвищою частотою виявлено алель з розміром 293 п. н. (рис. 1, Г). Однак українські лінії цукрових буряків мають у своєму складі алелі розміром 278 п. н. та 333 п. н. (відповідно 0,04 та 0,14) і не мають алелів 310 п. н. та 317 п. н., ідентифікована у європейських форм їхня частота теж невисока — відповідно 0,12 та 0,03 [2].

За локусом *GZM 086* ідентифіковано сім алелів, а для європейських — вісім. Відмінність у алельному складі досліджених українських ліній цукрових буряків, порівняно з європейськими, за цим локусом полягає у наявності алелів 130 п. н., 160 п. н., 230 п. н., 244 п. н., 260 п. н. та відсутності фрагментів розміром 165 п. н., 184 п. н., 186 п. н., 191 п. н., 212 п. н. (рис., Д). З найбільшою частотою присутні алелі розміром 160 п. н. (0,34) та 130 п. н. (0,22). У європейській вибірці алелі такого розміру не виявлені [2]. Для них з найбільшою частотою наявні алелі розміром 170 п. н. (0,23) та 200 п. н. (0,21). У вибірці

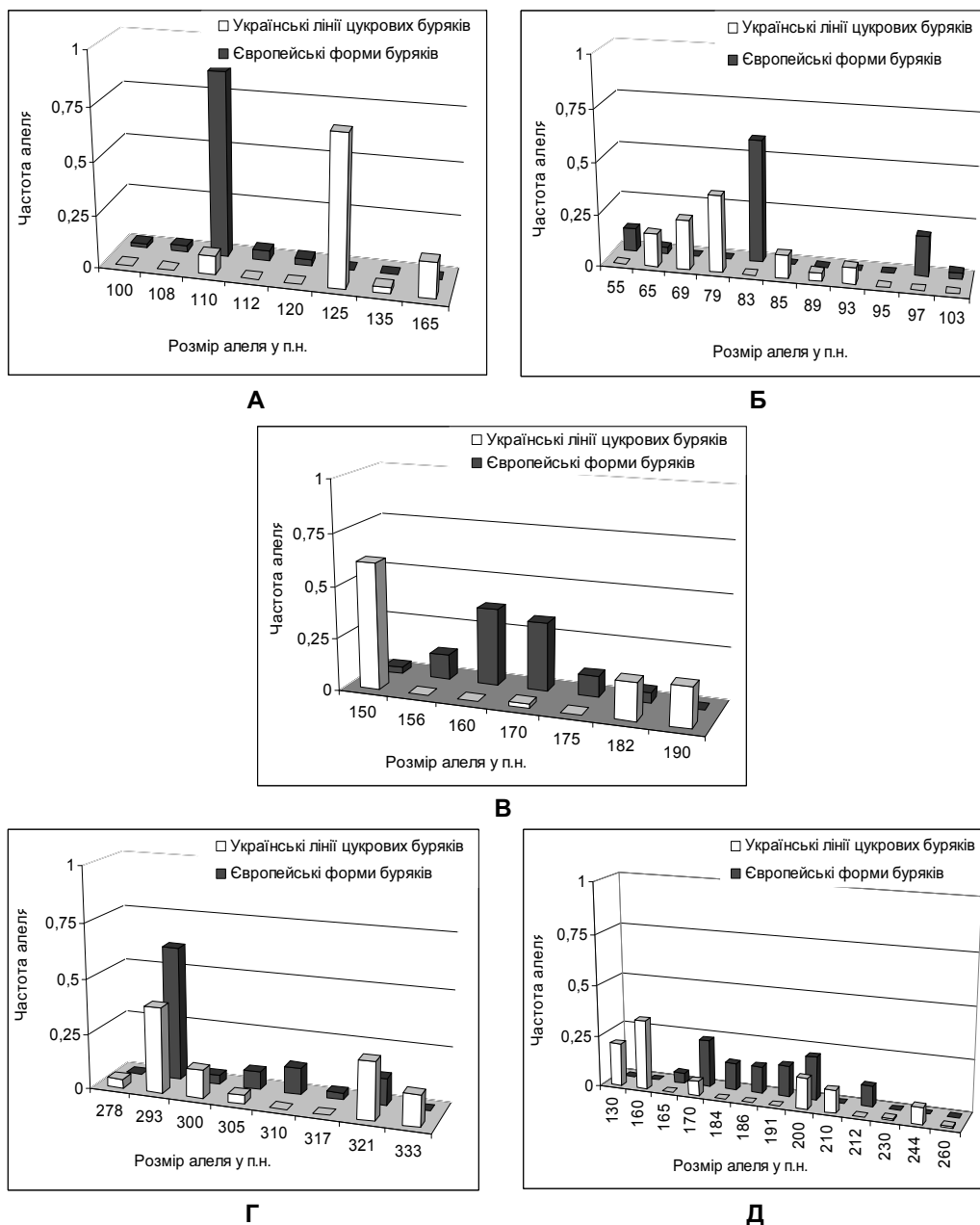


Рис. 1. Алелі, ідентифіковані у буряків різного походження за МС локусами: А) — алелі, виявлені у локусі *Bm 3*; Б) — алелі, виявлені у локусі *Bm 4*; В) — алелі, виявлені у локусі *GZM 017*; Г) — алелі, виявлені у локусі *GZM 058*; Д) — алелі, виявлені у локусі *GZM 086*

вітчизняних зразків ці алелі присутні з відносно низькою частотою: для 170 п. н. — 0,07, а для 200 п. н. — 0,15.

Отже, в обох вибірках за окремими МС локусами ідентифіковано унікальні алелі, які можуть бути використані для характеристики оригінальних селекційних матеріалів.

**Висновки.** Порівняльний аналіз алельного складу МС локусів українських ліній цукрових буряків та європейських форм буряків свідчить про більше різноманіття перших, отже, використані МС локуси мають вищу диференційну здатність саме для вітчизняних ліній.

За дослідженими МС локусами для вітчизняних ліній та європейських форм культурних буряків виявлено значні розбіжності як за кількістю ідентифікованих алелів, так і за їхньою частотою. Алелі, що присутні тільки у вітчизняних лініях цукрових буряків або тільки у європейських формах, можна вважати унікальними, тобто такими, що характеризують лише їхнє оригінальне генетичне різноманіття.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абрамсон Н. И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы / Н. И. Абрамсон // Вестник ВОГиС. — 2007. — Т. 11 (2). — Р. 307–331.
2. Dörnte J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.): Dissertation Doktors der Agrarwissenschaften / Dörnte J. — Gatersleben, 22.10.2001. — 100 p.
3. Smulders M. J. M. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers / M. J. M. Smulders, G. D. Esselink, I. Everaert, J. De Riek, B. Vosman / BMC Genetics. — 2010. — Vol. 11 (41). — P. 1–11.
4. Федулова Т. П. Геномная идентификация линий и гибридов сахарной свеклы на ЦМС-основе с помощью RAPD-маркеров / Т. П. Федулова // Институт цукрових буряків УААН : зб. наук. пр. — 2010. — Вип. 11. — С. 120–125.
5. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. — М. : Мир, 1984. — 399 с.
6. Mörchen M. Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. / M. Mörchen, J. Cuguen, G. Michaelis, C. Hänni, P. Saumitou-Laprade // Theor. Appl. Genet. — 1996. — Vol. 92. — P. 326–333.
7. Westermeier R. Electrophoresis in practice / R. Westermeier. — Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001. — 349 p.

Надійшла 17.06.2015.

UDC 633.63: 575.113:575.174.015.3

<sup>1</sup>Shajuk L. V., <sup>2</sup>Roik M. V. <sup>1</sup>Ukrainian institute for plant variety examination <sup>2</sup>Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS of Ukraine

**COMPARATIVE ANALYSIS OF MIOROSATELLITE LOCI ALLELIC  
COMPOSITION OF SUGAR BEET  
(*BETA VULGARIS SSP. SACCHARIFERA DOLE*)**

In article the research results of allelic status of MS –loci for fourteen lines of sugar beet are presented. It is found the PIC from 0,46 to 0,79. For studied MC loci it is marked higher genetic diversity for Ukrainian (domestic) lines in comparing with European forms. Consequently established marker system will have a larger differential ability for domestic lines. As a result of comparative analysis of allelic Ukrainian sugar beet line with European forms were found significant differences as the number of identified alleles and their frequency. Also it was found alleles that are typical only for domestic sugar beet lines or only European forms. These alleles can be applying for determination of belonging of some form of sugar beet to some genetic diversity.

УДК 633.63: 575.113:575.174.015.3

**Шаюк Л. В., Роик М. В.**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА  
МИКРОСАТЕЛИТНЫХ ЛОКУСОВ СВЕКЛЫ САХАРНОЙ  
(*BETA VULGARIS SSP. SACCHARIFERA DOLE*)**

Изложены результаты исследования аллельного состава пяти МС локусов для четырнадцати линий сахарной свеклы. Установлены значения PIC от 0,46 до 0,79. Для исследованных МС локусов аллельное разнообразие было выше для отечественных линий, вследствие чего созданная маркерная система будет иметь большую дифференционную способность на выборках отечественного материала по сравнению с европейским. В результате сравнительного анализа аллельного состава МС локусов украинских линий с европейскими формами отмечены значительные отличия как по количеству идентифицированных аллелей, так и по их частоте. Выявлены уникальные аллели, характерные только для отечественных форм или только для европейских. Эти аллели можно использовать для установления принадлежности отдельных форм свеклы к определенному генетическому разнообразию.

УДК 633.791:575.113

А. М. ВЕНГЕР, мол. наук. співроб.,  
Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., с. н. с., гол. наук. співроб.,  
СГІ–НЦНС, Одеса  
venger87@ukr.net

## **МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ В СЕЛЕКЦІЇ ТА РОЗСАДНИЦТВІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (*Humulus lupulus L.*)**

*Проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм ділянок ядерного геному хмелю звичайного, пов'язаних з синтезом цінних вторинних метаболітів та проявом статі, а також мікросателітних локусів. Визначено залежність між поліморфізмом генів, що кодують халконсинтази, та вмістом гірких речовин у шишках хмелю. Розроблено набори молекулярних маркерів для комплексної оцінки генотипу хмелю, зокрема для встановлення автентичності, визначення статі, типу сорту, реєстрації.*

Ключові слова: *хміль звичайний, гени, мікросателітні локуси, тип сорту, стать, молекулярні маркери.*

**Вступ.** Хмелярство — важлива складова економіки багатьох країн світу, зокрема й України. Хміль звичайний *Humulus lupulus L.* є джерелом найбільш специфічної, незамінної та найдорожчої сировини для пивоваріння, але завдяки наявності унікальних біоактивних компонентів хміль використовують також у харчовій промисловості, медицині, фармакології, парфумерії [1]. Важливість галузі хмелярства спонукає до застосування сучасних молекулярних біотехнологій для створення конкурентоспроможних сортів, що своєю чергою потребує розширення фундаментальних досліджень з геноміки культури. Вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму різних фракцій геному хмелю та розробка молекулярних маркерів необхідні для ідентифікації сортів та нового селекційного матеріалу, контролю автентичності та генетичної чистоти сортів, маркерного добору носіїв певних генів агрономічно важливих ознак, визначення соматональної варіабельності та генетичної стабільності, генетичного картування, детекції та діагностики патогенів [2].

Найціннішою частиною рослини хмелю є шишки завдяки наявності комплексу специфічних смол, поліфенольних сполук, ефірних масел і біологічно активних речовин, які мають не тільки смакові й ароматичні, але також антибіотичні, антиокислювальні та лікувальні властивості. В залежності від рівня ксантогумолу в шишках сорти хмелю звичайного поділяють на гіркі та ароматичні. Головна ціль селекції хмелю полягає в поліпшенні вмісту та якості вторинних метаболітів, що акумулюються в

лупулінових зернах шишок [3]. Тому актуальним є дослідження поліморфізму генів, пов'язаних з біосинтезом цих речовин.

Сучасний рівень захисту авторських прав вимагає використання ідентифікації та реєстрації сорту за молекулярними маркерами.

У промислових цілях культивують жіночі рослини хмелю, які розмножують вегетативно. Чоловічі рослини використовують тільки в селекції, зокрема в гібридизації. Визначають стать рослин фенотипово на другий рік вирощування. Тому важливим для селекції та розсадництва є раннє тестування статі перед висадкою [4]. Також важливо забезпечити розмноження селекційного матеріалу хмелю, вільного від фітопатогенів, передусім збудника бактеріального раку. Молекулярні біотехнології детекції фітопатогенів дозволяють проводити раннє та надійне виявлення ураження.

Отже, молекулярно-генетичні дослідження та розробка на основі одержаних результатів молекулярних маркерів для різноманітних напрямів селекції та розсадництва хмелю актуальні як з теоретичного, так і практичного аспектів.

**Мета:** розробити молекулярні маркери для оцінки зразків хмелю звичайного за складом і рівнем цінних вторинних метаболітів, статтю, ураженістю агробактеріями на основі дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму певних генів та локусів геному хмелю звичайного

**Матеріали і методи.** Матеріалом слугували жіночі зразки сортів хмелю звичайного селекції Інституту сільського господарства Полісся НААН України: Альта, Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Промінь, Чаклун (гіркі сорти), Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18, Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав (ароматичні сорти) та зразки хмелю звичайного чоловічої статі: 1з 63–2–3, 1к 64–1–1, 2з 63–2–7, 2к 64–2–5, 3з 65–6–1, 4з 68–3–1, 5к 67–3–1, 6к 67–4–8.

Для біоінформатичних досліджень використано нуклеотидні послідовності генів *chs*\_H1 AJ304877, AM263199 (повні сиквенси), AM263200, AM263201, FJ554585 (мРНК); *chs2* AB061020 (повний сиквенс), AB061021, FJ554586 (мРНК); *chs3* AB061022 (повний сиквенс); *chs4* AJ430353 (повний сиквенс), FJ554587 (мРНК); *vps* (AB015430, AB047593, EU685789, EU685790, EU685791, EU685792, EU685793, EU685794, EU685795, EU685796, EU685797, EU685798, EU685799, EU685800, FJ554588) (повні сиквенси) з Національного центру біотехнологічної інформації (National centre of biotechnology information, NCBI).

Виділення ДНК з тканин хмелю звичайного, постановку полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез проводили за загальноприйнятими методами [5–8]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за [9]. Кластерний аналіз результатів ПЛР-дослідження сортів хмелю звичайного української селекції проводили за алгоритмом Clustal W., залежність між поліморфізмом генів, пов'язаних із синтезом ксантогумолу, та ознакою «тип сорту» обраховували за Спірманом [10].

**Результати.** На вибірках нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази, та 20 сортів хмелю звичайного проведено біоінформатичний та молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму генів, що зумовлюють наявність гірких речовин у шишках хмелю звичайного [11, 12].

За результатом кластерного аналізу побудовано дендрограму (рис.).

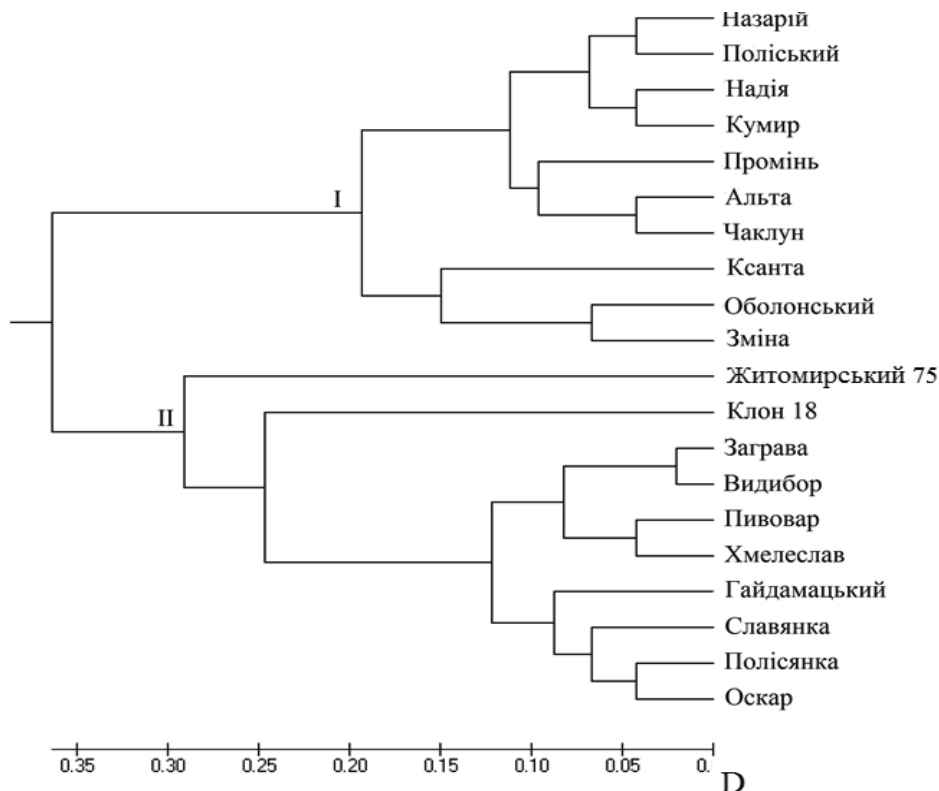


Рис. Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на поліморфізмі генів *chs\_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*. I, II — кластери

За кластерним аналізом відбувається чітка кластеризація сортів за їхнім типом. До кластера I увійшли всі гіркі сорти, до кластера II — всі ароматичні. Отже, виявлено залежність між поліморфізмом генів, пов'язаних із синтезом ксантогумолу, та ознакою «гіркий / ароматичний тип сорту» [13].

Молекулярно-генетичний аналіз певних ділянок Y-хромосоми хмелю звичайного дозволив виявити необхідність використання двох молекулярних маркерів: мікросателітного маркера *HIAGA7* як референтного для виключення псевдонегативних результатів та STS-маркера, специфічного для зразків чоловічої статі [14].

Ведення розсадництва хмелю включає технологію мікроклонального розмноження *in vitro*, що потребує контролю ураження фітопатогенами, в т. ч. збудником бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens*. Запро-

поновано двоетапну схему детекції агробактерії за молекулярними маркерами генів *virD2* та *ipt* [15].

У процесі відтворення і виробничого використання сортів в умовах довгострокової монокультури, вегетативного типу розмноження, при накопиченні і передачі збудників хвороб, негативного впливу фізико-хімічних і біологічних факторів можливі зміни генетичного матеріалу сорту, що призводить до зниження його продуктивності та погіршення якісних показників. Для контролю автентичності сорту, перевірки на сортову типовість, однорідність і вирівняність, а також для захисту авторських прав розроблено систему молекулярно-генетичної реєстрації сорту за молекулярними маркерами [16]. Формула сорту містить інформацію про алейний стан мікросателітних локусів та генів агрономічно важливих ознак.

Отже, розроблено набори молекулярних маркерів для комплексної оцінки генотипу хмелю звичайного. Їх використання дозволить підвищити ефективність селекції та розсадництва хмелю завдяки скороченню витрат праці, коштів, площ (в теплицях або полі) та часу.

**Висновки.** Теоретично та експериментально проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм ділянок ядерного геному хмелю звичайного, пов'язаних з синтезом цінних вторинних метаболітів та проявом статі, а також мікросателітних локусів. Розроблено набори молекулярних маркерів для комплексної оцінки генотипу хмелю, зокрема для визначення автентичності, статі, типу сорту, реєстрації.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. McAdam E. Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry / E. McAdam, J. Freeman, S. Whittock [et al.] // BMC Genetics. — 2013. — Vol. 14. — P. 14–36.
2. McAdam E. Quantitative genetic parameters for yield, plant growth and cone chemical traits in hop (*Humulus lupulus* L.) / E. McAdam, R. Vaillancourt, A. Koutoulis [et al.] // BMC Genetics. — 2014. — Vol. 15. — P. 15–22.
3. Ляшенко Н. И. Физиология и биохимия хмеля / Н. И. Ляшенко, Н. Г. Михайлов, Р. И. Рудык. — Житомир : Полісся, 2004. — С. 90–210.
4. Divashuk M. Molecular cytogenetic mapping of *Humulus lupulus* sex chromosomes / M. Divashuk, O. Olexandrov, P. Kroupin [et al.] // Cytogen. Genome Res. — 2011. — Vol. 134. — P. 213–219.
5. Okada Y. Molecular cloning and expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene responsible for essential oil biosynthesis in hop (*Humulus lupulus*) / Y. Okada, M. Sugimoto, I. Kazutoshi // J. Plant Physiol. — 2001. — Vol. 158 (9). — P. 1183–1188.
6. Patzak J. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Patzak, I. Vrba, J. Matousek // Genome. — 2007. — Vol. 50. — P. 15–25.
7. Jakse J. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) / J. Jakse, Z. Satovic, B. Javornik // Genome. — 2004. — Vol. 47. — P. 889–899.



8. Polley A. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers / A. Polley, E. Seigner, M. Ganai // Genome. — 1997. — Vol. 40. — P. 357–361.
9. Smith S. Identification of common molecular subsequences / S. Smith, M. Waterman // J. Mol. Biol. — 1981. — Vol. 147. — P. 195–197.
10. Spearman C. The proof and measurement of association between two thing / C. Spearman // Amer. J. Psychol. — 1987. — Vol. 100. — P. 441–471.
11. Venger A. Molecular-genetic polymorphism of *vps* gene in Ukrainian hop varieties / A. Venger, N. Volkova // Modern science. — 2014. — Vol. 1. — P. 28–34.
12. Венгер А. М. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *chs2*, *chs3* та *chs4* у сортів хмеля звичайного української селекції / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Вісник Запорізького національного університету. — 2015. — № 1 (29). — С. 13–21.
13. Венгер А. М. Поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, та його зв'язок з рівнем гірких речовин шишок хмелю звичайного / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Наукові доповіді НУБіП України. — 2015. — № 2. — С. 1–9.
14. Венгер А. М. Визначення статі хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) за молекулярними маркерами / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Зб. наук. праць СГІ–НЦНС. — 2013. — Вип. 26 (61). — С. 161–166.
15. Венгер А. М. Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Мікробіологія і біотехнологія. — 2015. — № 1 (29). — С. 60–65.
16. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична оцінка сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Волкова, О. О. Захарова [та ін.] : метод. рек. — Одеса : КП ОМД, 2012. — 18 с.

Надійшла 04.06.2015.

UDC 633.791:575.113

**Venger A. M., Volkova N. E.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **MOLECULAR MARKERS IN HOP BREEDING (*Humulus lupulus* L.)**

Molecular genetic polymorphism of hop nuclear genome regions associated with secondary metabolites synthesis and sex, as well as microsatellite loci was analyzed. The dependence between polymorphisms of genes encoding chalcone synthase, and the content of bitter substances in hop cones was defined. The sets of molecular markers for hops genotype integrated assessment were developed, in particular for the authenticity determining, testing of sex, varieties type, registering.

УДК 633.791:575.113

**Венгер А. Н., Волкова Н. Э.**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ И ПИТОМНИКОВОДСТВЕ  
ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*Humulus lupulus* L.)**

Проанализирован молекулярно-генетический полиморфизм участков ядерного генома хмеля, связанных с синтезом ценных вторичных метаболитов и проявлением пола, а также микросателлитных локусов. Определена зависимость между полиморфизмом генов, кодирующих халконсинтазы, и содержанием горьких веществ в шишках хмеля. Разработаны наборы молекулярных маркеров для комплексной оценки генотипа хмеля, в частности для установления автентичности, определения пола, типа сорта, регистрации.

УДК 683.581.167

В. В. ВЛАСОВ, д. с.-г. н., ст. н. с., член-кор. НААН України, дир. ін-ту,  
Н. А. МУЛЮКІНА, д. с.-г. н., ст. н. с., заст. дир.,  
М. І. ТУЛАЄВА, к. б. н.  
І. А. КОВАЛЬОВА, к. с.-г. н., зав. від.,  
В. С. ЧІСНІКОВ, к. с.-г. н., зав. лаб.,  
Л. О. КОНУП, к.б.н., зав. лаб.,  
О. М. КАРАСТАН, н. с., зав. сект. мол. ген.,  
Д. Ю. ЛОСЕВА, асп.  
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»  
e-mail: tairmna2005@ukr.net

## **ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ У ДОСЛІДЖЕННІ ВИНОГРАДУ (*Vitis vinifera* L.) В ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. ТАЇРОВА»: МЕТОДИЧНІ ТА ІСТОРИЧНІ АСПЕКТИ**

*Подається стислий опис основних етапів застосування ДНК-технологій у вивченні винограду (*Vitis vinifera* L.) різного спрямування в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова». Охарактеризовано методичну базу та основні результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму винограду та ДНК-ідентифікації збудників вірусних, бактеріальних та фітоплазмових його хвороб. Показано, що застосування ДНК-технологій в селекції та клоновій селекції винограду, а також у системі санітарного контролю у виробництві садивного матеріалу європейської категорії «сертифікований» є підґрунтям підвищення ефективності селекційного процесу цієї культури.*

Ключові слова: *виноград, молекулярно-генетичний поліморфізм, мікросателітні маркери, вірусні та фітоплазмові хвороби винограду, бактеріальний рак винограду, полімеразна ланцюгова реакція.*

**Вступ.** ДНК-технології широко використовуються в дослідженні різноманітних аспектів генетики, селекції та фітопатології винограду. Дев'яності роки минулого сторіччя були означені на цьому шляху розробкою та впровадженням кількох методичних підходів, зокрема використанням ПДРФ-аналізу для диференціації сортів винограду [1] та використанням аналізу дволанцюгової РНК для детекції та ідентифікації вірусів винограду [2].

Трохи пізніше головним інструментом на обраних нами напрямках досліджень сортів винограду та його патогенів стає полімеразна ланцюгова реакція, яка виявилась більш зручним та чутливішим інструментом.

ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» (на той час НВО з виноградарства та розсадництва) в зазначений вище період розпочинає широкомасштабну

програму з розробки наукового забезпечення сертифікованого виноградного розсадництва на базі нещодавно створеного Центру клонової та фітосанітарної селекції винограду. Оскільки програма в її європейському розумінні охоплює такі напрями, як клонова селекція, прискорене розмноження унікальних генотипів та отримання вихідного безвірусного садивного матеріалу, виникла потреба в залученні ДНК-технологій.

Можливості, які пропонували наведені вище методичні підходи, не залишилися непоміченими. Виконання блоку зазначених тут завдань було розпочато на першому етапі (1991–1995) за допомоги відділу молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту під керівництвом академіка НААН Ю. М. Сиволапа. У подальшому (2001–2015) переважна більшість завдань з розробки та використання ДНК-технологій у дослідженнях виконувалася в рамках ПНД (програм наукових досліджень) НААН «Сільськогосподарська біотехнологія», керівником якої був також Ю. М. Сиволап.

**Метою** нашої роботи є аналіз результатів застосування ДНК-технологій в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» на напрямках клонової та генеративної селекції, а також санітарного контролю фітопатогенів у системі сертифікованого виноградного розсадництва.

**Матеріал та методи досліджень.** Матеріалом для досліджень були сорти й клони винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова».

Оцінку молекулярно-генетичного поліморфізму клонів сортів винограду у 1991–1995 роках проводили методом ПДРФ-аналізу [3], з 2001 року ідентифікацію сортів та підтвердження відповідності клону вихідному сорту винограду здійснювали за мікросателітними маркерами [4].

Мікросателітний аналіз проводили переважно за 9-ма локусами (VVS2, ZAG62, ZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32), рекомендованими у європейських виноградарських країнах для ідентифікації сортів культури [5].

Детекцію ураження вірусами винограду здійснювали виділенням та аналізом дволанцюгової РНК (длРНК), а також молекулярною гібридизацією з радіоактивно та нерадіоактивно міченими длРНК зондами [6]. З 2008 року ідентифікацію збудників вірусних та фітоплазмових хвороб проводили за допомогою ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) [7].

Збудника бактеріального раку ідентифікували в період 1991–1999 років застосуванням уперше розробленого специфічного методу виявлення збудника хвороби *Agrobacterium tumefaciens (vitis)* шляхом гібридизації із радіоактивно міченим зондом — Т-ДНК Ті-плазмідом [8].

З 2008 року збудника бактеріального раку винограду ідентифікували методом ПЛР із специфічними праймерами *virD2* та *ipt* [7].

### **Результати та обговорення.**

#### **Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму винограду.**

Пріоритетні дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму були виконані колективом авторів під керівництвом академіка Ю. М. Си-

волапа та завідуючої центром клонової і фітосанітарної селекції винограду Інституту виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова, к. б. н. М. І. Тулаєвої.

Аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ДНК було досліджено генетичні та еволюційні відношення деяких видів, сортів та клонів винограду, визначено генетичні дистанції між формами, які аналізувалися, і побудовано діаграми їх взаємовідносин за окремими генетичними локусами. Зокрема, порівнянням генетичних дистанцій між клонами сорту Каберне Совіньйон селекції інституту INRA (Франція) та клонами 10–7-6 і 14–7-3 селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» було продемонстровано генетичну близькість досліджених клонів між собою та відносну віддаленість від вихідного сорту [3].

Оцінка внутрішньосортової мінливості підщепних сортів Ріпарія х Рупестріс 101–14 (*V. riparia* х *V. rupestris*) та Ріпарія Глуар де Монпельє (*V. riparia*) за допомогою ISSR-ПЛР показала наявність гетерогенності сортів та відповідність розподілу клонів сорту Ріпарія х Рупестріс 101–14 за морфологічними ознаками розподілу по ДНК-локусах.

Новий етап дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму винограду що передбачав використання полімеразної ланцюгової реакції, було розпочато М. І. Тулаєвою в 2007 році та продовжено під науковим керівництвом Н. А. Мулюкіної.

В. Р. Бочаровою було проведено роботу стосовно оцінки можливості диференціації клонів у межах сорту за мікросателітними маркерами [9].

Робота О. М. Карастан була сфокусована на дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму сортів селекції відділу селекції, генетики та ампелографії, аналізу їхнього походження та оцінці генетичного різноманіття ампелографічної колекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» [5, 10].

Результатом цього етапу вивчення актуальних проблем було створення бази алельного стану мікросателітних локусів майже 100 сортів селекції та сортів ампелографічної колекції нашого інституту.

На основі аналізу отриманих даних було виконано мікросателітний аналіз походження сортів та форм винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», виявлені батьківські форми сортів, отриманих шляхом запилення сумішшю пилку, реконструйовано генотипи сортів та форм, які було втрачено, або тих, що відсутні в ампелографічних колекціях України.

Уперше в Україні було застосовано метод маркер-супутнього добору за ознакою безнасіненності у винограду. У рамках цього дослідження на довільній виборці зразків винограду (15 безнасіневих сортів, 25 насінневих сортів, 23 гібридних сіянці) було проаналізовано поліморфізм інтрагенного мікросателітного маркера r3\_VVAGL11, зчепленого із проявом ознаки безнасіненності, та проведений маркер-супутній добір серед сіянців гібридної комбінації схрещування Кобзар х Русалка 3.

### **Детекція та ідентифікація збудників вірусних, бактеріальних та фітоплазмових хвороб винограду.**

Дослідження були виконані у 1991–2000 рр. під науковим керівництвом Ю. М. Сиволапа і доктора біологічних наук, завідуючого лабораторією вірусології та мікробіології Інституту виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова Б. Н. Мілкуса. Було розроблено пріоритетний метод специфічної діагностики збудника бактеріального раку винограду за допомогою молекулярної гібридизації з зондом — радіоактивно міченою Т-ДНК Ті-плазмиди збудника бактеріального раку винограду *Agrobacterium tumefaciens (vitis)*.

Таким чином було протестовано тисячі рослин клонів сортів винограду, які стали основою розмноження здорового садивного матеріалу у розсадниках України [8]. Це дозволило визначити санітарний стан біологічних категорій садивного матеріалу (вихідний, базовий та сертифікований) як такий, що контролюється на ураження збудником бактеріального раку.

З 2008 року діагностика збудника бактеріального раку винограду в лабораторії вірусології та мікробіології виконується методом полімеразної ланцюгової реакції [7]. Це дозволило оцінити ситуацію щодо санітарного стану стосовно ураження бактеріальним раком садивного матеріалу закордонного походження та виготовленого в Україні. Була показана необхідність ретельного санітарного контролю за обігом закордонного садивного матеріалу через високий рівень його ураження даною хворобою, оцінено ризики поширення інфекції в межах ділянок, на яких було виявлено початкові вогнища ураження цим небезпечним патогеном.

Щодо стану ураження садивного матеріалу вірусними хворобами колективом науковців Селекційно-генетичного інституту та Інституту виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова було запропоновано на перших етапах відбору матеріалу застосувати власний метод неспецифічного скринінгу на ураження вірусами. Спочатку такий скринінг виконувався на базі виділення та аналізу дволанцюгової РНК (роботу проведено спільно із співробітником відділу фітопатогенних вірусів Інституту мікробіології та вірусології НАН України, д. б. н. Д. П. Грамою).

На наступному етапі у відділі молекулярної генетики СГІ було розроблено метод молекулярної гібридизації із радіоактивно та нерадіоактивно міченими длРНК-зондами [6]. Обидва методи використано для попереднього тестування клонів сортів на латентне ураження вірусами, в разі виявлення вірусної інфекції для подальшої ідентифікації вірусів застосовували метод імуноферментного аналізу.

З 2008 року в лабораторії вірусології та мікробіології ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» для ідентифікації збудників вірусних та фітоплазмових хвороб винограду використовують ПЛР [7].

Ще одним напрямом застосування ДНК-технологій у дослідженнях став генетичний та санітарний контроль на етапах добору та отримання

безвірусного вихідного садивного матеріалу. Так, аналіз длРНК та молекулярна гібридизація були використані для оцінки санітарного стану матеріалу після хемо- та термотерапії, — а саме для підтвердження статусу «безвірусний» [11].

Аналіз мікросателітними маркерами використовували для оцінки генетичної однорідності матеріалу після проведення хемотерапії *in vitro* [12]. Виконані дослідження показали, що оздоровчі процедури, застосовані до сорту Каберне Совіньйон, не призвели до суттєвих генетичних змін матеріалу.

### **Висновки.**

1. Застосування ДНК-технологій в селекції винограду зумовило розробку методичних підходів до диференціації клонів у межах підщепних та прищепних сортів, виявлення походження ряду сортів селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» та використати елементи маркерної селекції у створенні безнасінневих сортів.

2. ДНК-технології як складова системи санітарного контролю у виробництві садивного матеріалу винограду європейської категорії «сертифікований» дали можливість провести широкомасштабний скринінг вихідного матеріалу на клоновій та генеративній основі на ураження вірусними, бактеріальними та фітоплазмовими хворобами, дослідити особливості поширення зазначених хвороб на виноградниках України і оцінити ризики їхнього природного розповсюдження.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Blaich R. The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grapevine cultivars / R. Blaich // Riv. viticult. e enol. — 1989. — 42, № 1. — P. 33–35.
2. Mossop D. W. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double-stranded RNA with grapevine affected by leaf-roll disease / D. W. Mossop, D. R. Elliott, K. D. Richards // New Zealand J. Agric. Res. — 1985. — 28. — P. 419–426.
3. Сиволап Ю. М. Анализ генетических дистанций ПДРФ у винограда / Ю. М. Сиволап, Т. Г. Вербицкая, М. И. Тулаева, И. А. Барышева // Цитология и генетика. — 1993. — № 6. — С. 24–29.
4. Барышева И. А. Исследование внутрисортной изменчивости ДНК винограда ПДРФ и ПЦР методами / И. А. Барышева, М. И. Тулаева, В. С. Чисников // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 6. — С. 31–38.
5. Карастан О. М. Мікросателітний аналіз походження сортів та форм винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» / О. М. Карастан, Н. А. Мулюкіна, Г. В. Плачинда, Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Б. Н. Милкус [та ін.] // Виноградарство і виноробство : міжв. тем. наук. зб. — Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2014. — Вип. 51. — С. 139–144.
6. Сиволап Ю. М. Применение меченой двуспиральной РНК для выявления вирусных заболеваний винограда / Ю. М. Сиволап, В. П. Петрашевич, Б. Н. Милкус, Н. А. Мулюкина, А. А. Русин // Биотехнология. — 1992. — № 6. — С. 55–58.

7. Сиволап Ю. М. Бактериальный рак и фитоплазменная инфекция винограда: диагностика, идентификация, меры борьбы / Ю. М. Сиволап, Б. Н. Милкус, В. В. Власов, И. В. Шевченко. — Одесса, 2008. — 22 с.
8. Сиволап Ю. М. Биотехнологический метод диагностики бактериального рака / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Б. Н. Милкус [и др.] // Биотехнология. — 1991. — № 5. — С.82–85.
9. Мулюкіна Н. А. Ідентифікація та паспортизація генотипів винограду за допомогою ДНК-маркерів / Н. А. Мулюкіна, В. Р. Бочарова, М. І. Тулаєва, І. А. Ковалева // Вісник Одеського національного університету. — Одеса, 2008. — С. 127–134.
10. Мулюкіна Н. А. Фенотипическая и генотипическая характеристика межвидовых сортов винограда Опаловый и Бурмунк для получения перспективных гибридных форм / Н. А. Мулюкина, И. А. Ковалева, Л. В. Герус [и др.] // Биологический журнал Армении. — 2014. — № 1 (66). — С. 103–106.
11. Мулюкіна Н. А. Прижилкова мозаїка та борознистіть деревини винограду: етіологія, діагностика та заходи боротьби : автореф. дис. ...к. б. н. / Н. А. Мулюкіна. — К., 2006. — 18 с.
12. Мулюкіна Н. А. Методи оздоровлення від вірусів винограду із застосуванням культури *in vitro* / Н. А. Мулюкіна, Н. М. Зеленянська, Д. Ю. Лосєва [та ін.] // Виноградарство і виноробство : міжв. наук. тем. зб. — Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2013. — Вип. 50. — С. 198–204.

Надійшла 19.06.2015.

UDC 683.581.167

**Vlasov V. V., Muljukina N. A., Tulaeva M. I., Kovaljova I. A., Chisnikov V. S., Konup L. O., Karastan O. M., Losjeva D. Ju.** NSC «Tairov Research Institute of Viticulture and Wine-Making»

#### **DNA-TECHNOLOGIES FOR GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) RESEARCHES IN NSC «TAIROV RESEARCH INSTITUTE OF VITICULTURE AND WINE-MAKING»: METHODOLOGICAL AND HISTORICAL ASPECTS**

A brief description of the main directions of DNA-technologies applying to grapevine (*Vitis vinifera* L.) researches at National Scientific Center «Tairov Research Institute of Viticulture and Enology» have been presented. The methodic basis and main results of grapevine molecular polymorphism investigation and grapevine virus, bacterial and phytoplasma diseases DNA-identification have been characterized.



УДК 683.581.167

**Власов В. В., Мулюкина Н. А., Тулаева М. И., Ковалева И. А.,  
Чисников В. С., Конуп Л. А., Карастан О. М., Лосева Д. Ю.**

**ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ ВИНОГРАДА (*Vitis vinifera* L.)  
В ННЦ «ИВИВ им. В. Е. ТАИРОВА»: МЕТОДИЧЕСКИЕ  
И ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Представлено краткое описание основных этапов применения ДНК-технологий в изучении сортов винограда (*Vitis vinifera* L.) различного назначения в ННЦ «ИВИВ им. В. Е. Таирова». Охарактеризована методическая база и основные полученные результаты на направлениях изучения молекулярно-генетического полиморфизма винограда и ДНК-идентификации вирусных, бактериальных и фитоплазменных болезней.

УДК 575.11.113:854.78

А. Є. СОЛОДЕНКО<sup>1</sup>, к. б. н., пров. наук. співроб.,

Г. Т. ГРЕВЦОВА<sup>2</sup>, д. б. н., головн. наук. співроб.,

Г. В. ДРАБИНЮК<sup>3</sup>, нач. від. науки та екоосвіти

<sup>1</sup>СГІ–НЦНС, Одеса

<sup>2</sup>Ботанічний сад ім. акад. О. В. Фоміна Київського нац. ун-ту ім. Т. Шевченка

<sup>3</sup>Національний природний парк «Бузький Гард»

e-mail: angelika\_solo@yahoo.com

## ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ КИЗИЛЬНИКІВ (*Cotoneaster sp.*) В УКРАЇНІ

*Молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму зразків Cotoneaster природних популяцій кизильників України проведено методом RAPD-аналізу. Виявлено відмінності між видами C. integerrimus і C. melanocarpus та генетичну близькість перехідних форм до C. integerrimus.*

Ключові слова: кизильник, RAPD-аналіз, філогенія, перехідні форми.

**Вступ.** Поліморфний рід *Cotoneaster* C. Bauhin (1623) у світовій флорі, за даними J. Phipps [1], представлений 264 таксонами. Ареал роду Кизильник знаходиться, в основному, в гірських районах Середньої Азії, Ірану, Афганістану, Індії, Монголії, Китаю. В Україні є його три види: *C. integerrimus* Medic. (к. цілокрай), *C. melanocarpus* Fisch. et Blytt (к. чорноплідний), *C. tauricus* Pojark (к. кримський). Останній росте в гірській частині Криму, є ендеміком, занесений до Європейського списку тварин і рослин, що знаходяться під загрозою зникнення у світовому масштабі. Перші два ростуть також у горах Криму, Карпат і досить часто зустрічаються на виходах гранітів Придніпровської, Приазовської височин, Донецького кряжу, а також у районах Закарпаття, Передкарпаття, рідше на північному заході лісостепової зони України. Еколого-ценотичними дослідженнями 2002–2008 рр. популяцій кизильників виявлено їх у флорі степової частини України *C. integerrimus*, який характерний лише для гірських місцевостей — Крим, Карпати [2]. Виявлені у місцях природного розповсюдження перехідні форми між *C. melanocarpus* і *C. integerrimus*, що відрізняються морфологічно — за формою листкової пластинки, її розмірами і, особливо, довжиною квітконіжки-плодоніжки, а також габітусом та екологією. Так, *C. melanocarpus* у степовій частині малопоширений, переважно у зволжених місцях та у північних експозиціях. А *C. integerrimus*, як виявилось, рослина більш ксерофітна, утворює перехідні форми з *C. melanocarpus*, які займають відповід-

ні екологічні ніші. Рослини, в яких переважають ознаки *C. integerrimus*, розташовуються в сухих, відкритих, сонячних місцях. Ті ж, у яких більше ознак *C. melanocarpus*, займають північні експозиції, більш глибокі улоговини, захищені від сонця з усіх боків скелями чи камінням або кронами дерев, чагарниками. Щільність розселення асоціацій залежить від антропогенного навантаження. Перегляд зразків у гербаріях Києва, Донецька, Дніпропетровська, Кривого Рогу, Харкова, Львова, Ужгорода засвідчив наявність як цих форм, так і *C. integerrimus*, які тут визначені як *C. melanocarpus*. І у вирішенні проблем філогенетичних взаємовідносин велике значення має застосування молекулярно-генетичних методів [3].

**З метою** виявлення подібності чи відмін між зазначеними таксонами та їхніми перехідними формами проведено дане молекулярно-генетичне дослідження.

**Матеріали та методи.** Матеріалом слугували ранньовесняні вегетативні пагони із молодими листочками, які ще не досягли нормальних розмірів, зрізані в природних популяціях регіонального ландшафтного парку «Гранітно-степове Побужжя» (сmt. Мигія, с. Курипчине Первомайського району Миколаївської області), гірського Криму (Чатирдаг), рівнинної частини України (Київська, Дніпропетровська, Кіровоградська області), заповідника «Медобори» (Тернопільська область), Карпат (гора Петрос).

ДНК вилучали з листя цетавлоновим методом. Ампліфікацію проводили на приладі «Терцик» (ДНК-технологія, Росія). Склад реактивної суміші: 50 мМ КСІ,

20 мМ тріс-НСІ (рН 8,4), 0,01 % Tween-20, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ кожного dNTP, 20–30 нг ДНК, 1 од. Taq-полімерази. Умови ампліфікації: початкова денатурація — 94 °С 2 хв, 30 циклів за наступними режимами: відпал 60 °С 30 с, елонгація 72 °С 30 с, денатурація 92 °С 30 с, остання елонгація 5 хв. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в денатуруючому поліакриламідному гелі (10 % акриламід, 7 М сечовина, 1 × тріс–боратний буфер) за 500 V протягом 120 хв. Фарбували азотнокислим сріблом. Документували отримані електрофореграми відеосистемою VDS (Pharmacia Biotech, США).

**Результати досліджень та обговорення.** Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму п'яти зразків кизильника, зібраних у природних популяціях регіонального ландшафтного парку «Гранітно-степове Побужжя», використано полілокусний RAPD-аналіз із залученням 12 праймерів довільної нуклеотидної послідовності [4]. У цілому досліджено 163 локуси геному кизильника, з яких 55 виявилися поліморфними.

На рисунку 1 наведено спектри довільно ампліфікованої ДНК досліджених генотипів кизильника. Виявлено генотипоспецифічні продукти ампліфікації за праймерами P 2, R 86, P57, A 02, P 39, R 100, P 37.

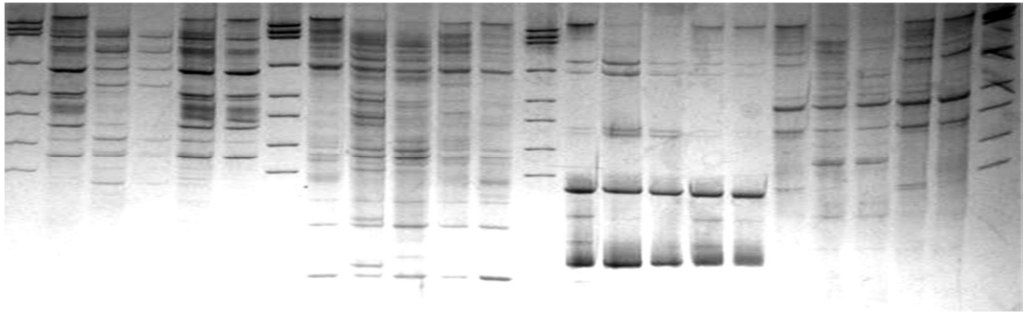


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків кизильника з праймерами С 20(А), Р 2(Б), R 86(В), Р 32(Г). М — маркер молекулярної маси ρGEM

Із використанням комп'ютерної програми MEGA визначено генетичні відстані між проаналізованими зразками та отримано схему, що відбиває їхню генетичну спорідненість (рис. 2).

Зразки згруповано в два кластери, один з яких містить генотипи «2а», «90» та «60», інший — «3а» та «10». Генетичні відстані між зразками з різних кластерів майже удвоє перевищують ті, що виявлено між зразками в межах кластерів. Найбільш генетично близькими виявились генотипи «2а» та «90».

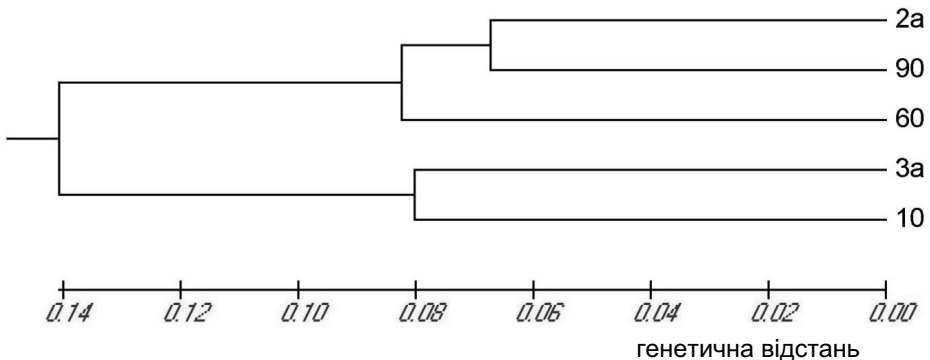


Рис. 2. Схема, що відбиває генетичні взаємовідносини між дослідженими зразками кизильника, зібраними в природних популяціях регіонального ландшафтного парку «Гранітно-степове Побужжя»

Перевівши зразки, зазначені під номерами «2а», «3а», «10», «60», «90», у таксономічний ряд, можемо констатувати присутність у степовій частині України *C. integerrimus* («60»), який генетично перебуває на значній відстані від *C. melanocarpus* («3а» і «10»). Перехідні форми *C. melanocarpus* × *C. integerrimus* («2а») та *C. integerrimus* × *C. melanocarpus* («90») є генетично близькими і мають більшу частину ознак від *C. integerrimus* («60»), утворюючи один кластер. Дані RAPD-аналізу дозво-

ляють стверджувати про наявність перехідних форм і виділяти їх у окремі таксони.

Молекулярно-генетичне дослідження зразків кизильників з різних регіонів України [5] дозволило виявити, що перехідні форми *C. melanocarpus* x

*C. integerrimus* і *C. integerrimus* x *C. melanocarpus* із різних місць Тернопільської області (м. Кременець та заповідник «Медобори») утворюють один кластер і є генетично більш близькими до зразка виду *C. integerrimus* з Карпатської гори Петрос, ніж до зразка виду *C. melanocarpus* з м. Кременець (рис. 3). Разом з тим, усі зразки із Карпат та Прикарпаття («12», «13», «15», «16») виявились генетично доволі близькими. Найбільш відрізнявся один із зразків виду *C. integerrimus* з Миколаївської області («02»), який утворив окремий кластер. Отримані результати показали, що вивчення поліморфізму ДНК зразків роду *Cotoneaster* потрібно продовжувати, наявний фактичний матеріал є основою подальших досліджень у цьому напрямі.

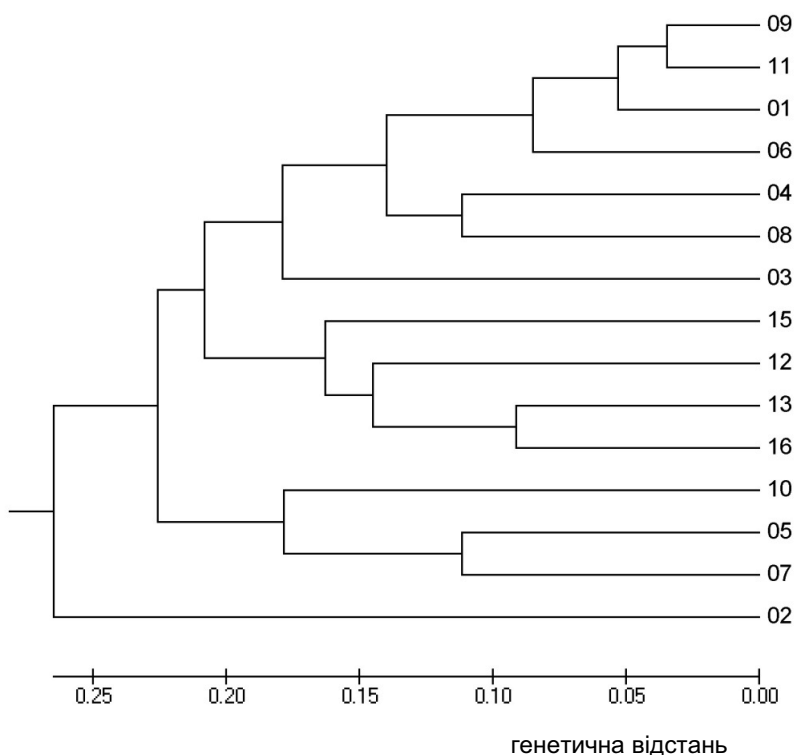


Рис. 3. Схема, що відбиває генетичні взаємовідносини між дослідженими зразками кизильника із різних регіонів України

**Висновки.** Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму природних популяцій кизильників різних регіонів України виявило генетичну близькість перехідних форм *C. melanocarpus* x *C. integerrimus* і *C. integerrimus* x *C. melanocarpus* до виду *C. integerrimus*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Phipps J. A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae) / J. Phipps // *Canadian Journal of Botany*. — 1990. — Vol. 68. — P. 2209–2269.
2. Гревцова Г. Кизильники гранітно-степового Побужжя / Г. Гревцова, В. Колесник // *Екологія. Біологічні науки* : зб. наук. праць Полтавського державного педагогічного університету ім. В. Г. Короленка. — Полтава, 2003. — Вип. 4 (31). — С. 54–61.
3. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : Научно-методическое руководство / под ред. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграрна наука, 1998. — С. 9.
4. Гревцова Г. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму кизильника регіонального ландшафтного парку «Гранітно-степове Побужжя» / Г. Гревцова, А. Солоденко, Ю. Сиволап, Г. Драбинюк // *Вісник КНУ. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття*. — К., 2009. — Вип. 25–27. — С. 42–45.
5. Гревцова Г. Т. Сучасний стан популяцій кизильників в умовах *in situ* в Україні / Г. Т. Гревцова, Г. В. Драбинюк, М. С. Кубінський, А. Є. Солоденко, І. С. Михайлова // *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*, № 1100, серія «Біологія». — Харків, 2014. — Вип. 20. — С. 250–257.

Надійшла 25.05.2015.

UDC 575.11.113:854.78

**Solodenko A. Ye., Grevtsova G. T., Drabinyuk G. V.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**MOLECULAR-GENETIC POLYMORPHISM INVESTIGATION OF NATURAL POPULATIONS OF COTONEASTER (*Cotoneaster* sp.) IN UKRAINE**

Molecular-genetic investigation of polymorphism of natural populations *Cotoneaster* accessions in Ukraine was carried out. The differences between *C. integerrimus* and *C. melanocarpus* and genetic relationship their transitional forms to *C. integerrimus* were established.

УДК 575.11.113:854.78

**Солоденко А. Е., Гревцова Г. Т., Драбинюк Г. В.**

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
ПОЛИМОРФИЗМА ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КИЗИЛЬНИКОВ  
(*Cotoneaster sp.*) В УКРАИНЕ**

Молекулярно-генетическое исследование полиморфизма образцов *Cotoneaster* природных популяций кизильников Украины проведено методом RAPD-анализа. Выявлены различия между видами *C. integerrimus* и *C. melanocarpus* и генетическая близость переходных форм к *C. integerrimus*.

## БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 57.085.2:633.111:633.16

О. Л. ШЕСТОПАЛ, к. б. н., ст. наук. співроб.,  
С. О. ІГНАТОВА, д. б. н., проф., зав. лаб.,  
І. С. ЗАМБРІБОРЩ, к. б. н., ст. наук. співроб.,  
Г. А. ЗЕЛЕНІНА, к. б. н., зав. від.  
СГІ-НЦНС, Одеса  
e-mail: ignatova\_sa@mail.ru

### МЕТОДИ КУЛЬТУРИ *IN VITRO* ДЛЯ СУЧАСНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.) ТА ЯЧМЕНЮ (*Hordeum vulgare* L.)

*Подаються результати біотехнологічних розробок на основі культивування in vitro тканин і органів пшениці та ячменю. Висвітлено можливості застосування методів in vitro для отримання вихідного селекційного матеріалу. Визначено умови для прискороного створення стійкого до патогенів гомозиготного матеріалу пшениці та ячменю за поєднання гаплоїдної технології та селекції in vitro.*

Ключові слова: пшениця м'яка, ячмінь, андрогенез *in vitro*, віддалені гібриди, селекція *in vitro*.

**Вступ.** На початку XXI століття в світі триває інтенсивний розвиток різних напрямів біотехнології для прискороного вирішення питань селекції та генетики економічно цінних культур [1–3]. Насамперед, для одержання нового константного генетичного матеріалу рослин, що відрізняється високою продуктивністю й стійкістю до несприятливих біотичних та абіотичних факторів довкілля. Виходячи з наукової та практичної важливості розвитку біотехнологічних досліджень, на основі методів культивування клітин, тканин і органів рослин *in vitro* з метою використання їх у селекції та генетиці зернових культур, у різних країнах визначились наступні напрями дослідницької роботи:

1) одержання гаплоїдів з мікроспор, яйцеклітин і на основі гаплопродюсерів у господарськоцінних культур з метою прискороного створення гомозиготних ліній із різних гібридних популяцій;

2) зниження бар'єрів несумісності при гібридизації таксономічно віддалених батьківських форм у прогамній та постгамній фазі для збереження життєздатності гібридних зародків із застосуванням техніки ембріокультури або «*embryo-rescue*»;

3) виділення з клітинних популяцій за допомогою селекції *in vitro* ліній рослин з високою експресією необхідних для селекції ознак або властивостей;



4) розширення генетичної мінливості в клітинних популяціях рослин на основі соматоклональної мінливості та/або індукованого мутагенезу з метою одержання нових цінних ознак;

5) одержання генетично модифікованих форм рослин використанням прийомів генетичної трансформації для введення рекомбінантних молекул ДНК або їхніх фрагментів у матеріал реципієнтів з наступним одержанням фертильних рослин з вбудованими генами господарсько-цінних ознак.

Виходячи з нагальних інтересів селекції цінних злаків у позначених напрямках біотехнології рослин, у лабораторії культури тканин СГІ дослідження виконувались за різними науково-теоретичними програмами у наступних напрямках: **1** — збільшення ефективності гаплоїдних технологій, що застосовуються для одержання лінійного матеріалу з гібридних комбінацій селекційних форм економічно важливих для України с.-г. культур — пшениці і ячменю; **2** — розробка систем *in vitro* для одержання нових гібридних форм цих же культур від віддалених схрещувань із близькими й далекими родичами з наступним переведенням їх на гомозиготний рівень; **3** — створення ефективних систем *in vitro* для розширення генетичної мінливості в клітинних популяціях пшениці та ячменю на основі соматоклональної мінливості та/або індукованого мутагенезу, а також для одержання матеріалу даних культур зі стійкістю до грибних патогенів та посухи.

**Матеріал і методи.** Дослідження проводились у лабораторії культури тканин СГІ–НЦНС. Матеріал досліджень: 120 генотипів (сорти й гібриди) пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та 27 генотипів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) вітчизняної та зарубіжної селекції, багатолітня дикоросла форма *Hordeum bulbosum* L. ( $2n=28$ ), яра форма *Hordeum spontaneum*, лінії ярого ячменю, що різнилися за стійкістю до борошнистої роси — *Erysiphe graminis* DC. f. sp. hordei Marschal.

Як експлант використовували ізольовані зрілі та незрілі зародки, калус із незрілих зародків, пиляки м'якої пшениці та ячменю. Як селективний фактор у біотехнологічних системах селекції *in vitro* застосовували фільтрат культуральної рідини (ФКР) гриба *F. graminearum* сильно- (56) та слабкопатогенного (*ab*) штамів, люб'язно наданих відділом фітопатології та ентомології СГІ–НЦНС.

Для отримання подвоєних гаплоїдів пшениці із гібридів застосовували, в основному, метод культури *in vitro* ізольованих пиляків пшениці [4]. Для цього пиляки пшениці в стадії сильновакуолізованої мікроспори після тридобової холодової обробки (2–4 °C) у розчині АБК (0,5 мг/л) висаджували на поживне середовище 190–2 у модифікації [5], після чого витримували три доби в темряві при 30 °C, а потім у термостаті при 24 °C до формування на пиляках новоутворень. Такі макроструктури культивували в темряві до появи на них центрів меристематизації на живильному середовищі MS у модифікації: 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л кінетину,

по 200 мг/л проліну та глутаміну. Сформовані регенеранти культивували при 24 °С та фотоперіоді 16 год. при інтенсивності освітлення 3–3,5 тис. люкс на безгормональному середовищі MS. Регенеранти подвоєних гаплоїдів пшениці яровізували та дорощували в умовах штучного клімату. Для визначення життєздатності гаплоїдних мікроспор у пиляках на 10-ту та 15-ту добу культивування користувалися цитологічним аналізом давлених оцтокармінових препаратів пиляків. Відсоток морфогенних пиляків, новоутворень і регенерації рослин для кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків.

Для подолання постгамної несумісності при одержанні нових гібридних форм пшениці та ячменю шляхом віддалених схрещувань застосовували комплекс прийомів та систем *in vitro*, впроваджених науковцями лабораторії [6].

Для розробки технології оцінки *in vitro* стійкості зразків пшениці до фузаріозу колоса застосовували методи селекції *in vitro* з використанням соматичних експлантів у присутності ФКР — в культурі ізольованих зрілих зародків та культурі калусів з незрілих зародків на стандартних поживних середовищах S MS та MS із додаванням 2 мг/л 2,4-Д відповідно [7].

Оцінку отриманих даних проводили за методами статистичних досліджень і дисперсійного аналізу [8, 9].

**Результати та обговорення.** Серед біотехнологій, що спираються на клітинні культури, спрямовані на поліпшення злаків та прискорене створення перспективного генетичного матеріалу, найбільш затребуваними селекцією в останнє десятиліття, є гаплоїдні технології, які інтенсивно розвиваються в різних країнах. Виявлено, що для м'якої пшениці з двох методів гаплопродукції на основі *in vitro* технологій (віддаленої гібридизації з гаплопродюсером [10] і методу культивування пиляків [11]) останній є більш результативним [3], що було багаторазово продемонстровано у різних країнах створенням лінійних високопродуктивних сортів м'якої пшениці [3, 12–14].

Для м'якої пшениці найбільш результативним методом гаплопродукції є культивування пиляків, заснований на здатності мікроспор розвиватися за спорофітним шляхом. Інтерес дослідників привертає пошук шляхів збільшення ефективності даного методу. Результативність підвищується за рахунок оптимізації умов попередньої обробки колосся, умов культивування та використання в якості донорів пиляків генетично різноманітного матеріалу, що важливо для різнопланових селекційних програм. В лабораторії культури тканин СГІ з метою підвищення виходу дигаплоїдів м'якої пшениці був розроблений комплекс умов, який включає добір донорного матеріалу для роботи в умовах *in vitro*, попередню обробку пагонів з колоссям (температурну й гормональну), модифікацію живильних середовищ для культивування пиляків, новоутворень і регенерантів [15–19].

У результаті проведених досліджень у сортів, ліній та гібридів пшениці м'якої озимої в пиляках, що культивували, на різних етапах морфогенезу виявлено генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор з відмінностями за частотою індукції процесів калусогенезу, ембріодогенезу й формуванням ембріонально-клітинних комплексів, які надалі проявляли різну здатність до регенерації рослин. Так, серед досліджених 109 генотипів пшениці м'якої озимої діапазон варіювання показників гаплопродукції був доволі широким і становив за показником «формування новоутворень» у сортів від 0 до 36,%, у гібридів — від 0 до 38,8 %; а за показником «регенерації зелених рослин» у сортів від 0 до 9,5 %, у гібридів — від 0 до 9,1 %.

Усі досліджувані генотипи були розподілені на 5 груп у залежності від ступеня їхньої чутливості до андрогенезу *in vitro*: I — нечутливі генотипи (0), II — низькочутливі, у яких відсоток формування новоутворень та регенерації зелених рослин був у межах від 0 до 1 ( $0 < x < 1$ ), III — середньочутливі, зі значеннями показників гаплопродукції від 1 до 3 % ( $1 < x < 3$ ), IV (від 3 до 5 %) та V (більше 5 %) — високочутливі (рис. 1, 2). Дані на рисунках представлені як частка (у відсотках) генотипів, що за показниками гаплопродукції відносяться до тої чи іншої групи, стосовно загальної кількості досліджених генотипів (для сортів —  $n=35$ , для гібридів —  $n=74$ ).

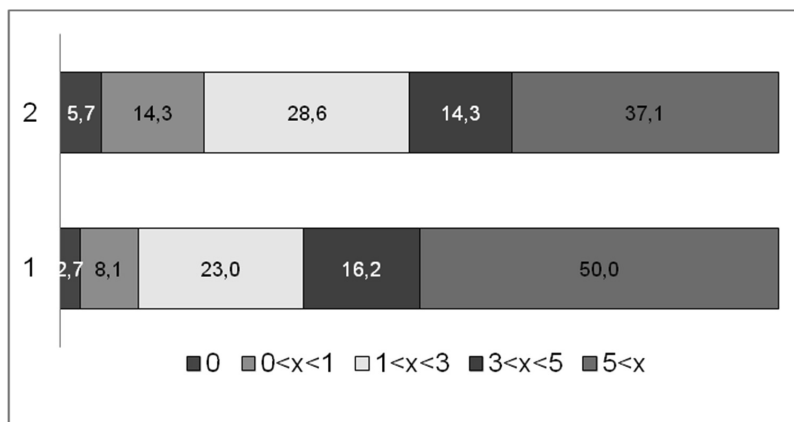


Рис. 1. Розподіл генотипів пшениці м'якої озимої за показником «формування новоутворень» у культурі пиляків *in vitro*: 1 — гібриди, 2 — сорти

Аналізом отриманих даних виявлено, що гібридні генотипи мають більший гаплопродукційний потенціал, ніж сорти. Максимальними показниками гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків вирізнявся гібрид між сортом Кавказ (має в геномі пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS) та лінією пшениці, що несе модифіковану (без ділянки ДНК, що кодує білки секаліни) пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS — 38,8 % для новоутворень та 9,1 % для зелених регенерантів. Серед сортів високими показниками регенерації характеризувались Куяльник (9,4 %), Лютестенс 155 (2,89 %) та Щедрість одеська (3,23 %). Ці три сорти можуть слугувати генетичними джерелами для підвищення гаплопродукційної

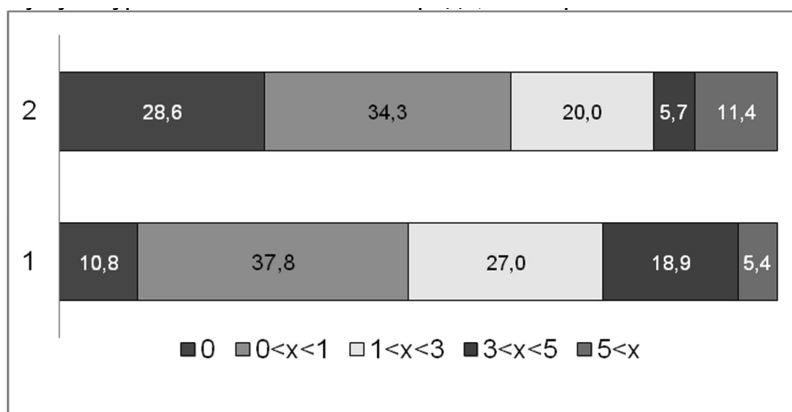


Рис. 2. Розподіл генотипів пшениці м'якої озимої за показником «регенерація зелених рослин» у культурі пиляків *in vitro*: 1 — гібриди, 2 — сорти

здатності у цінних селекційних форм із низьким рівнем даної ознаки або за її відсутності [15–20].

Аналіз та узагальнення результатів багаторічних досліджень щодо шляхів підвищення ефективності гаплопродукції генотипів у даній системі *in vitro* дозволив виявити наступні методичні нюанси, які рекомендовано нами для використання в практичній роботі з селекційним матеріалом:

- добирати для роботи зразки пшениці з найкоротшим періодом «сходи — вакуолізована мікроспора», починати добір зразка з 1-го пагона, що вийшов з вузла кущіння донорної рослини, коли мікроспори в пиляках, переважно перебувають у середньопізній фазі розвитку [21];

- використовувати для роботи *in vitro*, в основному, пиляки із середньої частини колоса донорної рослини;

- використовувати в культурі пиляків як донорний матеріал зразки пшениці з низькою фотоперіодичною чутливістю, з коротким періодом тривалості яровизації, оскільки вони характеризуються підвищеним рівнем формування новоутворень та регенерації з них зелених рослин [2, 5];

- оптимізувати параметри та умови проходження індукційного етапу гаплопродукції в ізольованих пиляках, що дозволяє підвищити ефективність цієї системи за рахунок зростання рівня регенерації новоутворень у 1,5–2 рази, залежно від генотипу-донора пшениці [19, 22].

За результатами багаторічних досліджень зроблено висновок щодо відтворюваності результатів роботи за даною системою *in vitro*, а можливості й продуктивність її дозволяють широко використовувати в селекції пшениці м'якої озимої. За період з 2011 по 2015 рр. селекційним відділам СГІ передано 565 ліній пшениці м'якої.

В аспекті підвищення ефективності біотехнологічної системи одержання подвоєних гаплоїдів ячменю зроблено наступні висновки. У пиляках дослідженого матеріалу ярого ячменю (сорти, гібридні комбінації та лінії), які культивують, виявлено високий рівень генотипоспецифічності за проявом морфогенетичних реакцій на етапі індукції новоутворень.

Більшість сортів ячменю перебувало в групі з низькою здатністю до гаплопродукції, але при цьому всі гібриди, використані в роботі, значно перевершували батьківські сорти за частотою формування новоутворень. Було визначено, що чим менший часовий інтервал між проростанням насіння і виходом (розгортанням) флагового листа вегетуючих рослин, тим вища частота індукції новоутворень у культурі пиляків [23], що співпадає з результатами, отриманими в культурі пиляків пшениці м'якої.

Тестування колекції посухостійких форм ярого ячменю (Адапт, Сталкер, Галатя, Південний, Одеський 100 — сорти селекції СГІ; Мішке — сорт чеської селекції; Candle, Mac Guire — сорти канадської селекції; гібридів Сталкер х Mac Guire, Сталкер х Candle) за здатністю до андрогенезу *in vitro* дозволило оцінити їх морфогенетичний потенціал у культурі пиляків (табл. 1).

Виявилось, що досліджені генотипи значно різнились як за здатністю до індукції новоутворень, так і за рівнем регенерації рослин у культурі *in vitro*. Виділили генотипи з високою частотою новоутворень — сорти Одеський 100 та Південний; з високою регенераційною здатністю — Мішке та Адапт, які рекомендується використовувати як генетичне джерело для підвищення виходу зелених рослин, так і в цілому — здатності до гаплопродукції [24].

Таблиця 1

Ефективність андрогенезу *in vitro* посухостійких генотипів ячменю

Генотип	Морфогенетичний потенціал*		
	частота новоутворень, %	регенераційний потенціал	
		рослини-регенеранти, шт. (%)	зелені рослини, шт. (%)
Адапт	14,2	29 (7,8 %)	3 (5,7 %)
Галатя	46,6	3 (2,6 %)	0
Південний	76,9	16 (7,2 %)	4 (1,8 %)
Одеський 100	83,4	32 (8,4 %)	8 (0,4 %)
Мішке	40,7	21 (30,9 %)	1 (1,5 %)
Од. 100 х Мішке	80,6	67 (10,2 %)	10 (1,0 %)
Мішке х Од. 100	62,5	20 (2,3 %)	2 (0,3 %)
Сталкер	6,0	0	0
Candle	59,3	17 (3,8 %)	6 (1,3 %)
Mac Guire	22,3	26 (6,7 %)	0
Сталкер х Mac Guire	36,7	56 (36,9 %)	0
Сталкер х Candle	42,2	38 (20,8 %)	6 (3,3 %)

Примітка: \* — морфогенетичний потенціал оцінювали за кількістю пиляків з новоутвореннями (у відсотках від числа пиляків, висаджених на середовище) і кількістю рослин-регенерантів (у відсотках від числа отриманих новоутворень)

Важливим розділом роботи з поліпшення окремих і комплексних ознак цінних культурних видів рослин, що привертають широку увагу генетиків і селекціонерів, є віддалена гібридизація культурних форм із

близькими й далекими родичами — це є основою одержання інтрогресивних форм і широко використовується в селекційно-генетичній роботі зі злаками. Сучасні сорти пшениці та ячменю мають високу екологічну пластичність і здатні значною мірою реалізовувати свій потенціал врожайності, однак проблема стійкості до біотичних та абіотичних факторів обмежує можливості одержання високих урожаїв. Одним з напрямів її вирішення — є залучення у схрещування стійких дикорослих співродичів. Серед останніх для пшениці привертають увагу різні форми *Aegilops*, які є джерелом комплексної стійкості для цілої низки біотичних та абіотичних чинників.

У нашій роботі [2, 25–27] при одержанні віддалених гібридів пшениці м'якої різних сортів із *Aegilops tauschii* Coos (форма Ts k 608 із колекції ВІР), яким властива стійкість до комплексу абіотичних факторів, застосовано ряд прийомів для подолання прогамної несумісності: обробка квіток розчином гіберелової кислоти та кінетину в концентрації 7 г/л через 45 хв після запилення, з повтором через добу; на 10–14 добу після запилення колосся із зернівками зрізали й поміщали у розчин фізіологічно-активних речовин та мінеральних солей за прописом MS на 2–3 доби; виділення зародків з гібридних зернівок й висадка їх на живильне середовище до одержання проростків. Отримані гібридні рослини на стадії 3–5 листків диплоїдизували 0,15 % колхіцином в 4 % ДМСО й дорощували рослини до одержання насіння. Рівень зав'язування зародків у комбінаціях з різними генотипами коливався від 0 до 21 %, а їхнє проростання в запропонованих умовах *in vitro* було різне. У цьому зв'язку проводили дослідження з оптимізації складу живильного середовища для зародків різного строку формування. Виявлені кращі варіанти для регенерації рослин незалежно від віку — це середовище ГБ 5, доповнене 1–1,5 мг/л 2,4-Д, і середовище Уайта із сахарозою й дріжджовим екстрактом. У цих експериментах отримані рослини-регенеранти, з яких п'ять стали константними лініями й передані для подальшого вивчення.

Для ячменю перспективними в цьому напрямі є яра форма *Hordeum spontaneum*, яка, за даними ВІРу, характеризується комплексною жаро-і посухостійкістю та стійкістю до гельмінтоспоріозу й борошнистої роси, та *Hordeum bulbosum*, що є джерелом морозостійкості і стійкості до грибних хвороб (Walther et al., 2000). Однак одержання віддалених гібридів на його основі пов'язане із проблемами несумісності й загибеллю гібридних зародків у зернівках на різних етапах розвитку *in vivo* і після виділення у процесі росту *in vitro*. У цьому зв'язку розроблено [28, 29] біотехнологічну систему для одержання гібридних рослин від схрещувань *Hordeum vulgare* ( $2n=14$ ) x *Hordeum bulbosum* ( $2n=28$ ). Підібрано оптимальні строки висіву обох видів для подальшої гібридизації. Результативнішим із зав'язування зернівок при схрещуваннях був клон *Hordeum bulbosum*, який характеризувався відсотком зав'язування з ярами сортами 29,2 %, а з гібридними формами — до 57,3 %. Виявлено, що для зняття про-

гамної несумісності в даних комбінаціях, необхідно застосовувати прийом запилення охолодженим пилюком, що підвищувало (щодо контролю) зав'язування гібридних зернівок залежно від комбінації 124,1–172,2 %, а кількість одержаних рослин становила 136,4–170,0 %. Гібридні зародки з розмірами 2,3–4,2 мм виявились кращими для культивування й подальшого виходу рослин. Живильне середовище MS з додаванням 2,4-Д і кінетин сприяло підвищенню регенерації рослин в умовах *in vitro* через калусогенез. У цій роботі від схрещувань із озимими формами ячменю отримано 52 рослини, а з ярими — 80 рослин. З окремих комбінацій схрещувань було отримано константні лінії, які передано селекціонерам для подальшого вивчення.

Проведено роботу з вивчення ефективності віддалених схрещувань 20 комбінацій схрещувань 10 різних гібридних генотипів культурного ячменю з 7 дикими формами *H. spontaneum* [30, 31]. Відсоток отриманих при цьому гібридних зернівок у різних комбінаціях коливався від 25 до 68,8. Кращими за результатами цих схрещувань виявились форми *H. spontaneum* — T13 (Nevaycar) та IS 26–2, у гібридах з їхньою участю сформувалось 83,3 % зернівок. При використанні гібридів ( $F_1$ ) від схрещування сортів Одеський 100 × Вакула зав'язування зернівок коливалось в межах 75,0–81,2 %. В основному спостерігали утворення життєздатних зернівок з диплоїдним набором хромосом  $2n=14$ , порушень у мітозі в клітинах меристеми корінців не виявлено, рослини добре кущилися на відміну від вихідних батьківських форм.

З метою стабілізації отриманого гібридного матеріалу вивчали чутливість віддалених гібридів ячменю до андрогенезу *in vitro*. Досліджували десять родин  $F_1$ – $F_4$  від трьох комбінацій схрещування *H. vulgare* × *H. spontaneum*, серед яких п'ять дібрані в другому поколінні за ознакою «неламке колосся». Аналіз результатів показав, що усі гібридні популяції виявились чутливими до умов культивування ізольованих пиляків *in vitro*, формуючи новоутворення, які регенерували зелені рослини, що дає змогу застосовувати метод культивування ізольованих пиляків *in vitro* для гомозиготації віддалених гібридів. Усього з популяцій віддалених гібридів отримано 82 лінії подвоєних гаплоїдів: 8 — з популяції  $F_2$  ДГ-2 × *H. spontaneum* IS 26–2; 5 — з популяції  $F_1$  (Од.100 × Вакула) × *H. spontaneum* IS 26–2; 1 — з популяції  $F_2$  ДГ-3 × *H. spontaneum* IS 26–2; 7 — з популяції  $F_4$  ДГ-3 × *H. spontaneum* IS 26–2; 33 — з популяції  $F_2$  (Одеський 100 × Вакула) × *H. spontaneum* IS 26–2; 20 — з популяції  $F_3$  (Одеський 100 × Вакула) × *H. spontaneum* IS 26–2; 8 — з популяції  $F_4$  (Одеський 100 × Вакула) × *H. spontaneum* IS 26–2 [32].

Одже, віддалені гібриди є чутливими до умов культивування ізольованих пиляків. Це відкриває реальну перспективу для гомозиготації гібридів, створених із залученням *H. spontaneum* як джерела посухостійкості на ранніх етапах селекції ячменю. Отримані позитивні результати з розробки й модифікації біотехнологічних прийомів створення віддалених

гібридів на основі пшениці м'якої та ячменю підтверджують перспективність, важливість і необхідність подальшого розвитку цього експериментального напрямку.

Третій аспект дослідницької роботи лабораторії культури тканин, яка перебуває в цей час в активному розвитку, — це розробка прийомів і побудова методичної бази для відпрацювання біотехнології селекції *in vitro* з метою прогнозування стійкості до грибних патогенів у пшениці й ячменю та добору перспективних форм. Сьогодні головним завданням цього напрямку є вивчення морфогенетичних характеристик різних експлантів досліджуваних видів в умовах *in vitro* за впливу селективних факторів. На першому етапі необхідним є добір їх сублетальних концентрацій і проведення на цій основі експериментів з культивування експлантів модельних генотипів з відомою фітопатологічною оцінкою стійкості до грибних патогенів і уточнення параметрів, за якими можна визначати толерантність експлантів, співмірну зі стійкістю генотипів до патогена. Так, зокрема, на пшениці м'якій для досліджень в обраному напрямі були дібрані два штами гриба *Fusarium graminearum* — 56 і *ab*, що культивуються на живильному середовищі Чапека для одержання фільтрату культуральної рідини (ФКР). Використання ФКР штаму *ab* в 30 і 50 % концентраціях, як селективного агента на рівні насіння та ізольованих зародків модельних сортів-тестерів (з різною фітопатологічною оцінкою стійкості до патогена), дозволило визначити параметри життєздатності досліджуваного матеріалу пшениці м'якої для тестування на толерантність до ФКР з метою прогнозування рівня стійкості зразків. Виявлено можливість використання для цього показників індукції калусогенезу в культурі *in vitro* незрілих зародків. Для вибракування нестійких до патогена генотипів на рівні регенерації рослин із соматичних експлантів може бути використана 50 % концентрація ФКР обох штамів гриба. У результаті проведених експериментів запропонована система *in vitro*, що дозволяє на фоні фільтратів ФКР гриба *Fusarium graminearum* двох штамів проводити поетапний добір толерантних експлантів пшениці м'якої до фузаріозу колосся, рівень толерантності яких, значною мірою відповідає рівню стійкості досліджуваної популяції пшениці до фузаріозу [33–35].

Останнім етапом процесу селекції *in vitro* форм пшениці, стійких до фузаріозу, є отримання гомозиготних ліній. Створюючи селективний тиск на гетерогенну популяцію мікроспор, теоретично можливо цілеспрямовано добирати найбільш толерантні, здатні до морфогенезу мікроспори та отримувати толерантні рослини-регенеранти. В експерименті на селективні живильні середовища з ФКР *F. Graminearum* штамів 56 і *ab* (15 і 30 %) висадили пиляки чотирьох сортів та рослин п'яти гібридних комбінацій, одержаних від схрещувань пшениці м'якої з *Aegilops cylindrica*. Під впливом ФКР обох штамів *F. graminearum* достовірно зменшувалась кількість новоутворень на первинному живильному середовищі, тоді як збільшувався відсоток морфогенного калусу, здатного до регенерації



рослин у культурі пиляків у всіх досліджуваних сортів. Регенерація зелених рослин у стійкого сорту спостерігалась майже на всіх селективних живильних середовищах, у середньостійких сортів зелені рослини отримали лише на середовищах з низькою концентрацією ФКР обох штамів, у сприйнятливого сорту в присутності ФКР не отримано жодної зеленої рослини. Ефективність біотехнології створення стійких до захворювання гомозиготних форм із гібридів пшениці в культурі пиляків залежить від селективної здатності використовуваних ФКР і генотипу-донора експлантів пшениці (високоандроногенної материнської форми та високостійкого до захворювання батьківського гібрида). Всього отримано шляхом андрогенезу *in vitro* 144 лінії подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої озимої із гібридів, створених у відділах СГІ [36].

Дослідників ячменю в аспекті селекції *in vitro*, має зацікавити проведена в лабораторії розробка [37, 38] з підвищення ефективності гаплопродукційної системи на основі культури пиляків з метою застосування її в роботі зі створення гомозиготного лінійного матеріалу, стійкого до борошнистої роси (*Erysiphe graminis DC f.sp.hordei*). Було визначено, що стійкі до цього патогена сорти ячменю мають дуже низьку здатність до регенерації зелених рослин (0–1,1 %) у культурі пиляків. Використання в якості генетичного джерела сорту Одеський 100 для підвищення виходу зелених регенерантів з гібридних форм дозволило одержати три лінії нового генетичного матеріалу зі стійкістю, що перевищує її рівень у вихідних форм.

**Висновки.** Розроблено біотехнологію створення нових вихідних форм ячменю та пшениці з використанням культури пиляків *in vitro*, віддаленої гібридизації, ембріокультури та селекції *in vitro*.

На основі виявлених закономірностей процесів індукції новоутворень у культурі пиляків *in vitro* та їхньої регенерації запропоновано умови попередньої обробки донорних рослин пшениці та ячменю, модифіковано живильні середовища та умови культивування новоутворень, що дозволило удосконалити технологію одержання лінійного матеріалу.

Отримані позитивні результати з розробки й модифікації біотехнологічних прийомів при одержанні віддалених гібридів пшениці м'якої та ячменю.

Оцінку *in vitro* стійкості до фузаріозу колоса рекомендовано проводити з застосуванням культури ізольованих зрілих зародків пшениці за дії ФКР *F. graminearum* штаму *ab* в концентрації 15 %. Для створення в культурі пиляків шляхом андрогенезу *in vitro* гомозиготних форм пшениці із стійкістю до фузаріозу колоса ефективним є використання як донорного матеріалу гібридів пшениці за схрещування: ♀ (чутлива до андрогенезу *in vitro* форма) × ♂ (стійка до *F. graminearum* форма пшениці), як селективного фактора — модифікованих ФКР слабкопатогенного штаму *ab* у концентрації 5 %.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Thomas W. T., Forster B. P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding / W. T. Thomas, B. P. Forster, B. Gertsson // *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publ. — 2003. — P. 337–350.
2. Игнатова С. А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro* : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20/ УААН. Никитский ботанический сад / С. А. Игнатова. — Ялта, 2004. — 45 с.
3. Дьячук Т. И. Роль метода гаплоидии в создании исходного материала для селекции зерновых культур в НИИСХ Юго-Востока / Т. И. Дьячук, С. В. Столярова, О. В. Хомякова, А. В. Колдырева, Ю. В. Итальянская, Н. Ф. Сафронова, Л. П. Медведева // *Зб.: Геном рослин*. — Одеса, 2008. — С. 178–181.
4. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: Методичні рекомендації / С. О. Ігнатова, М. В. Жосонар, К. І. Лобанова, О. Л. Шестопал ; Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. — Одеса, 2008. — 12 с.
5. Жосонар М. В. Гаплопродукционная способность в культуре пыльников сортов и линий озимой мягкой пшеницы, различающихся по генам роста и развития / М. В. Жосонар // *Вісник Харківського національного аграрного університету*. — 2005. — Вип. 2(7). — С. 94–99.
6. Використання ембріокультури для одержання гаплоїдів ячменю та віддалених гібридів ячменю та пшениці : методичні рекомендації / С. О. Ігнатова, М. Л. Махновська, І. С. Замбрборщ [та ін.] ; Півден. біотехнолог. центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2007. — 12 с.
7. Корня Т. М. Селекція *in vitro* озимої м'якої пшениці за впливу фузарієвої кислоти / Т. М. Корня, С. О. Ігнатова // *Мікробіологія і біотехнологія*. — 2011. — № 1(13). — С. 41–47.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск : Высшая школа, 1967. — 367 с.
9. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології : [підручник] / Атраментова Л. О., Утевська О. М. — Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. — 288 с.
10. Inagaki M. N. Production of wheat haploids using wide crosses and its application to breeding programs / M. N. Inagaki // *Proc. of the 9 Int. Wheat Genet. Symp.* Saskatoon, Canada, 1998. — P. 225–226.
11. Sunderland N. Anther and Pollen Culture 1974–1979 / N. Sunderland // *The Plant Genome*, Norwich. — 1980. — P. 171–183.
12. Kartha K. Mc Kenzie Wheat / K. Kartha, R. Graf // *Bull. Plant Biotechnol. Inst.* — 1999. — № 1. — P. 9–12.
13. Mihaly R. Using of doubled haploids in wheat breeding / R. Mihaly, C. Lantos, Z. Kertesz, A. Mesterhazy, J. Pauk // *Haploid in Higher Plants. III. Intern. Conf.* Vienna, February 12–15, 2006. — P. 34.
14. Литвиненко М. А. Біотехнологічні методи у селекції сільськогосподарських культур / М. А. Литвиненко // *Вісник аграрної науки*. — 2010. — № 6. — С. 11–14.
15. Жосонар М. В. Регенераційна здатність різних по тривалості яровизації і фотоперіодическої чутливості сортів озимої пшениці в культурі пыльников *in vitro* / М. В. Жосонар, С. А. Ігнатова,

- В. И. Файт, В. Р. Фёдорова // Вісник Харківського національного аграрного університету. — Серія : біологія. — Харків, 2004. — Вип. 2(5). — С. 79–83.
16. Лобанова Е. И. Регенерация в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разной продолжительностью периода «всходы-колошение» / Е. И. Лобанова, С. А. Игнатова, О. Л. Шестопап, Т. П. Нарган // Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2008. — Т. 5. — С. 291–297.
  17. Ігнатова С. О., Жосонар М. В., Лобанова К. І. Особливості виявлення рівня чутливості до андрогенезу різних генотипів м'якої пшениці в культурі пиляків / С. О. Ігнатова, М. В. Жосонар, К. І. Лобанова // Фізіологія та біохімія культурних рослин. — 2010. — Том 42, № 2(244). — С. 107–117.
  18. Шестопап О. Л. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями / О. Л. Шестопап, І. С. Замбрїборщ, М. М. Топал, М. А. Литвиненко, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова : присвяч. 95-річчю від часу заснування НАН України ; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. — К. : Логос, 2013. — Т. 12. — С. 326–330.
  19. Лобанова К. І. Регенерація рослин в культурі пиляків м'якої пшениці, шляхи її підвищення : автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / К. І. Лобанова. — Одеса, 2009. — 19 с.
  20. Шестопап О. Л. Гаплопродукційна спроможність пшениці м'якої озимої за наявності в генотипі пшенично-житніх транслокацій / О. Л. Шестопап, І. С. Замбрїборщ, М. М. Топал // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, № 1129. Серія: біологія. — 2014. — Вип. 23. — С. 51–56.
  21. Патент України 36253 МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб прогнозування рівня регенерації рослин в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. ; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — № u 200803034; заявка 11.03.08; опубл. 27.10.2008, Бюл. № 20.
  22. Пат. 21988 України МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. ; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — № u 200611658; заявка 6.11.06 ; опубл. 10.04.07, Бюл. № 4.
  23. Літовкін К. В. Генотипові особливості морфогенетичних реакцій в культурі тканин ячменю : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.20 / К. В. Літовкін. — Ялта, 2003. — 20 с.
  24. Зеленіна Г. А., Ігнатова С. О. Тестування сортів ярого ячменю та їх гібридів на гаплопродукційну здатність в культурі пиляків / Г. А. Зеленіна, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць / за ред. Роїка. — К. : Логос, 2006. — Т. 3. — С. 457–461.
  25. Ігнатова С. О. Подолання прогамних та постгамних бар'єрів несумісності при віддаленій гібридизації пшениць з *Aegilops tauschii* L. / С. О. Ігнатова, І. С. Замбрїборщ, Д. В. Аксельруд // Вісник Харківського національного аграрного університету. — 2005. — Вип.2. — С. 75–81.
  26. Замбрїборщ І. С. Технологія створення віддалених гібридів від схрещування пшениці з *Aegilops tauschii* Coos. з використанням методів *in vitro* /

- І. С. Замбріборщ // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць ; Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : Логос, 2006. — Т. 3. — С. 451–456.
27. Патент на винахід, — № (11) 13641, (51) МПК (2006) А01Н 1/02 Спосіб подолання прогамних та постгамних бар'єрів несумісності при віддаленій гібридизації м'якої пшениці з *Aegilops tauschii* Coos. / Замбріборщ І. С., Ігнатова С. О., Шестопа О. Л. ; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — № u 200509228; від 17.04.06, Бюл. № 4.
28. Махновська М. Л. Удосконалення технології одержання гібридних рослин від схрещувань *Hordeum vulgare* (2n=14) x *Hordeum bulbosum* (2n=28) з використанням культури *in vitro* / М. Л. Махновська, Л. С. Шепель, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : Логос, 2006. — Т. 3. — С. 494–499.
29. Використання ембріокультури для одержання гаплоїдів ячменю та віддалених гібридів ячменю та пшениці : методичні рекомендації / Ігнатова С. О., Махновська М. Л., Замбріборщ І. С. [та ін.]; Півден. біотехнолог. центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2007. — 12 с.
30. Shestopal O. Use of *Hordeum spontaneum* in distant hybridization of cultural barley / O. Shestopal, M. Mahnovskaya // Materials of III International Young Scientists conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution» (15–18 May 2007). — Odesa, 2007. — P. 221.
31. Шестопа О. Л. Особливості успадкування ознак дикого ячменю у гібридів *Hordeum vulgare* x *Hordeum spontaneum* / О. Л. Шестопа, М. Л. Махновська, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : IV міжнар. наук. конф., 22–26 вересня 2008 р. : зб. наук. праць. — Алушта, 2008. — С. 216–221.
32. Махновська М. Л., Шестопа О. Л., Ігнатова С. О. Експериментальний андрогенез *in vitro* у віддалених гібридів ярого ячменю *Hordeum vulgare* L. x *H. spontaneum* C. Koch / М. Л. Махновська, О. Л. Шестопа, С. О. Ігнатова // Геном рослин : V Міжнар. наук. конф., 13–16 жовтня 2008 р. : зб. наук. статей. — Одеса, 2008. — С. 203–207.
33. Ігнатова С. А., Бабаянц О. В. Методические основы отбора форм пшеницы мягкой, устойчивых к *Fusarium graminearum* Shwabe в условиях *in vitro* / С. А. Ігнатова, О. В. Бабаянц // Наукові праці Південного філіалу Національного аграрного університету, Кримський агротехнологічний університет, с.-г. науки. — Симферополь, 2008. — Вип. 107– С.136–141.
34. Ігнатова С. А. Прогнозирование устойчивости мягкой пшеницы к фузариозу колоса (*Fusarium graminearum* Shwabe) и отбор толерантных форм в условиях *in vitro* / С. А. Ігнатова // Геном рослин : V Міжнар. наук. конф., 13–16 жовтня 2008 р. : зб. наук. статей. — Одеса, 2008. — С.187–191.
35. Корня Т. М. Морфогенез эксплантов мягкой пшеницы в условиях отбора *in vitro*, толерантных к фильтрату культуральной жидкости гриба *Fusarium graminearum* Schwabe образцов / Т. М. Корня, С. А. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції : збірник наукових праць. — Київ, 2009. — Т. 7. — С. 151–156.
36. Корня Т. М. Вивчення селективних властивостей фільтрату культуральної рідини *Fusarium graminearum* Sch. в культурі пиляків м'якої пшениці /

- Т. М. Корня, С. О. Ігнатова // Вісник Харківського національного аграрного університету : серія Біологія. — 2008. — Вип. 3 (15). — С. 99–106.
37. Шепель Л. С. Біотехнологічні методи одержання стійких до борошнистої роси форм ярого ячменю / Л. С. Шепель, М. Л. Махновська, С. О. Ігнатова // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — Т. 10, № 5. — С. 12–18.
38. Махновская М. Л. Эффективность биотехнологических приемов получения устойчивых форм ячменя к мучнистой росе (*Erysiphe graminis* (DC.) F. SP. *Hordei marschal*) / М. Л. Махновская, О. Л. Шестопал, Л. С. Шепель, С. А. Игнатова // Зб. наук. праць Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннізнавства та сортовивчення. — Одеса : СГІ–НЦНС, 2009. — Вип. 13 (53). — С. 66–73.

Надійшла 27.07.2015.

UDC 57.085.2:633.111:633.16

**Shestopal O. L., Ignatova S. O., Zambriborshch I. S., Zelenina G. A.**  
Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**THE METHODS OF *IN VITRO* CULTURE FOR MODERN SELECTION  
OF SOFT WHEAT (*Triticum aestivum* L.) AND BARLEY  
(*Hordeum vulgare* L.)**

The results of biotechnology developments on the basis of in vitro culture of tissues and organs of wheat and barley, and the possibility of in vitro methods for the creation of initial breeding material were demonstrated. The conditions for the biotechnology of the accelerated creation of resistant to pathogens homozygous material of wheat and barley with simultaneous use of haploid technology and in vitro selection were identified.

УДК 57.085.2:633.111:633.16

**Шестопад О. Л., Игнатова С. А., Замбриборщ И. С., Зеленина Г. А.**

**МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* ДЛЯ СОВРЕМЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.) И ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.)**

Представлены результаты биотехнологических разработок на основе культивирования *in vitro* тканей и органов пшеницы и ячменя. Продемонстрированы возможности методов *in vitro* для получения исходного селекционного материала. *Определены условия для ускоренного создания устойчивого к патогенам гомозиготного материала пшеницы и ячменя с одновременным использованием гаплоидной технологии и селекции in vitro*

УДК 633.112:57.085.2

Г. О. ДОБРОВА, мол. наук. співроб.,  
І. С. ЗАМБРІБОРЦЬ, к. б. н., ст. наук. співроб.,  
О. Л. ШЕСТОПАЛ, к. б. н., ст. наук. співроб.  
СГІ–НЦСС, Одеса  
e-mail: dobrovaann@gmail.com

## **ВПЛИВ ГЕНОТИПУ І УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ (*Triticum durum* Desf.) *IN VITRO***

*Визначили вплив генотипу, індукційного живильного середовища і попередньої обробки колосся низькими позитивними температурами і розчинами АБК на регенерацію рослин у культурі пиляків in vitro ярих і озимих форм пшениці твердої. Виявили значну залежність регенерації зелених і «альбіно» рослин від генотипу. В культурі пиляків отримали фертильні рослини яро-озимих гібридів пшениці твердої. Оптимальними виявились модифікації живильного середовища С17 за вмістом органічних речовин. Попередня обробка колосся водними розчинами АБК істотно не впливала на рівень регенерації, за виключенням рослин сорту Гардемарин.*

Ключові слова: пшениця тверда, культура пиляків *in vitro*, регенерація рослин, живильне середовище, попередня обробка колосся, абсцизова кислота.

**Вступ.** Андрогагенез *in vitro* — важливий біотехнологічний метод, що широко застосовується в селекції злакових культур [1]. Однак пшениця тверда малочутлива в культурі пиляків *in vitro*. Головною проблемою є низький рівень регенерації зелених рослин. В основному з новоутворень формуються рослини-альбіноси, непридатні до вирощування в ґрунті [2, 3]. Тому важливою задачею біотехнолога є дослідження факторів, що впливають на регенерацію, і розробка оптимальних умов культивування.

З літературних даних відомо, що рівень регенерації рослин пшениці твердої певною мірою визначають усі етапи культури пиляків *in vitro*, а саме — попередня обробка колосся [4, 5], індукційне і регенераційне живильні середовища [6], генотип рослин [7, 8].

Виходячи з цього, мета даної роботи полягала в оцінці впливу генотипу, індукційного живильного середовища та умов попередньої обробки колосся на рівень регенерації в культурі пиляків твердої пшениці *in vitro*.

**Матеріали і методи дослідження.** Досліди проводили в 2014 р. Матеріал наданий лабораторією селекції та насінництва пшениці твердої озимої. У дослідження залучали сім яро-озимих гібридів F<sub>2</sub> пшениці

твердої, три сорти пшениці твердої ярої, чотири гібриди  $F_1$  пшениці твердої озимої (табл. 1) і п'ять сортів пшениці твердої озимої (Айсберг одеський, Алий парус, Босфор, Гардемарин, Корал одеський).

Таблиця 1

## Вихідний матеріал для дослідження

№ в культурі	Генотип
Яро-озимі форми	
T1	$F_2$ (Сарат. золотий x Gidara 2) x Гардемарин
T2	$F_2$ HUI/Үав79/Don87 x DF900–83/WBR881
T3	$F_2$ (Торой 18/ФОНА1/Altar84) x (Үав79/Ал. парус) / {Корал / [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб.од.) x (Айсб.од x Нов.4)]}/
T4	$F_2$ Haurani x Айсберг одеський
T5	$F_2$ Haurani x Континент
T6	$F_2$ Haurani x (Үав79 x Ал. парус) x {Корал x [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб.од.) x (Айсб.од x Нов.4)]}/
T7	$F_2$ Торой 18/ФОНА1/Altar84 x Лінкор
Ярі форми	
T8	Altar84
T9	$F_1$ Торой-18/ФОНА-1/Altar84
T10	ФОНА-1
Озимі форми	
T11	$F_1$ DF-900–83/WPB-881 x Новинка4 2614
T12	$F_1$ DF-900–83/WBK-881 x Лінкор
T13	$F_1$ DF-900–83/WBK-881 x Золоте руно
T14	$F_1$ DF- 900–83/WBK-881 x Янтар одеський
	Айсберг одеський
	Алий парус
	Босфор
	Гардемарин
	Корал одеський

Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ–НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори знаходились у середньо-пізній одноядерній фазі розвитку. Попередньо витримували зрізані пагони у воді та водному розчині АБК (0,25 і 0,5 мг/л) протягом 3–7 діб при +2 — +4°C у темряві [9]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за відомою методикою [10]. Пиляки експлантували на шість варіантів агаризованих живильних середовищ для індукції новоутворень 190–2 [6], С17 [11] та їх модифікації. Модифікували середовища за вмістом і складом амінокислот, органічних кислот та вітамінів [12]. Після 15–25 діб культивування новоутворення переносили на середовища для новоутворень MS [11]. Після 7–10 діб калюси із зонами регенерації та ембріоїди поміщали на



середовище для регенерації S MS [13]. Для визначення рівня регенерації підраховували процент одержаних рослин-регенерантів («альбіно» та зелених) та довірчий інтервал згідно Рокицького [14].

**Результати і обговорення.** На першому етапі дослідження вивчали вплив генотипу та складу індукційного живильного середовища на процес регенерації рослин у культурі *in vitro* пиляків пшениці твердої. Оскільки, за даними літератури, ярі форми різних культурних злаків є більш чутливими до андрогенезу *in vitro* [1], ми залучили в дослідження сорти і F<sub>2</sub> міжсортові гібриди пшениці твердої ярої. Результати досліджень наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Регенерація рослин у культурі пиляків сортів і гібридів пшениці твердої ярої

Генотип	Індукційне середовище	«Альбіно»		Зелені	
		шт.	%	шт.	%
T1	C17 B	2	0,81±0,57	0	0
	C17 M	3	3,09±1,76	0	0
	CM	4	1,23±0,61	0	0
T2	C17B	1	0,11±0,11	1*	0,20±0,20
T3	C17 B	4	0,86±0,43	0	0
	C17 M	1	0,23±0,23	0	0
	CM	3	1,40±0,80	0	0
	190–2 B	1	1,54±1,53	0	0
T4	C17 B	0	0	3*^	0,55±0,32
T5	C17н	2	0,74±0,52	1	0,37±0,37
T6	C17 M	1	0,51±0,51	1*^	0,51±0,51
T7	C17н	1	0,82±0,82	0	0
	CM	2	0,96±0,66	0	0
T8	CM	1	0,66±0,66	0	0
T9	C17 M	2	0,90±0,63	0	0
	C17	1	0,38±0,38	2	0,77±0,54
	C 17 B	3	1,02±0,59	2	0,68±0,48
	CM	2	0,69±0,49	0	0
T10	C 17 B	1	0,47±0,47	0	0
	C17	1	0,27±0,27	0	0

Примітка. \* – рослини були успішно адаптовані і вирощуються в умовах штучного клімату; ^ — рослини фертильні, отримано насіння.

– в таблиці наведено результати лише тих варіантів досліду, де отримано регенерацію (при застосуванні інших живильних середовищ прояву даної ознаки не спостерігали).

На нашу думку, цікавим для подальшого вивчення є виявлений позитивний вплив залученого у схрещування сорту Haurani на регенерацію зелених рослин у культурі пиляків гібридів пшениці твердої. Так, у результаті андрогенезу *in vitro* від генотипу F<sub>2</sub> Haurani x Айсберг одеський (T4) отримали зелені рослини-регенеранти за майже нульового рівня регенерації «альбіно» рослин. При цьому одна з батьківських форм,

а саме озимий сорт Айсберг одеський виявився взагалі нечутливим до умов культивування пиляків *in vitro*. Гібриди  $F_2$  Naurani x Континент (Т5) і Naurani x (Yav79 x Ал. парус) x {Корал x [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб. од.) x (Айсб. од x Нов.4)]} / (Т6), аналогічно генотипу Т4, характеризуються здатністю утворювати зелені рослини-регенеранти і низьким виходом «альбіно» рослин. Отже, можна зробити висновок, що генотип Naurani може бути потенційним донором ознаки «регенерація зелених рослин».

Ярий генотип Тороу-18/ФОНА-1/Алтар 84 (Т9) виявився спроможним утворювати як зелені, так і «альбіно» рослини-регенеранти. Рослини ярих сортів Алтар84 (Т8) і ФОНА1 (Т10) регенерували лише «альбіно» форми. Гібрид Тороу 18/ФОНА1/Алтар 84 x Лінкор (Т7), на відміну від батьківської форми, виявився малочутливим до умов культури пиляків *in vitro*. Аналогічні результати отримали за культивування пиляків яро-озимого гібрида Т3, до складу якого входив генотип Тороу-18/ФОНА-1/Алтар 84.

В умовах посушливого клімату Півдня України вищу рентабельність забезпечують озимі форми пшениці твердої. Тому у подальше дослідження, окрім ярих, були залучені й озимі сорти та гібриди. На першому етапі дослідили вплив генотипу та індукційного живильного середовища на регенерацію рослин в культурі пиляків гібридів  $F_1$  пшениці твердої озимої (табл. 3).

Гібрид першого покоління DF-900–83/ВВК-881 x Янтар одеський (Т14) виявився малочутливим до умов культури пиляків *in vitro* і характеризувався нижчим, у порівнянні з іншими гібридами, рівнем регенерації. Загалом регенерація у гібридів Т11–Т13 достовірно не відрізнялась. З-поміж досліджених генотипів  $F_1$  гібридів пшениці твердої озимої зелені рослини-регенеранти отримано лише у гібрида  $F_1$  DF-900–83/ВВК-881 x Лінкор (Т12). Генотип DF-900–83/ВВК-881 був батьківським компонентом яро-озимого гібрида  $F_2$  HUI/Yav79/Don87 x DF900–83/ВВК-881 (Т2), новоутворення якого виявили здатність формувати в культурі *in vitro* зелені рослини-регенеранти.

Одним з найважливіших факторів, що впливають на ефективність процесу андрогенезу, є живильне середовище. Більшу кількість рослин отримали з новоутворень, сформованих на модифікаціях індукційного живильного середовища С17 — С17В, С17н, СМ, С17М (табл. 2, 3).

У попередніх дослідженнях [12, 15] нами було показано, що саме ці середовища є оптимальними для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої.

Озимі гібриди по-різному відповідають на умови культивування, а саме на склад індукційного живильного середовища (табл. 3). Так, новоутворення, отримані з мікроспор генотипів Т12, Т13, Т14, надалі краще регенерували при культивуванні пиляків на індукційному середовищі С17М — модифікації середовища С17, що містила у своєму складі мальтозу, як джерело вуглецю. Однак генотип Т11 максимальний рівень

Таблиця 3

Регенерація зелених і «альбіно» рослин у культурі пиляків гібридів пшениці твердої озимої

Гено-тип	Індукційне середовище	«Альбіно»		Зелені	
		кількість регенерантів, шт.	регенеранти, %	кількість регенерантів, шт.	регенеранти, %
Т11	190–2 В	1	0,24±0,24	0	0
	С17	0	0	0	0
	С17 В	4	0,99±0,49	0	0
	С17 М	2	0,30±0,21	0	0
	СМ	2	0,70±0,49	0	0
Т12	190–2 В	6	1,02±0,41	0	0
	С17	5	0,75±0,33	0	0
	С17 В	2	0,28±0,20	0	0
	С17 М	10	1,32±0,41	2	0,26±0,19
	СМ	0	0	1	0,14±0,14
Т13	190–2 В	1	0,19±0,19	0	0
	С17	2	0,43±0,30	0	0
	С17 В	3	0,45±0,26	0	0
	С17 М	5	1,02±0,45	0	0
	СМ	1	0,22±0,22	0	0
Т14	190–2 В	2	0,24±0,17	0	0
	С17	1	0,11±0,11	0	0
	С17 В	1	0,12±0,12	0	0
	С17 М	3	0,48±0,28	0	0
	СМ	0	0	0	0

регенерації показав при культивуванні пиляків на індукційному середовищі С17В — модифікації С17 за вмістом аміно- і органічних кислот. У гібрида Т12 регенерація при культивуванні пиляків на середовищах С17 і 190–2В була вища, ніж у інших гібридів, а на середовищі С17В — нижча у порівнянні з гібридом Т11. Дві зелені рослини генотипу Т12 були сформовані при культивуванні пиляків на середовищі С17М, одна — на середовищі СМ.

Отже, можна зробити висновок, що модифіковані за вмістом органічних речовин середовища на основі С17 є найбільш придатними для отримання рослин-регенерантів. Додавання до них мальтози як джерела вуглецю (С17М) і амінокислот (С17В) сприяло виходу зелених рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої.

З літературних даних відомо, що попередня обробка колосся низькими позитивними температурами і розчином АБК стимулює перехід мікроспор з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку і підвищує регенераційну здатність новоутворень у культурі пиляків пшениці твердої [4, 5]. Вплив попередньої обробки колосся на вихід рослин-регенерантів вивчали на сортах пшениці твердої озимої (табл. 4).

Таблиця 4

Регенерація «альбіно» рослин пшениці твердої озимої в культурі пиляків *in vitro*

Генотип	Концентрація АБК, мг/л	Кількість регенерантів	%
Айсберг одеський	0	0	0
	0,25	0	0
	0,5	0	0
Алий парус	0	0	0
	0,25	2	0,29±0,20
	0,5	0	0
Босфор	0	0	0
	0,25	0	0
	0,5	0	0
Гардемарин	0	0	0
	0,25	4	0,89±0,45
	0,5*	1	0,23±0,22
Корал одеський	0	2	0,65±0,45
	0,25	0	0
	0,5	1	0,19±0,19

Примітка:\* — були сформовані дві зелені рослини.

Усі досліджені сорти пшениці твердої виявились малочутливими до умов культури пиляків *in vitro*. З п'яти генотипів рослини-регенеранти дали лише три сорти — Алий парус, Корал одеський та Гардемарин. Сорти Айсберг одеський і Босфор регенерантів не сформували (табл. 4).

З досліджених сортів Гардемарин був найбільш чутливим до культури пиляків *in vitro*. Для сортів Алий парус і Гардемарин характерне формування регенерантів лише після попередньої обробки колосся водними розчинами АБК. Впливу даного гормону на регенерацію рослин у сорту Корал не спостерігали.

Слід зазначити, що попередня обробка колосся АБК не сприяла регенерації зелених рослин. Однак, у культурі пиляків сорту Гардемарин одержано дві зелені рослини-регенеранти за умови попередньої обробки колосся АБК в концентрації 0,5 мг/л.

### Висновки

1. Досліджені генотипи пшениці твердої характеризуються різним рівнем регенерації. Більший вихід зелених рослин-регенерантів спостерігали у гібридів, де за батьківську форму використовували ярі генотипи — Naurani та Тороу-18/ФОСНА-1/Altar84. Теоретично можна очікувати регенерацію зелених рослин при залученні даних генотипів у схрещування. Серед досліджених озимих сортів найбільшим регенераційним потенціалом характеризувався сорт Гардемарин.

2. Найвищий рівень регенерації з новоутворень одержано за умови культивування пиляків на індукційних живильних середовищах С17н, С17В, СМ та С17М — модифікаціях стандартного середовища С17.

3. Рівень регенерації рослин сорту Гардемарин вищий за умови попередньої обробки колосся водними розчинами АБК у концентраціях 0,25 та 0,5 мг/л. В інших досліджених сортів чіткої залежності рівня регенерації від попередньої обробки АБК не виявлено.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ігнатова С. О. Фактори, що впливають на реалізацію регенераційного потенціалу мікроспор у культурі пиляків м'якої пшениці / С. О. Ігнатова, К. І. Лобанова // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. — 2007. — Т. 2. — С. 492.
2. Kisana N. S., Nkongolo K. K., Quick J. S. [et al.] Production of doubled haploids by anther culture and wheat x maize method in a wheat breeding programme / N. S. Kisana, K. K. Nkongolo, J. S. Quick [et al.] // Plant Breeding. — 1993. — V.110 — P. 96–102.
3. O'Donoghue L. S. and Bennett M. D. Comparative responses of tetraploid wheat pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. / L. S. O'Donoghue and M. D. Bennett // Theoretical and Applied Genetics. — 1994. — V. 87. — P. 673–680
4. Slama Ayed O. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum Desf.) / O. Slama Ayed, J. De Buyser, E. Picard [et al.] // Journal of Plant Breeding and Crop Science. — 2010. — V. 2, № 2. — P. 30–38.
5. Genovesi A. D. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock / A. D. Genovesi and C. W. Maggill // Crop Science. — 1979. — V. 19. — P. 662–664.
6. Trottier M. C. Comparison of media further aptitude in wheat anther culture / M. C. Trottier., J. Collin, A. Comeau // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1993. — V. 35. — P. 59–67.
7. Caredda S. Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates / S. Caredda, C. Clément, E. Pacini, J. C. Audran (eds.) // Anther and pollen: from biology to biotechnology. — Berlin : Springer, 1999. — P. 211–228.
8. Лобанова Е. И. Регенерация в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разной продолжительностью периода «всходы-колошение» / Е. И. Лобанова, С. А. Игнатова, О. Л. Шестопап, Т. П. Нарган // Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2008. — Т. 5. — С. 291–297.
9. Патент України МПК № 21988 від 10.04.07. Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці. — Бюл. № 4.
10. Ігнатова С. О. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків / С. О. Ігнатова, М. В. Жосонар, К. І. Лобанова, О. Л. Шестопап // Методичні рекомендації. Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. — Одеса, 2008. — 12 с.
11. Foroughi-Wehr B., Zeller F. J. In vitro microspore reaction of different German wheat cultivars // Theoretical and Applied Genetics. — 1990. — V. 79. — P. 77–80.
12. Замбріборщ І. С. Індукція новоутворень в культурі пиляків тетраплоїдної пшениці *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. *in vitro* / І. С. Замбріборщ,

- Г. О. Добрава, О. Л. Шестопал, О. М. Ружицька // Сборник научных трудов SWorld. — 2013. — С. 28–32.
13. Лобанова К. І. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці / К. І. Лобанова, М. В. Жосонар, С. О. Ігнатова // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 52–57.
  14. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика : учебник [для студ. высших учебн. завед.] / П. Ф. Рокицкий — Минск : Изд-во Минского ун-та, 1973. — 316 с.
  15. Замбрїборщ І. С. Вплив живильних середовищ на індукційну спроможність сортів та гібридів твердої пшениці / І. С. Замбрїборщ, Г. О. Добрава, А. І. Паламарчук // Тези міжнародної наукової конференції «Селекція та генетика сільськогосподарських рослин: традиції та перспективи» (до 100-річчя Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення). — 2012. — С. 370–371.

Надійшла 02.07.2015.

UDC 633.112:57.085.2

**Dobrova G. O., Zambrıborshch I. S., Shestopal O. L.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**THE AFFECT OF GENOTYPE AND CULTURAL CONDITIONS ON *IN VITRO* PLANT REGENERATION IN DURUM WHEAT (*Triticum durum* Desf.) ANTHR CULTURE**

Durum wheat double haploid production was the main goal of our research. The effect of plant genotype, induction cultural media and spikes pretreatment with low positive temperature and water ABA solutions (0,25 and 0,5 mg/l) during seven days on the process of *in vitro* plant regeneration in durum wheat anther culture was studied in this research. Important effect of plant genotype on spring durum wheat varieties and hybrids green and «albino» plant regeneration was discovered. Responsible to *in vitro* anther culture conditions genotypes were determined. Fertile haploid plants of two winter-spring durum wheat hybrids were obtained. It was detected that the most appropriate induction cultural media was C17 media modifications with adding of organic components. Low temperature and water ABA solutions didn't significantly affect the regeneration level, except plants of Gardemarin variety.

УДК 633.112:57.085.2

**Доброва А. А., Замбриборщ И. С., Шестопап О. Л.****ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
НА РЕГЕНЕРАЦИЮ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ  
ПШЕНИЦЫ ТВЕРДОЙ (*Triticum durum Desf.*) *IN VITRO***

Изучали влияние генотипа, индукционной питательной среды и предобработки колосьев низкими положительными температурами и водными растворами АБК на регенерацию растений в культуре пыльников *in vitro* яровых и озимых форм пшеницы твердой. Выявили значительную зависимость регенерации зеленых и «альбино» растений от генотипа. В культуре пыльников *in vitro* яро-озимых гибридов пшеницы твердой получены фертильные зеленые растения-регенеранты. Оптимальными оказались модификации среды С17 по содержанию органических соединений. Предобработка колосьев водными растворами АБК не оказывала существенного влияния на уровень регенерации, за исключением сорта пшеницы твердой озимой Гардемарин.

## ФІТОПАТОЛОГІЯ

УДК 57.08:632.08

Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., ст. наук. співроб., гол. наук. співроб.,  
А. Є. СОЛОДЕНКО, к. б. н., ст. наук. співроб., пров. наук. співроб.,  
І. А. БАЛАШОВА, к. б. н., пров. наук. співроб.,  
О. О. ЗАХАРОВА, к. б. н.,  
А. М. ВЕНГЕР, мол. наук. співроб.  
СГІ–НЦНС, Одеса  
e-mail: natavolki@ukr.net

### МОЛЕКУЛЯРНА ДЕТЕКЦІЯ ЗБУДНИКІВ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

*Для детекції патогенних організмів у тканинах сільськогосподарських рослин (пшениці м'якої, кукурудзи, соняшнику, хмелю звичайного) опрацьовано молекулярні маркери на основі методу полімеразної ланцюгової реакції.*

Ключові слова: молекулярні маркери, фітопатогени, сільськогосподарські культури, полімеразна ланцюгова реакція.

**Вступ.** Втрати врожаю сільськогосподарських культур від шкідників, хвороб та бур'янів в Україні щороку сягають 12–18 %, а за масового розмноження збудників — 25–50 %. Традиційні методи діагностики збудників інфекцій у рослин — використання рослин-індикаторів для ідентифікації вірусів, спеціальних середовищ для виявлення бактерій *etc* — досить трудомісткі і займають багато часу (дні, в ряді випадків, тижні і місяці).

Актуальною є необхідність при аналізі рослинного матеріалу застосування високочутливих і специфічних методів детекції, що дозволяють визначити навіть незначну кількість патогенів. Це особливо важливо при контролі рослинного матеріалу на наявність карантинних патогенів. Тому в практику контролю фітосанітарного стану сільськогосподарських рослин і продуктів їх переробки (додатково чи на зміну традиційним та серологічним методам) необхідно впроваджувати молекулярні технології, зокрема на основі методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР-метод дозволяє виявити збудників інфекційних захворювань за наявністю у пробі їхнього генетичного матеріалу навіть у тих випадках, коли іншими методами (зокрема візуальною діагностикою хвороби за симптомами та мікроскопією) зробити це технічно неможливо.

**Мета** наших досліджень: визначити ДНК-маркери для детекції збудників інфекційних хвороб сільськогосподарських культур, а саме грибів



*Plasmopara helianthi* в тканинах рослин соняшнику, грибів роду *Fusarium* у зерні кукурудзи та пшениці, роду *Alternaria* у зерні кукурудзи, бактерії *Agrobacterium tumefaciens* в тканинах рослин хмелю звичайного.

**Матеріал і методи.** Матеріалом слугували: інбредні лінії соняшнику 102 А и ОС 1029 А; лінії-диференціатори стійкості соняшнику до певних рас *Plasmopara halstedii* RHA-265, RHA-419, 803-I; зразки дикорослого соняшнику *Helianthus argophyllus*; сорт пшениці м'якої Одеська напівкарликова; інбредні лінії кукурудзи ГК26, ДС10/3, ОК124, ДК277-10, W275, П343, ВІР27, ОК39, ОК104-4, БК440; сорти хмелю звичайного Альта та Клон 18; культура грибів роду *Fusarium* — штами *F. macroceras*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*; культура грибів роду *Alternaria* — *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. brassicae*, культура грибів *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, культура агробактерії *Agrobacterium tumefaciens*.

Екстракція ДНК з рослинних тканин, постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез в агарозних і поліакриламідних гелях здійснювали за загальноприйнятими методиками.

### **Результати.**

**ДНК-маркер для детекції збудника несправжньої борошнистої роси соняшнику.** Збудник несправжньої борошнистої роси (НБР) соняшнику — *Plasmopara halstedii* Farl. — облигатний патоген грибної природи з класу *Oomycetes*. Значне збільшення площ під соняшником, передчасне його повернення на попередні місця вирощування спричиняє накопичення інфекції у ґрунті. Ооспори несправжньої борошнистої роси зберігаються в насінні уражених рослин, у ґрунті, в уражених сходах падалиці. Шкодочинність цього захворювання зумовлює обов'язкове лабораторне тестування стійкості селекційного матеріалу. Лабораторна оцінка стійкості великої кількості селекційних зразків здійснюється експрес-методом щорічно у зимовий період. Для одержання належних результатів необхідно дотримуватись певних умов проведення дослідження: визначений розмір проростків та сформованість сім'ядольних листків на етапі штучного зараження, оптимальне інфекційне навантаження, тобто концентрація зооспорангіїв гриба в інокулюмі, тривалість періоду інокуляції та температурний режим. У масових оцінках можливе певне недотримання методики з об'єктивних причин. До того ж, у процесі імунологічного аналізу частина проростків гине від супутніх інфекцій. Молекулярна діагностика патогена може сприяти отриманню об'єктивної оцінки стійкості рослин соняшнику. Аналіз послідовності генів 28 S-РНК (з бази даних GenBank) у дев'яти ізолятів *Plasmopara halstedii* і 60 ізолятів інших видів ооміцетів дозволив виявити дві поліморфні ділянки гена, одна з яких специфічна тільки для *P. halstedii* [1].

З метою довести можливість використання ДНК-маркера для виявлення збудника несправжньої борошнистої роси в тканинах рослин соняшнику на різних стадіях розвитку провели молекулярно-генетичне

дослідження методом ампліфікації специфічної послідовності геному *P. halstedii* [2].

Матеріалом дослідження слугувало насіння та рослини соняшнику інбредних ліній 102А и ОС1029А селекції СГІ–НЦНС; ліній-диференціаторів стійкості до певних рас несправжньої борошнистої роси: RHA-265, RHA-419, 803-I; зразків дикорослого виду *Helianthus argophyllus*, які тестували в лабораторних умовах [3], на стадії оцінки стійкості; рослини на стадії цвітіння. Для проведення молекулярно-генетичного дослідження виділяли ДНК з фрагментів проростків, паренхімних та судинних тканин листя, зі спорангіїв, що були вилучені з уражених несправжньою борошнистою росою зразків, та використовували праймери, запропоновані для аналізу послідовності рДНК геному *Plasmopara* [1], а також праймери, які фланкують мікросателітний локус геному соняшнику *ORS1039*.

За результатом ПЛР з праймерами до послідовності рДНК *P. halstedii* ампліфіковано фрагмент ДНК розміром 308 п. н. у тих випадках, коли матричною була ДНК, виділена з уражених грибом проростків та зі спорангіїв (рис. 1).

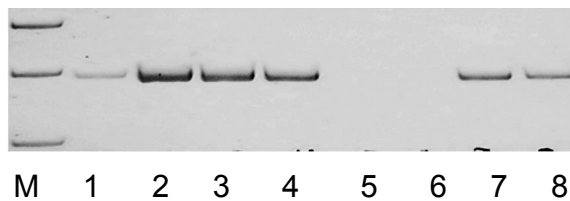


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК, виділеної з уражених проростків (1–4), зразків соняшнику без візуальних ознак ураження (5, 6), зі спорангіїв (7, 8). М — маркер молекулярної маси ДНК рUC19/ Msp I

Застосований метод виділення ДНК дозволяє отримати препарати сумарної ДНК рослини соняшнику і гриба, тому нами додатково оцінено специфічність молекулярно-генетичного маркера, а також можливість появи «помилково-позитивних» та «помилково-негативних» результатів ампліфікації. Сумарну ДНК з проростків виділяли на заключній стадії імунологічної оцінки стійкості. Ліній-диференціатори RHA419 і 803-I (носії генів  $PI_{ARG}$  і  $PI8$ , які надають стійкість практично усім патотипам *P. halstedii*) за результатами імунологічного тестування не вражалися несправжньою борошнистою росою. Неможливість розвитку патогена в тканинах ліній RHA419 і 803-I підтверджується відсутністю ампліфікації маркерного фрагмента ДНК розміром 308 п. н. Ті ж препарати виділеної ДНК дозволяють отримати для ліній RHA419 і 803-I фрагмент ампліфікації мікросателітного локусу геному соняшнику *ORS1039* розміром 200 п. н. Сумарна ДНК, виділена з ураженого росою проростка — зразка лінії 102А, дозволяє виявити фрагмент, специфічний для геному *P. halstedii*, і фрагмент, характерний для геному соняшнику.

Для молекулярно-генетичної детекції патогенного гриба *P. halstedii* в тканинах рослин соняшнику, які вирощували в польових умовах, досліджували зразки, які виявляли ознаки ураження грибними патогенами. Для зразків з характерними симптомами несправжньої борошністої роси (низькорослість, хлороз і гофрованість листових пластинок, зав'янення кошиків) показано наявність у судинних тканинах листа і стебла ДНК *P. halstedii*. При використанні ДНК, виділеної з паренхімних тканин тих же зразків, ДНК-маркер не виявлено, що пояснюється особливостями розвитку і локалізації патогена в рослині.

**ДНК-детекція грибів роду *Fusarium* і роду *Alternaria* в насінні кукурудзи та продуктах його переробки.** Інфікування кукурудзи грибами є причиною значних економічних втрат у результаті зниження врожайності, гігієнічної небезпеки для людини та сільськогосподарських тварин внаслідок виділення мікотоксинів і зменшення технологічної якості зерна. Складність захисту людини від мікотоксикозів посилюється тим, що продукти рослинного походження (зерно і зернопродукти), що містять мікотоксигенні гриби, не втрачають своєї отруйності протягом багатьох років. Хімічні і біологічні методи виділення та визначення мікотоксинів виключно складні, трудомісткі і не відповідають вимогам масового аналізу. Повсюдна поширеність грибів *Fusarium* і *Alternaria*, наявність у них патогенних і токсиноутворюючих властивостей і пов'язана з цим можливість розвитку грибів, накопичення мікотоксинів не тільки в період вегетації рослин, але і в період зберігання, роблять актуальним завданням розробку молекулярних маркерів для детекції фузарієвих і альтернарієвих грибів у зерні кукурудзи.

Дизайн більшості праймерів, сконструйованих для видо- і родоспецифічної детекції патогенів, розроблено на основі варіабельності послідовностей в регіонах внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної рибосомної ДНК (рДНК). Кластери рибосомних генів завдяки особливостям їхньої структурно-функціональної організації є найбільш перспективними для діагностичного використання. Регіони багатокопійної рДНК, які включають внутрішні транскрибовані спейсери (BTC1 і BTC2), придатні для ампліфікації в ПЛР і містять ділянки, які значно різняться за швидкістю молекулярної еволюції.

Для виявлення та ідентифікації в зерні кукурудзи грибів *Alternaria* spp. та *Fusarium* spp. (на рівні родів та видів *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. brassicae*, *F. macroceras*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*) дібрано системи молекулярних маркерів, що генеруються в процесі ПЛР, на основі послідовностей BTC1 і BTC2 гена 5,8 S рибосомної РНК [4–8]. Переверено родо- і видоспецифічність молекулярних маркерів. Рівень чутливості в двокомпонентній системі (суміш ДНК гриба і кукурудзи) дозволяє детектувати грибку ДНК на фоні 1000-кратної кількості ДНК кукурудзи.

На рисунку 2 наведено приклад тестування ДНК, що виділена з розмолотих зерен кількох ліній кукурудзи без візуальних симптомів ураження, з використанням маркера, видоспецифічного *F. moniliforme*. Наявність фрагмента ампліфікації розміром 561 п. н. свідчить про наявність грибів *F. moniliforme*.

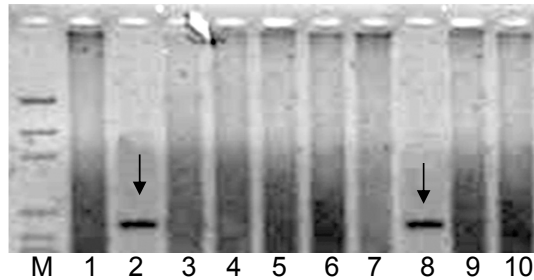


Рис. 2. ПЛР-детекція *F. moniliforme* в візуально здорових зернах кукурудзи. ДНК, що виділена з зерен ліній кукурудзи ГК26 (1), ДС10/3 (2), ОК124 (3), ДК277–10 (4), W275 (5), П343 (6), ВІР27 (7), ОК39 (8), ОК104–4 (9), БК440 (10). М — маркер молекулярної маси рGEM. Стрілками позначено 561 п. н.-фрагмент, специфічний для *F. moniliforme*

До систем молекулярних маркерів для детекції фузаріумних грибів додано маркери генів токсиноутворення *tri5*, *tri6*, *fum5*. На рисунку 3 наведено електрофореграму розподілу продуктів ампліфікації гена *tri5*, що кодує перший ензим біосинтезу трихотеценів — триходієнсінтазу, при опрацюванні маркерів на модельних об'єктах — колекційних штаммах шести видів роду *Fusarium*. 544 п. н. — фрагмент ампліфікації свідчить про наявність гена *tri5* у певному штамі фузаріумних грибів.

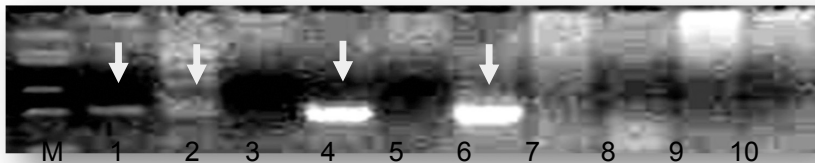


Рис. 3. ПЛР-детекція гена *tri5* у зразках ДНК видів 1 — *F. macroceras* (штам 29), 2—*F. oxysporum* (штам 74), 3—*F. graminearum* (штам 56а), 4—*F. graminearum* (штам ав), 5 — *F. gibbosum* (штам 40), 6 — *F. gibbosum* (штам 38/в), 7 — *F. sporotrichiella* (штам 715в), 8 — *F. sporotrichiella* (штам 714в), 9 — *F. moniliforme* (штам 9.9), 10 — *F. moniliforme* (штам 4.3). М — маркер молекулярної маси рGEM. Стрілками позначено *tri5*-ген специфічний фрагмент розміром 544 п. н.

Діагностична процедура ПЛР-детекції грибів роду *Alternaria* та *Fusarium* у насінні кукурудзи дозволяє швидко й ефективно виявити ураженість зерна (без візуальних симптомів захворювання) та вчасно здійснити захисні заходи, зокрема при закладці зерна на довгострокове зберігання, передпосівну фітосанітарну обробку зерна. Автори також

успішно опрацювали дану систему молекулярних маркерів для тестування продуктів переробки зерна кукурудзи (крупя, борошна) і харчових продуктів з кукурудзи (сухих сумішей дитячого харчування, консервованої, замороженої кукурудзи, кукурудзяних пластівців і паличок) [9, 10], зразків ґрунту [11].

**Розробка дуплексних ПЛР-тестів для детекції грибних фітопатогенів.** Застосування ПЛР-тестів для детекції патогенних грибів і генів, що контролюють синтез токсинів, безумовно, актуальне. Водночас, значно менше уваги приділяється максимально ефективному використанню вже апробованих ПЛР-тестів, а саме, комплексному проведенню ДНК-аналізу за двома і більше маркерними локусами. Дуплексний (мультиплексний) аналіз є значно інформативнішим і економічним, зокрема при необхідності тестування великої кількості матеріалу, в тому числі харчової сировини (зерна) без візуальних ознак ураження патогенними грибами. У зв'язку з цим, розглядалася можливість проведення дуплексної ПЛР для визначення родо- і видоналежності штамів патогенних грибів [12, 13].

Генетичним матеріалом для розробки дуплексних варіантів ПЛР слугували ДНК штамів грибів видів *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. sporothrihella*, *F. macrocerus*. Матеріал для проведення досліджень люб'язно надала завідувач відділу фітопатології та ентомології СГІ–НЦНС, д. б. н. О. В. Бабаянц.

Оскільки одними з найбільш небезпечних патогенів для людини і тварин є гриби роду *Fusarium*, то ми розглядали можливість застосування дуплексного аналізу для ідентифікації належності штамів до зазначеного роду та його видів *F. graminearum* і *F. moniliforme*, які продукують токсини різної хімічної природи. Зокрема вивчали можливість проведення дуплексних ПЛР за локусами, специфічними для зазначених роду і видів, а саме комбінацій *Its-Fu / GaoA* та *Its-Fu / 53–6* (табл.).

Лімітуючим чинником можливості використання дуплексної ПЛР є взаємокомплементарність праймерів. Як відомо, дизайн пар спрямованих праймерів передбачає мінімізацію (виключення) ймовірності утворення димерів між ними. У разі комбінування пар праймерів, дизайн яких проводили незалежно один від одного, виникнення димерів цілком ймовірна подія. У зв'язку з цим добір комбінацій пар праймерів проводили за програмою FastPCR. Серед планованих варіантів комбінацій праймерів димерів не визначено.

Для проведення дуплексної ПЛР за локусами *Its-Fu / GaoA* і *Its-Fu / 53–6* використовували ДНК, екстраговану зі штамів видів роду *Fusarium*, видів *Aspergillus niger* і *Candida albicans*. Дуплексна ПЛР за локусами *Its-Fu / GaoA* дозволила детектувати два маркерних фрагменти тільки в ДНК штамів виду *F. graminearum* — продукти 389 і 896 п. н., в той час як в інших представників роду *Fusarium* детектували тільки родоспецифічний

Таблиця

Маркерні локуси і праймери для ПЛР-аналізу фітопатогенних грибів [14, 15]

Об'єкт, маркерний локус	Пари праймерів або їх комбінації	Послідовність прай- мерів (5'-3')	Розмір фраг- мента ампліфі- кації, п. н.
Рід <i>Fusarium</i> , локус <i>Its-Fu</i>	Its-FuL Its-FuR	caactcccaaacccctgtga gcgacgattaccagtaacga	389
Вид <i>F. graminearum</i> , локус <i>GaoA</i>	GaoA-V2 Gao-R2	agggacaataagtgcaga actgtgtcagacgacagct	896
Вид <i>F. moniliforme</i> , локус <i>53-6</i>	53-6L 53-6R	tttacgaggcggcgatgggt ggccgtttacctggcttctt	561
Рід <i>Fusarium</i> , вид <i>F. moniliforme</i> , локус <i>Its-Fu /53-6</i>	Its-FuL+Its-FuR + 53-6L+ 53-6R	caactcccaaacccctgtga gcgacgattaccagtaacga tttacgaggcggcgatgggt ggccgtttacctggcttctt	389, 561
Рід <i>Fusarium</i> , вид <i>F. graminearum</i> , <i>Its-Fu/GaoA</i>	Its-FuL+Its- FuR + GaoA- V2+Gao-R2	caactcccaaacccctgtga gcgacgattaccagtaacga agggacaataagtgcaga actgtgtcagacgacagct	389, 896

маркерний фрагмент — 389 п. н. Для ДНК штамів видів *A. niger* і *C. albicans* наявність продуктів реакції не встановлено. Проведення дуплексної ПЛР при використанні комбінації двох пар праймерів до локусів *Its-Fu / 53-6* показало можливість ідентифікації штамів виду *F. moniliforme* серед штамів грибів, представників роду *Fusarium*, оскільки тільки у ДНК штамів *F. moniliforme* детектовані обидва маркерні фрагменти 389 та 561 п. н. (рис. 4).

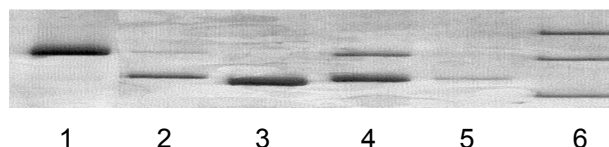


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації за локусом *53-6* зразка *F. moniliforme* (1) та продуктів дуплексної ПЛР, проведеної за локусами *Its-Fu* і *53-6* ДНК штамів видів роду *Fusarium*: *F. moniliforme* (2, 4); *F. graminearum* (3); *F. culmorum* (5). 6 — маркер молекулярної маси *pBlue / Mspl*

Розробку дуплексних ПЛР-тестів проводили при використанні ДНК, екстрагованої з культивованих у пробірці грибних штамів. Також виявлена можливість застосування даного аналізу для ідентифікації патогенних грибів у зерні пшениці. Зокрема, проводили ПЛР-аналіз ДНК, екстрагованої зі стерильного зерна сорту пшениці Одеська напівкарликова та зерна, культивованого у присутності чистої культури патогенних штамів.

**Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного.** Для молекулярної детекції патогенних штамів аг-

робактерії *Agrobacterium* spp. та виду *A. tumefaciens* (Smith & Townsend (Conn) (збудника бактеріального раку підземних органів хмелю) за ПЛР-методом аналізували консервативні регіони генів патогенності Ті-плазмиди *ipt* (розмір продукту ампліфікації 427 п. н.) та гена вірулентності *virD2* (розмір продукту ампліфікації 224 п. н.), відповідно [16].

Проведено ПЛР-аналіз ДНК зразків хмелю (бруньки) сорту Альта без та з візуальними симптомами захворювання — наявністю корончатих галів («здорові» та «хворі» зразки відповідно), чистої культури *A. tumefaciens* та суміші ДНК здорових зразків хмелю і чистої культури *A. tumefaciens* у співвідношенні 1:1, 5:1, 10:1. Продукти ПЛР розміром 224 та 427 п. н. виявлені у зразках ДНК, виділеної з чистої культури *A. tumefaciens*, всіх уражених зразків хмелю, деяких здорових зразках сумішею ДНК здорових зразків хмелю та *A. tumefaciens* у всіх співвідношеннях.

З використанням даного підходу діагностовані донорні рослини сортів Клон 18 та Альта та дібрані зразки для введення в культуру *in vitro* з 10 чубуків кожного сорту з метою клонального мікророзмноження (рис. 5) [17]. Подальший ПЛР-аналіз даних зразків у процесі розмноження підтвердив відсутність інфекції.

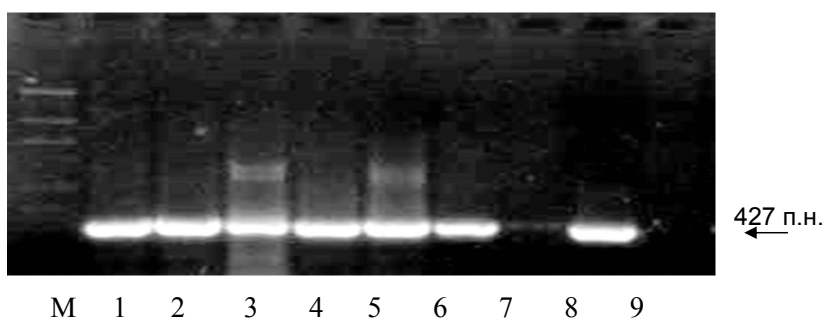


Рис. 5. ПЛР-детекція гена *ipt* в зразках ДНК, виділеної з чистої культури *A. tumefaciens* (1, 2), рослин хмелю сорту Альта з візуальними симптомами ураження (3–6) та без симптомів (7–9). М — маркер молекулярної маси рГЕМ. Стрілкою вказано фрагменти ампліфікації гена *ipt* розміром 427 п. н.

Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного містить етапи: виділення та очищення тотальної ДНК з тканин хмелю; ПЛР-аналіз генів *ipt* і *virD2*, що відповідають за патогенність та вірулентність; гель-електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації, їхньої візуалізації та врахування результатів. Дана біотехнологія є надійним та ефективним підходом для експрес-діагностики бактеріального раку хмелю звичайного на ранніх стадіях патогенезу.

Отже, перевагами молекулярної діагностики фітопатогенів є безпосереднє виявлення в пробі генетичного матеріалу збудника (його ДНК), визначення видового складу збудників, виявлення токсиногенних грибів, отримання результатів у стислі терміни (2–3 дні), специфічність і висока чутливість методу.

**Висновки.** Розроблені системи молекулярних маркерів для детекції фітопатогенних грибів на рівні родів *Fusarium* та *Alternaria*, видів *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. brassicae*, *F. macroceras*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*, *Plasmopara halstedii*, а також агробактерії *Agrobacterium tumefaciens*. ДНК-тестування може бути корисним для моніторингу ступеня ураженості рослин у польових умовах, для діагностики інфекції, що протікає на ранніх стадіях патогенезу чи у прихованій формі, для експрес-контролю якості рослинної та харчової продукції на наявність інфекції та потенційну токсичність. Визначена доцільність використання дуплексної ПЛР для зниження матеріальних та часових витрат.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. loos R. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds / R. loos, L. Laugustin, S. Rose [et al.] // Plant Pathology. — 2007. — Vol. 56. — P. 209–218.
2. Солоденко А. Е. Детекция возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника с помощью ДНК-маркера / А. Е. Солоденко // Вісник Запорізького національного університету (Біологічні науки). — 2013. — № 3. — С. 5–10.
3. Долгова Е. М. Экспресс-метод оценки подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе / Е. М. Долгова, З. К. Аладьина, В. Н. Михайлова // Селекция и семеноводство. — 1990. — Вып. 68. — С. 50–55.
4. Деревянко О. А. Молекулярные маркеры геномов фузариий для определения инфицированности зерна кукурузы / О. А. Деревянко, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Зб. наук. пр. «Фактори експериментальної еволюції організмів». — 2006. — Т. 3. — С. 93–97.
5. Кожухова Н. Е. Молекулярно-генетична ідентифікація мікотоксичних фузаріїв / Н. Е. Кожухова, О. О. Захарова, Ю. М. Сиволап // Одеський медичний журнал. — 2007. — № 6. — С. 54–56.
6. Захарова О. О. ПЛР-аналіз мінливості геному та розробка технології ідентифікації грибів роду *Fusarium* / О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 2 (3). — С. 48–54.
7. Баранов Ю. О. ПЛР-детекція *Alternaria* spp. в насінні кукурудзи / Ю. О. Баранов, Н. Э. Кожухова // Тези V Міжнар. наук. конф. «Молодь та поступ біології» 12–15.05.2009 р.. — Львів, 2009. — С. 94.
8. Баранов Ю. О. ПЦР-маркеры на основе генов рибосомной РНК для детекции *Alternaria* spp. / Ю. О. Баранов, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Тезиси 14 Междунар. пушинской школы-конф. молодых ученых «Биология — наука XXI века». — Пущино : РФ, 2010. — Т. 1. — С. 227–228.
9. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична детекція грибів роду *Fusarium* у зерні кукурудзи (*Zea mays* L.) : Методичні рекомендації / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, О. О. Захарова. — Одеса, 2007. — 8 с.
10. Zakharova O. Express-detection systems development of *Fusarium* fungi in maize food products / O. Zakharova, K. Hiluk, A. Trigub [et al.] // Тези III Міжнар. конф. молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Еволюція. Адаптація» 15–18.05.2007 р.. — Одеса. — С. 233.



11. Білоіваненко С. О. ПЛР-детекція *Fusarium* spp. у ґрунті / С. О. Білоіваненко, Н. Е. Кожухова // Зб. наук. статей V Міжнар. наук. конф. «Геном рослин» 13–16.10.2008. — Одеса, 2008.. — С. 51–54.
12. Балашова И. А. Применение дуплексной ПЦР для детекции трихотеценовых генов *Tri 5* и *Tri 6* у грибов рода *Fusarium* / И. А. Балашова, О. В. Бабаянц, Г. А. Звездин, Т. М. Корня, Ю. М. Сиволап // Тези конф. «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (Геном рослин VI)». — Одеса, 2010. — С.13.
13. Kujik T. Development of a duplex PCR assay for the simultaneous detection of fusarium poae and fusarium sporotrichioides from wheat / T. Kujik // J. Plant Pathology. — 2008. — V. 90 (3). — P. 441–447.
14. Abd-Elsalam K. A. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data / K. A. Abd-Elsalam, I. N. Aly, M. A. Abdel-Satar [et al.] // African J. Biotechnology. — 2003. — Vol. 2 (4). — P. 82–85.
15. Fakhfakh M. M. Identification and pathogenicity assessment of *Fusarium* spp. sampled from durum wheat fields in Tunisia / M. M. Fakhfakh, A. Yahyaoui, S. Rezgui [et al.] // African Journal of Biotechnology. — 2011. — Vol. 10 (34). — P. 6529–6539.
16. Haas J. M. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J. M. Haas, L. W. Moore, W. Ream [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — Vol. 61, № 8. — P. 2879–2884.
17. Кожухова Н. Е. Спосіб детекції збудника бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* у хмелю звичайного / Н. Е. Кожухова, А. М. Венгер, Ю. М. Сиволап. Патент на корисну модель. — 2011. — Бюл. № 24. — 6 с.

Надійшла 22.05.2015.

UDC 57.08:632.08

**Volkova N. E., Solodenko A. Ye., Balashova I. A., Zakharova O. O., Venger A. M.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **MOLECULAR DETECTION OF CAUSAL AGENTS OF CROPS INFECTIOUS DISEASES**

Molecular markers were used for detection of crops pathogens: *Fusarium* and *Alternaria* spp. — for maize and soft wheat, *Plasmopara helianthi* — for sunflower, *Agrobacterium tumefaciens* — for hop. The feasibility of duplex PCR using was established.

УДК 57.08:632.08

**Волкова Н. Э., Солоденко А. Е., Балашова И. А., Захарова О. А., Венгер А. Н.**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР**

Молекулярные маркеры апробированы для детекции возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур: грибов рода *Fusarium* и *Alternaria* — для кукурузы и пшеницы мягкой, *Plasmopara helianthi* — для подсолнечника, агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* — для хмеля обыкновенного. Показана целесообразность использования дуплексной ПЦР.

## **СЕЛЕКЦІЯ ТА НАСІННИЦТВО**

УДК 575.113:575.015.3:633.11

М. А. ЛИТВИНЕНКО, д. с.-г. наук, акад. НААН, зав. від.  
СГІ– НЦНС, Одеса  
e-mail: dr\_litvin@ukr.net

### **БІОТЕХНОЛОГІЧНІ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ У СЕЛЕКЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ**

*Обговорено стан, проблеми і напрями застосування біотехнологічних молекулярно-генетичних методів у селекції сільськогосподарських культур в Україні. Включення цих методів у селекційний процес може підвищити ефективність селекційної роботи.*

Ключові слова: селекція, с.-г. культури, молекулярні маркери, новий етап в селекції.

**Вступ.** Терміном «біотехнологія» в широкому розумінні визначають сукупність методів для виробництва нових видів продукції з використанням різних біологічних об'єктів. Традиційна селекція с.-г. культур також є біотехнологічним процесом, що базується на існуючих методах створення генетичного різноманіття, оцінки та добору бажаних генотипів. Через недосконалість цих методів створення нового сорту самозаймих культур триває 10–12 і більше років і ґрунтується, в основному, на комбінуванні генів, які ідентифіковані в колекційних і селекційних зразках.

При внутрішньовидовій і віддаленій гібридизації найбільш складними обмежувальними факторами в селекції є: передача бажаних генів водночас з небажаними; введення одного цінного гена супроводжується втратою іншого; зчеплення генів ускладнює можливості відокремлення позитивних ознак від шкідливих. Тому основним завданням, яке стоїть перед селекціонером, є поєднання в одному генотипі якомога більшої кількості цінних ознак і властивостей.

У пошуку сортоутворюючих рекомбінантів селекціонер вивчає матеріал у великих обсягах (десятки тисяч номерів), досягаючи гомозиготності (однорідності) багаторазовим пересівом гібридів, створюючи відповідні фони добору. Керування спадковістю та добір за генотипом здійснюються у вузькообмежених рамках, а індукція нових генів з застосуванням фізичних та хімічних мутагенних факторів взагалі є некерованим процесом. Більшість експериментальних мутацій є наслідком складних хромосомних перебудов, які викликають зниження життєздатності рослин і їхньої генетичної стабільності. Надзвичайно рідко виникають

позитивні мутації. Як правило вони супроводжуються плейотропними ефектами негативних спадкових змін. Розірвати цей зв'язок надзвичайно складно.

Але за допомогою сучасної біотехнології багато з цих питань вже вирішуються. Сучасна біотехнологія базується на методах генної (генетичної) інженерії, які дозволяють передавати один або кілька генів від одного генотипу до іншого, причому донор і реципієнт не обов'язково мають бути одного виду чи токсона. Це різко збільшує різноманіття за певними ознаками, прискорює процес отримання рослин із бажаними, програмованими властивостями, а також, що особливо важливо, забезпечує можливість відслідковувати генетичні зміни і їхні наслідки.

У міжнародному плані біотехнологічні молекулярно-генетичні дослідження відносяться до пріоритетних областей біологічної і сільськогосподарської науки. У розвинутих країнах та провідних фірмах для ведення цих досліджень створені спеціалізовані біотехнологічні центри, на роботу яких виділяють величезні кошти, що й забезпечує уже значні результати. В Україні біотехнологічні і молекулярно-генетичні дослідження ведуться в інститутах біологічного профілю, переважно на рівні розробки теоретичних завдань, тобто без суттєвого практичного впровадження їх у селекцію сільськогосподарських культур. І лише з 1968 року, із створенням у Селекційно-генетичному інституті першої на теренах колишнього Радянського Союзу спеціалізованої лабораторії генної інженерії, сталися значні зміни. Організатором і керівником нової лабораторії став молодий вчений (після однорічного стажування в США) Юрій Михайлович Сиволап. Більше 40 років ця Людина, Вчений з великої літери, віддав розвитку молекулярної генетики в Україні. Він особисто і його колектив з величезним ентузіазмом і наполегливістю проводили глибокі дослідження геномів сільськогосподарських культур на молекулярному рівні, створивши основу для використання молекулярно-генетичних методів у селекції [1]. Як фундатор цього напрямку науки, академік НААН Ю. М. Сиволап зробив величезний внесок у становлення системи молекулярно-генетичних досліджень у наукових установах НААН.

**Основна частина.** Найбільш перспективним напрямом, який бурхливо розвивається у багатьох відомих наукових установах і фірмах світу, — це розробка біотехнологій з отримання генетично модифікованих рослин (ГМ-рослин). Доступна інформація свідчить, що ці технології дозволяють створювати сорти і гібриди сільськогосподарських культур із принципово новими спадковими ознаками, які кардинально змінюють господарсько-біологічний потенціал с.-г. культур. У поєднанні з спеціально розробленими технологіями вирощування це забезпечує значне підвищення продуктивності, якості продукції та стійкості до факторів довкілля. На сьогодні у світі створені і доведені до випробувань у польових умовах ГМ-форми с.-г. рослин, які відносяться до більш як 50 видів. Так,

отримані трансгенні форми томатів (понад 260), сої (>200), бавовнику (>150), гарбузових (>80), тютюну (>80), а також пшениці, рису, соняшнику, огірків, салату, яблунь та інших фруктових дерев (>70). Крупномасштабне промислове виробництво ГМ-рослин розпочалося у 1996 році, на той час у світі трансгенними культурами було засіяно 1,7 млн га. За період з 1996 по 2014 рік площі, зайняті трансгенами, зросли у 75 разів і досягли 130 млн га [1].

Країни і фірми, які успішно реалізують програми біотехнологічних досліджень з отримання ГМ-сортів (гібридів) с.-г. культур, стають лідерами у виробництві окремих видів с.-г. продукції, зокрема — кукурудзи, сої, бавовнику, картоплі. В числі восьми країн, де під посівами одержаних біотехнологічними методами культур були найбільші площі, знаходяться: США (49,8 млн га), Аргентина (17,1 млн га), Бразилія (9,4 млн га), Канада (5,8 млн га), Китай (3,3 млн га), Парагвай (1,8 млн га), Індія (1,3 млн га), Південно-Африканська республіка (0,5 млн га). У відомих наукових виданнях та на міжнародних симпозиумах у переважній більшості робіт біологічного напрямку подається інформація з молекулярної біології та біотехнології. Абсолютно очевидно, що країни, які не займаються розробкою цих напрямів, поступово відставатимуть і врешті-решт залишаться за порогом світового прогресу.

На жаль, в Україні, крім розмов і дискусій стосовно того, займатись чи не займатись дослідженнями з біотехнології і отримання ГМ-рослин діло вперед майже не просувається. Малоімовірно, що будуть успішними також спроби використати ГМ-конструкції зарубіжних фірм, адже вони створюються з певним рівнем адаптації до конкретних умов вирощування. Індукція ГМ-конструкцій із заданими цінними ознаками і введення їх у місцевий генофонд с.-г. культур є винятково актуальним завданням біотехнологічних досліджень. У розвитку цього напрямку найбільш зацікавлені вітчизняні селекціонери. Адже по кожній культурі, з якою не велась би селекційна робота, найважливішою і дедалі гострішою стає проблема створення саме оригінальних генетичних джерел господарсько і біологічно цінних ознак. В той час, коли йдуть розмови про медичні наслідки використання с.-г. продукції з ГМ-сортів та ще й за відсутності законодавчої бази, насіння трансгенних сортів сої, кукурудзи, картоплі нелегально потрапляють на ринок України і безконтрольно впроваджуються у виробництво.

Останніми роками з'являються обнадійливі результати досліджень вітчизняних вчених з створення вихідного матеріалу для селекції ріпаку ярого і озимого, буряку цукрового, кукурудзи і соняшнику шляхом апробації агробактеріальної трансформації *in planta* [2, 3].

Дослідження з розробки біотехнологій отримання ГМ-рослин надто затратні, вони потребують спеціального обладнання і належної підготовки фахівців. Це і є тією основною проблемою, яка стримує розвиток перспективного напрямку. У цьому можна переконатися навіть з побіжного

огляду використання бюджетних коштів країни. При створенні і відповідному законодавчому затвердженні програми досліджень з сільськогосподарської біотехнології можна було б забезпечити хоча б один рослинницький біотехнологічний центр усім необхідним. Проте й цього не спостерігається.

Не можна не погодитись з пропозицією, яка інколи висловлюється в порядку дискусії, про перерозподіл незначних бюджетних коштів, які виділяються на селекцію сільськогосподарських культур, і спрямувати частину з них на біотехнологічні дослідження. На жаль, при відсутності чітких механізмів реалізації вітчизняного законодавства з охорони прав на сорти рослин, на даному етапі селекція сільськогосподарських культур в Україні не може розвиватись на самофінансуванні. Отож згортання бюджетного фінансування селекційних досліджень призведе до їх призупинення, а в ряді випадків — й до повної руйнації. Недопустима втрата країною провідних світових позицій в селекції озимої пшениці, озимого і ярого ячменю та інших культур. Результат неважко передбачити — експансія на нашу територію зарубіжних сортів. Та і наймовірно, що вивільнені описаним вище чином кошти будуть достатніми для ефективних біотехнологічних досліджень. А поки що країна втрачає підготовлених молодих фахівців, які могли б займатись біотехнологічними дослідженнями — вони виїждять за кордон і успішно працюють у провідних наукових установах США, Канади, Франції, Англії та інших країн.

Із того фінансування, яке виділяється в системі НААН на біотехнологічні дослідження в рослинництві, сьогодні є доступними і найбільш ефективними роботи з використання молекулярних маркерів у селекції. Адже, якщо поглянути на сучасні світові селекційно-генетичні дослідження, то основу їх складають пошуки молекулярних маркерів цінних ознак [1]. Відділ загальної і молекулярної генетики

СГІ–НЦНС за рівнем забезпечення устаткуванням, освоєнням сучасних методик, підготовкою фахівців може ефективно виконувати такого напрямку дослідження. У цьому відділі спільно із науковцями СГІ здійснено ряд досліджень з маркування генів типу розвитку — *Vrn*, потреби в яровизації — *Vrd*, фотоперіодичної чутливості — *Rpd*, стійкості до хвороб та інших важливих генетичних систем у озимої м'якої і твердої пшениці, ячменю, кукурудзи та інших культур.

Для проведення таких досліджень треба перш за все чітко визначитись із вибором тих ознак, які селекціонер не в змозі контролювати традиційними і відносно дешевими методами. Крім того, для розробки молекулярних маркерів цих ознак повинні передувати великі багаторічні генетичні дослідження традиційними методами гібридологічного чи цитологічного аналізу та створення спеціального матеріалу ізогенних, абсолютно гомозиготних дигаплоїдів чи гібридно-інбредних ліній, що відрізняються за певними ознаками. Слід також мати на увазі, що молекулярні маркери працюють тільки на окремих генетичних пулах.

Але при їх відпрацюванні відкривається можливість селекціонеру науково обґрунтовано підбирати батьківські форми для гібридизації, комбінувати цінні ознаки і властивості з позитивним генетичним ефектом збільшення їх експресії, вести ефективно добір бажаних генотипів, зменшуючи до певного розрахункового оптимального об'єму опрацювання селекційного матеріалу, цілеспрямовано збагачувати цінними генами гібридні популяції і т. д. Тобто, ця робота має комплексний характер і може виконуватись за участі селекціонерів, класичних генетиків та спеціалістів з молекулярної генетики.

Прикладом такого комплексного дослідження може бути робота, яка виконується у відділі селекції і насінництва пшениці СГ–НЦНС з вивчення селекційної цінності пшенично-житніх транслокацій 1AL/1RS, 1BL/1RS та інших чужорідних включень у геном пшениці [4].

З застосуванням методу культури пиляків для індукції подвоєних гаплоїдів (лабораторія культури тканин) та ідентифікації транслокацій з допомогою молекулярних маркерів (відділ загальної і молекулярної генетики) удосконалено технологію селекційного процесу в напрямі скорочення терміну створення нових сортів на 4–5 років та підвищення ефективності селекційної роботи з генотипами, які несуть чужорідні включення, на 20–30 %. За цією технологією уже створено і передано на державне сортовипробування чотири сорти пшениці м'якої озимої універсального типу: Житниця одеська, Дума одеська, Октава одеська, Ліга одеська — з високим рівнем урожайності (8,6–10,4 т/га), цінні і сильні за якістю зерна і добре вираженими ознаками стійкості до біотичних та абіотичних факторів.

Використання біотехнологічних методів і молекулярних маркерів у селекції сільськогосподарських культур найбільш доцільно в тих випадках, коли виникає необхідність швидкого залучення в генофонд селекційного матеріалу нових генів чи генетичних систем.

Слід застерегти, що застосування молекулярних маркерів ні в якому разі не замінює традиційних методів селекції, а тільки доповнює селекційний процес наукоємними методами контролю генотипів за певними ознаками. Через досить високу вартість молекулярно-генетичні методи неможливо впроваджувати в увесь великий об'єм селекційного матеріалу. Тому не слід допускати некомпетентних заяв, що молекулярні методи здатні в сотні разів скоротити об'єми селекційної роботи і одночасно підвищити її ефективність.

Окремо виникає питання з приводу доцільності паспортизації сортів, ліній, генетичного і селекційного матеріалу методами молекулярної генетики [1]. Кілька років поспіль питання застосування цих методів у системі ідентифікацій сортів обговорювалось у міжнародній Європейській організації з захисту прав на сорти рослин (UPOV). Але й досі позитивного рішення з цього питання не прийнято. Основні аргументи: висока вартість аналізів, не всі члени UPOV їх можуть виконувати, а також наявність

достатньої кількості уже прийнятих морфологічних ознак та біохімічних маркерів для визначення основних принципів захисту прав на селекційні досягнення — однорідність, відмінність, стабільність.

Тому необхідність паспортизації сортів існує на державному рівні під керівництвом Інституту експертизи сортів рослин України. Щоправда, у цьому плані, перш за все, треба досягти такої ситуації, щоб сорти, які заносяться до Державного реєстру, відповідали вимогам однорідності. Оскільки більша частина сортів самозапильованих культур є гетерогенними, тобто складаються вони з двох і більше біотипів, то паспортизація з допомогою молекулярних формул залишається проблематичною [5]. Водночас необхідність її проведення стає дедалі актуальнішою, перш за все потреби дотримання законів про захист прав на сорти, насіння і садивний матеріал. Адже на вітчизняному ринку сортів і насіння виявляється велика кількість порушників цих законів. І у цьому зв'язку найбільш вагомими доказовими аргументами, які можуть належно захистити інтелектуальну власність селекціонерів, мають стати генетичні формули генотипів, визначені методами молекулярної генетики. Отже, паспортизація сортів самозапильованих культур і батьківських ліній гібридів перехреснозапильованих культур — стає надактуальним завданням.

Впровадження паспортизації сортів стримується також невизначеністю фінансування цих досліджень. Вітчизняні приватні селекційні установи, безумовно, виконуватимуть вимоги Інституту експертизи сортів рослин України й оплатять молекулярно-генетичну ідентифікацію сортів (ліній), але невідомо, як поставляться до цього зарубіжні фірми, які керуються в своїй діяльності вимогами UPOV. Паспортизацію сортів державних наукових установ, на наш погляд, доцільно профінансувати за рахунок спеціальних бюджетних коштів.

У вітчизняних селекційних установах паспортизації на рівні ДНК-технологій мають підлягати, крім комерційних сортів, також експериментально створені генотипи з винятково оригінальними ознаками, що мають високу наукову чи комерційну цінність. Результати можуть скласти державну базу даних генофонду сільськогосподарських культур, яку завжди можна використати для вирішення наукових, правових, господарських завдань та проблем судової експертизи.

Заслуговує на увагу, з точки зору використання в селекції, ще один напрям біотехнологічних досліджень — отримання генетичних регенерацій у культурі *in vitro* пиляків, клітин, зародків та індукцій гаплоїдів і дигаплоїдів. Світовий досвід досліджень із зерновими культурами викристалізував найбільш ефективні з них: культура зародків переважно при інтрогресивній селекції, для отримання життєздатних гібридів від віддалених схрещувань — отримання первинних тритикале та індукція соматоклональних варіантів; суспензійна культура і створення селективних середовищ для добору на рівні клітин за ознаками стійкості до окремих токсинів — збудників фітозахворювань; гаплопродукція і отримання



дигаплоїдів з метою швидкої гомозиготації та прискорення селекційного процесу [6].

На кожному із цих напрямів уже є певні практичні результати в багатьох наукових установах України і за кордоном. Найбільш вагомі досягнення отримали там, де розроблені біотехнологічні методики теоретичних лабораторій переносяться на потік масового застосування в селекційні підрозділи. Для цього створюються групи фахівців-біотехнологів, які добре володіють методиками, працюють безпосередньо з селекційним матеріалом спільно з керівником програми. Наприклад, в Інституті с.-г. досліджень Угорської Академії наук (м. Мартонвашар) така група спеціалістів у відділі селекції пшениці уже багато років поспіль на працює селекційний матеріал методами індукції андрогенних дигаплоїдів у культурі пиляків у такій же кількості (2,5–3,0 тис. дигаплоїдів щорічно), як і традиційними методами. Результативність селекції з використанням біотехнологічних методів при цьому в 1,5 рази вища, ніж при традиційній селекції, а створення нового сорту в часі скорочується з 8–10 до 5–6 років.

Наш уже давній досвід співпраці ще з лабораторією біотехнології СГІ з використанням тотіпотентності мікроспор в культурі пиляків для отримання дигаплоїдів озимої м'якої пшениці дав позитивний результат. Нами (С. О. Ігнатова, М. А. Литвиненко) було ідентифіковано генотипи пшениці з підвищеною здатністю до гаплопродукції, на їхній основі щорічно індукувалось на культурі пиляків із гібридів  $F_1$  250–300 дигаплоїдів. Навіть за цих невеликих об'ємів отримання дигаплоїдів було напрацьовано цінний вихідний матеріал для селекції з адаптованою екзотичною геноплазмою. З використанням ліній дигаплоїдного походження — Еритроспермум 1083 та Еритроспермум 2783 у гібридизації з місцевими сортами створені і вже занесені до Державного реєстру: сорт озимої м'якої пшениці Знахідка одеська з унікальним поєднанням ультраскоростиглості, високої продуктивності та зимостійкості; сорт Сирена одеська, який при генетичному потенціалі врожайності понад 100 ц/га вирізняється витривалістю до низьких агрофонів та особливо дефіциту фосфору в ґрунті (фосфорефективний сорт); сорт Зорянка одеська, який не був занесений до Реєстру, але слугував батьківською формою в гібридизації при створенні сортів Заграва одеська, Заможність одеська. Позитивний практичний результат у селекції ярого ячменю з використанням біотехнологічних методів досягнуто і в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва.

При цьому треба реально оцінювати можливість методів культури *in vitro* і доцільність їх використання як додаткових до традиційних для вирішення певних задач:

1. Для прискорення адаптації нових генів у місцевому генофонді, генів, які контролюють цінні ознаки від віддалених схрещувань, екзотичної геноплазми. Селекційний процес при цьому скорочується завдяки прискореній гомозиготизації матеріалу (майже в 2 рази).

2. Підвищення ефективності добору на селективних середовищах, наприклад, на стійкість до токсинів фузаріозних і гельмінтоспориозних грибів.

Ці роботи можна було б розвивати в рамках комплексної біотехнологічної програми. Але матеріальні та фінансові можливості, якими володіють на сьогодні селекційні установи НААН, не дозволяють отримувати скільки-небудь раціональний об'єм дигаплоїдів для подальшої селекційної роботи.

**Висновки.** Дослідження з молекулярної генетики, розробки біотехнологічних методів необхідно розвивати з чіткою спрямованістю на вирішення конкретних наукових і практичних завдань у селекції рослин.

Розроблені в СГІ–НЦНС ефективні методи ДНК-технологій, культури *in vitro* знаходяться на доволі високому рівні, при відповідному фінансовому забезпеченні можуть бути впроваджені в селекційну насінницьку практику, а також застосованими при паспортизації генофонду сільськогосподарських культур.

Як приклад комплексного дослідження з ефективного використання біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів є робота відділу селекції і насінництва пшениці СГІ–НЦНС з вивчення та швидкого включення в генофонд селекційного матеріалу пшенично-житніх транслокацій та інших чужорідних включень.

Організація і забезпечення в Україні досліджень з розробки біотехнологічних методів отримання генетично модифікованих (ГМ) рослин є винятково необхідною умовою запобігання можливій науковій відсталості країни в подальшому генетичному удосконаленні сільськогосподарських культур.

Необхідні кардинальні зміни в плануванні, фінансуванні та проведенні досліджень з розробки новітніх біотехнологій у рослинництві на основі державної законодавчо затвердженої комплексної наукової програми.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сиволап Ю. М. Вариабильность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календарь. — Одесса : Астропринт, 2011. — 336 с.
2. Богульська С. В. Апробація агробактеріальної трансформації форм озимого ріпаку методом *in planta* / С. В. Богульська // Агронія і біологія. — Суми, 2014. — Вип. 3, № 27. — С. 179–181.
3. Богульська С. В. Спосіб агробактеріальної трансформації рослин *in planta* / С. В. Богульська // Матеріали Міжнар. наук. конф. «Збагачення генетичного різноманіття рослин». — Харків, 2014. — С. 26–27.
4. Литвиненко М. А. Вплив трансформації 1AL/1RS на елементи продуктивності у популяціях  $F_2$  та лініях  $F_4$  пшениці м'якої озимої / М. А. Литвиненко, М. М. Топал // Зб. наук. пр. СГІ — НЦНС. — Одеса, 2013. — Вип. 22 (62). — С. 27–37.
5. Рибалка О. І. Генетична гетерогенність сортів пшениці за алельним складом Gli/Dlu-локусів / О. І. Рибалка, М. В. Червоніс, М. А. Литвиненко // Вісник аграрної науки. — 2008. — С. 54–59.

6. Adien Pratar, Jitendra Kumar. Alien Gene Transfer in crop Plants Volume 1 (Innovations, Methods and Risk Assessment). — Springer. — 2014. — P. 311.

Надійшла 04.06.2015.

UDC 575.113:575.015.3:633.11

**Lytvynenko M. A.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **OF BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR METHODS IN BREEDING OF AGRICULTURAL CROP IN UKRAINE**

Most perspective approach of using biotechnological methods *in vitro* and molecular marker in breeding of agricultural crops are considered. The results of investigation for bread winter wheat breeding technology improvement by using double haploids method and molecular marker of wheat-rye translocation are represented. On the base of this technology four new universal type varieties of wheat has been created.

УДК 575.113:575.015.3:633.11

**Литвиненко Н. А.**

### **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В УКРАИНЕ**

Рассмотрены наиболее перспективные направления использования биотехнологических методов *in vitro* и молекулярных маркеров в селекции сельскохозяйственных культур. Представлены результаты исследований по усовершенствованию технологии селекционного процесса озимой мягкой пшеницы с использованием методов получения удвоенных гаплоидов и молекулярных маркеров пшенично-ржаных транслокаций. На этой основе создано четыре сорта пшеницы универсального типа — Житница одеська, Дума одеська, Октава одеська, Лига одеська.

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

<sup>1</sup>А. О. БЕЛОУСОВ, д. б. н., с. н. с., зав. лаб.,

<sup>1</sup>В. М. СОКОЛОВ, к. с.-г. н., член-кор., в. о. дир-а ін-ту,

<sup>1,2</sup>В. П. ДОМЕНЮК, к. б. н., наук. співроб.

СГІ–НЦНС, Одеса

<sup>2</sup>Caris Life Sciences, USA

e-mail: belanat@ukr.net

## **ВИКОРИСТАННЯ MAS-ТЕХНОЛОГІЇ В СЕЛЕКЦІЇ КУКУРУДЗИ (*Zea mays* L.) НА ГЕТЕРОЗИС**

*Розроблено MAS-технологію прогнозування фенотипових параметрів сегрегуючої популяції кукурудзи за кількісними ознаками. Обґрунтовано алгоритм генетико-статистичного зв'язку між генетичними маркерами і QTL, який розглядається як функціональна основа розробленої ДНК-технології. Показано, що ефективність запропонованого ДНК-прогнозу ( $r = 0,5–0,83$ ) залежить від генетичних особливостей кількісної ознаки та типу використовуваних маркерів.*

Ключові слова: кукурудза, ДНК-маркери, спосіб прогнозування, кількісні ознаки, популяція рекомбінантних ліній.

**Вступ.** З часу першого опису структури ДНК (понад 60 років тому) дослідники докладали значних зусиль задля виявлення генетичного розмаїття (ДНК поліморфізму) за локусами цінних кількісних ознак. Ставилося за мету прискорення і підвищення ефективності добору рослин з корисними ознаками. В наш час цей напрям молекулярно-генетичних досліджень, заснований на застосуванні технології ДНК-маркерів, сформувався як концепція MAS-добору — marker assisted selection [1–2]. У результаті подальшого розвитку методів молекулярного маркування геному розробляються нові підходи з дослідження цієї проблеми, зокрема геномний добір (GS — genomic selection) [3–4], який дозволяє добирати безпосередньо функціональні поліморфи (QTL).

Одним з головних завдань маркерної селекції є ефективно генетичне поліпшення різних типів популяцій (синтетичних, сегрегуючих, ліній подвоєних гаплоїдів, рекомбінантних інбредних ліній — РІЛ) і створення в короткий термін на їхній основі маркерних інбредних ліній та високопродуктивних гібридів кукурудзи. Враховуючи широкомасштабні затрати економічних ресурсів і часу, яких потребує сучасна селекція, важливим підходом є також розробка ефективних методів прогнозування результатів добору застосуванням молекулярних маркерів як сучасного інструменту у вирішенні актуальної проблеми. Успіх у цьому напрямі відкривав

би можливість добирати найцінніші генотипи і апіорі ще до висіву визначати фенотипові параметри кращих гібридів, ліній чи популяцій.

Аналіз наукових робіт, присвячених цій темі, дозволяє зробити висновки, що об'єктами досліджень з метою створення прогнозних моделей були найчастіше комбінаційна здатність ліній [5–6], а також продуктивність та рівень гетерозису гібридів кукурудзи [7–10]. Проте у сучасній фаховій літературі майже не зустрічаються роботи, присвячені розробці прогнозних моделей щодо визначення апіорі характеру розвитку важливих кількісних ознак у популяціях. Однак існує загально визнана думка про те, що вихідні популяції різних типів на всіх історичних етапах розвитку гетерозисної селекції завжди були найважливішим генетичним резервом мінливості, створення нових вихідних матеріалів, інбредних та подвоєних гаплоїдних ліній [11]. Тому прогнозування рівня розвитку цінних ознак у популяції наступної генерації без додаткового пересіву та генотипування видається, на наш погляд, актуальним завданням. Дослідженню цієї можливості присвячена дана робота.

**Мета досліджень** — підвищення ефективності селекційного процесу в кукурудзі шляхом розробки і використання сучасних ДНК-технологій, спрямованих на генетичне поліпшення популяцій, скорочення обсягів роботи та витраченого часу.

**Методика досліджень.** Як вихідний матеріал використовували розщеплені популяції (ГК 26 x Мо 17)  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ . У рослин оцінювали фенотипові показники за 16 кількісними ознаками, що мають селекційне та господарське значення: висота рослини, висота прикріплення качана, ширина листа, довжина волоті, величина розгалуженого простору волоті, кількість первинних розгалужень волоті, кількість рядів зерен у качані, маса 100 зерен, діаметр качана, довжина качана, довжина зернини, індивідуальна продуктивність, збиральна вологість зерна, вміст білка, вміст крохмалю, стійкість до вилягання. Детекцію поліморфізму ДНК здійснювали за допомогою SSR- та ISSR-різновидностей полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Методика виділення ДНК, ампліфікації SSR- та ISSR-локусів, а також усі наступні алгоритми технології описані в раніше опублікованих роботах [12–14]. Моделі прогнозування ґрунтувалися на певних варіантах регресійного аналізу, модифікованих відповідно до використаних генетичних параметрів. Модель прогнозування передбачала оцінку кількісних ознак у двох суміжних роках, оскільки середовищний фактор міг істотно трансформувати рівень прояву ознак і вплинути на результати прогнозу. З метою корекції паратипових ефектів рівень розвитку кількісних ознак визначали у форматі значення  $d$  — як показника відхилення від популяційної середньої.

**Результати досліджень.** Розробка моделі прогнозування фенотипових параметрів популяції наступної генерації передбачала проведення певної попередньої роботи. Було сформовано базу даних маркерного аналізу популяції за 16 кількісними ознаками, а також отримано підтвердження маркуючої здатності поліморфних локусів шляхом порівняння у

двох суміжних поколіннях характеру гаметичної нерівноваги за алелями цінних ознак батьківських генотипів і рекомбінантів  $F_2$ . Робоча гіпотеза передбачала виявлення шляхом регресійного аналізу певного зв'язку між ДНК-маркерами як незалежною перемінною (аргумент) і фенотипом кількісної ознаки — залежна перемінна (функція). З метою досягнення найбільшої прогнозувальної здатності запропонованої моделі важливо чітко дотримуватись умов формування маркерних тестових систем, які були описані нами раніше [12–14].

Важливим етапом було визначення формату значень незалежної і залежної перемінних. Для локусів SSR-маркерів (кодомінантних) незалежною перемінною були визначені генотипи, а закодовані як AA, AB, BB, для домінантних (ISSR) — відповідно A-, aa. Вони й склали градацію незалежної перемінної. Маркерними вважались тільки ті локуси, різниця між селективною вагою яких була статистично достовірною [15]. Селективна вага маркерного локусу розраховувалась як середнє значення фенотипової ознаки всіх особин популяції, які несуть один і той же маркерний генотип певного класу. Але треба було знайти такий формат незалежної перемінної, який інтегрував би показники усіх маркерних алелей певної ознаки і відображав певною мірою дію генотипу на конкретну ознаку. З цією метою було уведено поняття «загальна маркерна мітка» (ЗММ), яка інтегрує з одного боку маркерні алелі різних поліморфів та їхніх генотипових класів (AA, AB, BB, A-, aa) і відображає маркерний генотип особини за певної ознаки, з другого — відповідну зв'язану систему QTL, яка контролює фенотиповий прояв цієї ознаки. Формування ЗММ показано на прикладі ознаки «вміст крохмалю», що маркується двома ISSR- локусами: *isp5\_789* та *isp7\_797* (табл. 1).

Таблиця 1

Рекомбінаційні класи за ЗММ тестової системи *isp5\_789* — *isp7\_797*  
для ознаки «вміст крохмалю», %

Рекомбінаційні класи	Локус <i>isp5_789</i>		Локус <i>isp7_797</i>		Узагальнені фенотипові класи за ЗММ	Генотипові градації за ЗММ
	генотип	фенотип	генотип	фенотип		
1	A-	56,7	A-	56,7	56,7	1
2	A-	56,7	aa	51,6	54,2	3
3	aa	54,2	A-	56,7	55,4	2
4	aa	54,2	aa	51,6	52,9	4

Як показали наші попередні дослідження, для ефективного добору і прогнозування в тестову систему добирають маркери передусім і зокрема за такими критеріями: найбільш надійні, що тісно зчеплені з QTL; кодомінантні SSR-маркери, у яких фактичне розщеплення відповідає теоретичному.

Моделювання прогнозу результатів добору за ДНК-маркерами в популяції  $F_2$  представлено на прикладі ознаки «висота прикріплення кача-

на». Була розглянута можливість прогнозування високих її значень. Цьому завданню відповідало 6 маркерів. У результаті детального аналізу за критеріями ефективності було залишено тільки 3 маркери — два SSR і один ISSR. Але в подальшому виявилось, що ISSR-маркер не забезпечує наявності всіх необхідних рекомбінантних класів. Тому було сформовано 2-локусну тестову систему із двох SSR-маркерів: ps030 — phi083. Рекомбінантні градації за ЗММ, генотипи локусів тестової системи (у молекулярній масі поліморфного продукту), результати добору за генотипом та відповідні фенотипові класи (у форматі d — відхилення ознаки від популяційної середньої) наводяться в таблиці 2.

Таблиця 2

Рекомбінантні градації за ЗММ, генотипи локусів тестової системи (п. н.), результати добору за генотипом та відповідні фенотипові класи за показником d ознаки «висота прикріплення качана»

Градації за ЗММ	Вибірка генотипів	Генотип локусу ps030, п. н.	Генотип локусу phi083, п. н.	Середні значення d-показника для класів ЗММ за:	
				генотипом	фенотипом
0	18	112–112	170–178	–3,8	–3,1*
1	40	112–108	170–178	–3,1	
2	14	112–112	178–178	–2,4	
3	19	112–108	170–170	–0,7	–0,23*
4	26	108–108	170–178	–0,5	
5	10	112–112	170–170	0,5	
6	10	108–108	178–178	2,4	2,67*
7	27	112–108	178–178	2,6	
8	15	108–108	170–170	3,0	

\* Різниця з іншими фенотиповими класами суттєва при  $P \leq 0,05$ .

У  $F_2$  кількість рекомбінантів для всіх алельних сполучень двох SSR-локусів складає 9 класів. Усі вони були виявлені в досліді в статистично необхідній кількості. Як показують наведені дані, не кожна алельна зміна в QTL, яка контролюється через відповідний маркерний локус, може призводити до суттєвих фенотипових змін ознаки генотипових класів за ЗММ, наприклад, 0; 1; 2. Але сформовані фенотипові класи (–3,1; –0,23; 2,67), як і відповідні їм генотипові, достовірно ( $P \leq 0,05$ ) відрізнялися між собою. Подальший регресійний аналіз зв'язку між маркерним профілем генотипу ознаки у форматі ЗММ значень і її відповідними фенотиповими класами (у форматі d) дозволив розрахувати рівняння регресії:  $y = -3.1 + 2.85x$ .

Визначений коефіцієнт регресії ( $b = 2,85$ ) означає, що в результаті виявленого функціонального зв'язку між застосованою маркерною системою і локусами дослідженої ознаки при певній алельній зміні в значенні ЗММ висота прикріплення качана змінюється на 2,85 см. Цей зв'язок, виявлений в  $F_2$ , і був покладений в основу робочої гіпотези побудови моделі прогнозування рівня розвитку ознаки в наступній генерації —  $F_3$ .



$$y = -3,1 + 2,85 x; \quad b = 2,85 \pm 0,27$$

Рис. Теоретична лінія регресії  $y$  по  $x$ ;  $y$  — у показниках  $d$  (см) як відхилення від середньої у популяції  $F_2$ ;  $x$  — генотипові класи за ЗММ маркерної системи пс030 — рhі083; значення  $y$  для ознаки «висота прикріплення качана» знаходяться на перехресті лінії регресії з точками ЗММ на осі  $x$  (-3,1; -0,25; 2,6 см)

З цією метою було проведено генотипування популяції  $F_3$  за допомогою визначеної маркерної системи пс030 — рhі083. На основі розрахованого в  $F_2$  коефіцієнта регресії ( $b = 2,85$ ) і генотипових класів за ЗММ побудована теоретична лінія регресії для популяції  $F_3$  (рис.). Прогнозовані значення ознаки «висота прикріплення качана» в популяції  $F_3$  знаходимо на перехресті лінії регресії з ординатою  $y$  ( $d$  параметр), які дорівнюють -3,1; -0,25; 2,60 см відповідно до маркерних точок за ЗММ (0; 1; 2).

З метою перевірки прогнозувальної здатності розробленої моделі було оцінено рівень відповідності розрахованих прогнозних і фактичних значень висоти прикріплення качана у рослин популяції  $F_3$  (табл. 3).

Оцінка ефективності функціонування моделі прогнозування виявила середній ступінь зв'язку ( $r = 0,545$ ) між прогнозованими і фактичними значеннями ознаки «висота прикріплення качана». Ми перевірили ступінь надійності прогнозу рівня розвитку окремих важливих ознак за найбільш ефективними тестовими системами (табл. 4).

Для виявлення справжнього рівня зв'язку між прогнозованими і фактичними даними оцінювали коефіцієнт детермінації ( $r^2$ ). Найбільш надійним ( $r^2=0,69$ ) виявився прогноз для ознаки «величина розгалуженого простору волоті» за дволокусною тестовою системою рhі 083 — іsp7\_466 (SSR — ISSR маркери).



Таблиця 3

Результати перевірки відповідності прогнозних і фактичних значень ознаки «висота прикріплення качана» у рослин популяції  $F_3$ , генотипованих за тестовою системою nc030 — phi083

№ рос- лини	Значення d, см		№ рос- лини	Значення d, см		№ рос- лини	Значення d, см	
	за прогно- зом	фак- тичне		за прогно- зом	фак- тичне		за прогно- зом	фак- тичне
1	-3,1	-4,7	8	-0,25	-0,7	15	2,6	1,3
2	-3,1	0,3	9	-0,25	0,3	16	2,6	1,3
3	-3,1	-2,7	10	-0,25	2,3	17	2,6	2,3
4	-3,1	-0,7	11	-0,25	2,3	18	2,6	2,3
5	-3,1	-3,7	12	-0,25	-0,7	19	2,6	-2,7
6	-3,1	-2,7	13	-0,25	-1,7	20	2,6	8,3
7	-3,1	-2,7	14	-0,25	2,3	21	2,6	-2,7

$r = 0,545^* \text{ *P} < 0,01$

Таблиця 4

Ефективність прогнозу ( $r^2$ ) рівня розвитку окремих кількісних ознак у рослин популяції  $F_3$  на основі найбільш ефективних тестових систем молекулярних маркерів

Ознака	Тестова система маркерів	Коефіцієнт кореляції (r)	Коефіцієнт детермінації ( $r^2$ )
Висота прикріплення качана	nc030 — phi083	0,54*	0.29
Величина розгалуженого простору волоті	phi 083 — isp7_466	0.83*	0.69
Індивідуальна продуктивність	nc030 — isp7_594	0.50*	0.25

\* $P < 0,01$ .

Отже, рівень надійності прогнозу змінювався у межах  $r^2=25-69\%$ . Випадки низького (25 %) рівня відповідності прогнозу фактичним даним можна пояснити зчепленням деяких маркерів саме зі слабковпливовими структурними локусами, або недостатньо тісним зчепленням між ними: визначена відстань між маркерами і QTL змінювалась у межах 17,1–42,6 сМ. Вважається, що оптимальною для надійного MAS-добору, отже і прогнозу, є дистанція 5–20 сМ [16].

На основі наведеної молекулярно-генетичної моделі розроблено і запатентовано спосіб ДНК-прогнозування і добору в популяціях кукурудзи кращих генотипів з цінними кількісними ознаками [17].

### Висновки

Розроблений спосіб ДНК-прогнозування дозволяє добирати генотипи рослини з передбаченим рівнем розвитку цінних кількісних ознак у ранніх розщеплених гібридних популяціях і таким чином значно прискорювати процес добору та скорочувати обсяги селекційної роботи.

Реалістичний прогноз рівня розвитку цінних ознак рослин у популяції наступної генерації виявився можливим на основі моделі регресійного зв'язку між системою певних генетичних маркерів і відповідних QTL.

Найбільш ефективною виявилася модель дволокусної тестової системи на базі SSR та ISSR маркерів, яка забезпечувала рівень надійності прогнозу для певних ознак у межах  $r^2 = 29\text{--}69\%$ .

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lande R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits / R. Lande, R. Thompson // *Genetics*. — 1970. — 124. — P. 743–756.
2. Guimaraes E. P. Marker-assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish / E. P. Guimaraes, J. Ruane, B. D. Schert., A. Sonino, J. D. Dargie // *Food and agriculture organization of the united nations*. — Rome. — 2007. — 471 p.
3. Jannink J. Genomic selection in plant breeding: from theory to practice / J. Jannink, A. Lorenz, H. Iwata // *Brief Funct Genomics*. — 2010. — V. 9. — P. 166–177.
4. Albrecht T. Genom-based prediction of testcross values in maize / T. Albrecht, V. Wimmer, H-J. Auinger, M. Erbe, C. Knaak, M. Ouzunova, C-C. Schön // *Theor. Appl. Genet.* — 2011. — V. 123. — P. 339–350.
5. Charcoset A. Prediction of maize hybrid silage performance using marker data: comparisong of several models for specific combining ability / A. Charcoset, B. Bonnisseau, O. Touchebeuf, J. Burstin, P. Dubreuil, Y. Barriere, A. Gallais, J. B. Denis // *Crop Sci.* — 1998. — 38. — P. 38–44.
6. Ajmone-Marsan P. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as reveled by RFLP and AFLP markers / P. Ajmone-Marsan, P. Castiglioni, F. Fusari, M. Kuiper, M. Motto // *MGC Newsletter*. — 1998. — 72. — P. 19–20.
7. Bernardo R. Marker-assisted best linear unbiased predictionof single-cross performance / R. Bernardo // *Crop Sci.* — 1999. — 39. — P. 1277–1282.
8. Tobias A. Molecular marker based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses / A. Tobias, T. A. Shrag, E. Albrecht, A. E. Melchinger // *Theor. Appl. Genet.* — 2009. — V. 118. — P. 741–751.
9. Balestre M. Prediction of maize double cross- hybrids using the best linear unbiased prediction with microsatellite marker information / M. Balestre, R. G. Von Pinho, J. C. Souza // *Genetics and molecular research*. — 2011. — 10 (1). — P. 25–35.
10. Белоусов А. О., Сиволап Ю. М., Соколов В. М., Букреєва Н. І. Спосіб ДНК-прогнозування добору батьківських компонентів для отримання високопродуктивних гібридів кукурудзи. — Патент на корисну модель № 72116. — 2012. — 6 с.
11. Hallauer A. R. Methods used in developing maize inbreds / A. R. Hallauer // *Maydica*. — 1990. — V. 35. — P. 1–16.
12. Доменюк В. П. ДНК-маркирование количественных признаков у кукурузы / В. П. Доменюк, А. А. Белоусов, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика*. — 2002. — Т. 36, № 6. — С. 9–5.
13. Сиволап Ю. М. Генетичне поліпшення популяцій кукурудзи шляхом добору за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак : методичні рекомендації / Ю. М. Сиволап, В. М. Соколов, А. О. Белоусов, В. П. Доменюк. — Одеса, 2003. — 12 с.

14. Belousov A. A. Heterosis level of maize hybrids developed by using DNA technologies / A. O. Belousov, V. M. Sokolov, Yu. M. Sivolap, V. P. Domennyuk, N. I. Storcheus // Acta Agronomica Hungarica. — 2006. — 54. — P. 389–396.
15. Животовский Л. А. Интеграция полигенных систем в популяциях / Л. А. Животовский. — Москва : Наука, 1984. — 183 с.
16. Hospital F. More on the efficiency of marker-assisted selection / F. Hospital, L. Moreau, F. Lacoudre, A. Charcosset, A. Gallais // Theor. Appl. Genet. — 1997. — V. 95. — P. 1181–1189.
17. Белоусов А. О., Сиволап Ю. М., Соколов В. М., Доменюк В. П. Спосіб прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях злакових культур. — Патент на винахід № 86180. — 2009. — 8 с.

Надійшла 26.10.2015.

UDC 633.15:631.524:575.113:542.1

**Belousov A. O., Sokolov V. M., Domenjuc V. P.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **MAS-TECHNOLOGY USING IN MAYZE (*Zea mays* L.) BREEDING FOR HETEROSIS**

MAS-technology for prediction the segregating maize population phenotyping parameters of quantitative traits has been elaborated with using the molecular marker test system. The algorithm of the genetic-statistical connection between the genetic marker test system and QTL was proposed as a function base for the elaborated DNA technology. There has been shown, that the efficiency of the proposed DNA-prediction, calculated according to the coefficient determination ( $r^2$ ), was 29–69 % and depended on genetic peculiarities of quantitative traits and molecular markers type.

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

**Белоусов А. А., Соколов В. М., Доменюк В. П.**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ MAS-ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ КУКУРУЗЫ  
(*Zea mays* L.) НА ГЕТЕРОЗИС**

Разработана MAS-технология прогнозирования фенотипических параметров расщепляющейся популяции кукурузы по количественным признакам. Предложен алгоритм генетико-статистической связи между тестовой системой генетических маркеров и QTL как функциональной основы разработанной ДНК-технологии. Показано, что эффективность предложенного ДНК-прогноза, рассчитанного на основе значений коэффициента детерминации ( $r^2$ ), составляет 29–69 % и зависит от генетических особенностей количественных признаков и типа использованных молекулярных маркеров.

UDC 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

O. O. KOLESNYK, Ph. D., Yuniior Researcher,  
S. V. CHEBOTAR, Dr. Sc. (Biology), Leading Researcher, Senior Researcher,  
Corresponding-Member of NAAS,  
N. E. VOLKOVA, Dr. Sc. (Biology), Chief Researcher, Senior Researcher,  
M. S. BALVINSKA, Ph. D., Senior Researcher,  
A. E. SOLODENKO, Ph. D., Leading Researcher,  
O. V. GALAEV, Ph. D., Leading Researcher,  
PBGI–NCSCI, Odesa  
e-mail: emerald-olga@ukr.net

### **DNA TYPING OF AGRICULTURAL CROPS BY MICROSATELLITE ANALYSIS FOR THE PURPOSES OF GENOTYPE DIFFERENTIATION, IDENTIFICATION AND REGISTRATION**

*Principles of microsatellite marker systems for breeding and varieties investigation needs were analyzed basing on material of bread winter wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), maize (*Zea mays* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), hop (*Humulus lupulus* L.), rice (*Oriza sativa* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.). The key features of such microsatellite systems are their multi-allelic nature, reproducibility, high polymorphism, easy automation, and co-dominant inheritance. Attention is paid to determination of allelic state of agriculturally important genes that can be used as supplementary part of the existing molecular genetic formulas.*

*Key words: molecular markers, microsatellite analysis, variety investigation, identification, differentiation.*

**Introduction.** Nowadays the application of modern biotechnology to plant breeding is acknowledged to be more effective and quicker than conventional breeding techniques in the creation of new stable and more resistant crop varieties. Molecular markers are the modern strategy used to characterize the genetic diversity and redefine the plant genetic resources. Genetic improvement of wheat varieties depends on the existence of different diversified and preferable genes or alleles suitable for the environmental conditions of Southern steppe. However modern intensive plant breeding practices led to narrowing of genetic diversity in crop varieties. Knowledge of the genetic diversity, allelic composition of economically important loci, the genetic relationship between genotypes and their pedigrees is essential for breeding as well as for the best protection and saving of plant varieties in genetic collections and gene banks all over the world.

Enforcement of Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights Agreement (TRIPs) under World Trade Organization (WTO) has resulted in

worldwide shift from free exchange and unhindered exploitation to controlled access to plant genetic resources. Intellectual property rights of plant breeders need to be protected. A new plant variety requires novelty, denomination, distinctness, uniformity, and stability (DUS) to get registered for protection of plant breeder rights based on the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) regulations. The estimation of morphological characters is used for the DUS test and it is obvious to conduct several growing cycles at the fields or greenhouse for growth trials and to cultivate plants to complete ripeness.

A significant problem becomes determining the features of the variety structure, as well as the genetic monotony of lines and the typicalness of hybrids by assessment of plant morphological traits and conducting phenotypic tests in fields. Moreover, estimation of morphological traits has restrictions, such as subjectivity in the analysis of a morphological trait; their expression is affected by environmental factors or the technique of treatment, inability to reveal the distinctions between closely related genotypes, the opportunity of testing only adult plants, etc. The advantages of DNA markers are as follows: independence of the DNA sequence from the environmental conditions, presence of the same DNA in each plant cell which allows one to conduct studies on any tissues, a potential opportunity to receive an unlimited quantity of informative DNA markers, and an opportunity to analyze practically entire genome [1].

UPOV has constituted a Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA Profiling in Particular (BMT) to study the utility of molecular markers in the variety registration system which recommended [2–4] to use molecular techniques in establishing distinctness between candidate varieties. Molecular marker system is one of the most effective methods for DNA profiling of crop genotypes and assessing genetic diversity and relatedness among them [5]. Thus, a rapid and robust DNA marker technique has been used to identify cultivars for the DUS test [6]. DNA markers have many advantages to identify varieties due to their independence from environmental influences. The UPOV suggests that simple sequence repeat (SSR) markers are suitable for a DNA profiling database due to their multi-allelic nature, reproducibility, high polymorphism, easy automation, and codominant inheritance [4]. SSRs are present in both coding and noncoding regions [7, 8]. At the moment, among other molecular techniques SSR markers are widely used in plant breeding and genomic research and are the bases for mapping of genes and qualitative trait loci (QTLs), marker assisted breeding, phylogenetic studies and comparative genomics [9–11]. Microsatellite markers have been integrated into the molecular genetic maps of a number of plant species, and they have been successfully used to perform gene-mapping, population and evolutionary studies for the purpose of variety development [12].

In recent years, microsatellite markers have been widely used to screen, characterize and evaluate genetic diversity in cereal species [13–19]. In par-

ticular, microsatellite-based methods offer an attractive high-throughput and non-labor-intensive way to identify, differentiate and registry agricultural crop varieties, lines and hybrids according to fulfilling breeding programs. Furthermore, the development of molecular methods to efficiently identify additional agriculturally important genes has the potential to greatly improve modern varieties, and such methods would help accelerate the application of marker assisted selection (MAS) breeding in crop improvement programs.

The main objectives of this study are the following: (i) to outline the way of applying of DNA typing for the purposes of identification and registration of varieties; (ii) to provide the quantity of varieties, lines and hybrids of different agricultural crops which were DNA-typed by microsatellite markers; (iii) to outline the examples of molecular-genetic formulas given as passports to protect plant breeder's rights; and (iv) to provide examples of how markers of agriculturally important genes have been used to supply the existing molecular genetic formulas.

**Material and methods.** The analyzed material consists of varieties, lines and hybrids of such agricultural crops as bread winter wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), maize (*Zea mays* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), hop (*Humulus lupulus* L.), rice (*Oriza sativa* L.), five sorghum (*Sorghum bicolor* M.) species: grain sorghum (*S. bicolor*), sugar sorghum (*S. saccharatum*), broom sorghum (*S. technicus*), sudanka (*S. sydanense*), soryz (*S. oryoidum*).

Genomic DNA was extracted from seedlings using modified CTAB method [20]. Polymerase chain reactions (PCR) was performed on a Tertsyk thermocycler (DNA Technology, Russia) according to [13, 15, 16, 19, 21–28], with 35 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 50°C (55 or 60°C depending on the primer) and extension for 1 min at 72°C followed by a final extension step for 5 min at 72°C. PCR was carried out in a final reaction volume of 20–25 µL containing: 60 ng of DNA; 0.25 µM of each primer; 1 x PCR-buffer (40 mM Tris-HCl pH 8,4; 25 mM KCl; 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Tween-20); 0,2 mM of each dNTP; 1–2 unit of Taq-polymerase. The amplification products (10-µL aliquot of the PCR mixture) were separated in 7 % polyacrylamide gel in 1 x TBE using Huffer scientific instruments (USA). Visualization of PCR products was performed by the staining of gels in AgNO<sub>3</sub> according to «Silver sequence TM DNA Sequencing System Technical Manual» [29]. Image Master VDS video system (Amersham Pharmacia Biotech, USA) was used to assess the fragment size of the alleles at each microsatellite locus. The pUC19 DNA/Mspl and 100 bp DNA Ladder were used as standard ladders. Statistical processing of the results obtained was carried out by standard methods [30].

### Results and discussion

**The way of applying of DNA typing for the purposes of identification and registration of varieties.** A method for the identification of plant varieties by DNA typing has been first developed in South Biotechnology Center (National Academy of Agricultural Sciences) [31], which later be-

comes the department of general and molecular biology of Plant breeding and genetics Institute — National center of seed and cultivar investigation (PBGI–NCSCI). There the polymerase chain reaction (PCR) analysis was introduced by Acad. Yu. M. Sivolap to investigate the molecular–genetic polymorphism and the technology of the application of DNA typing for the identification and registration of varieties was developed and reported on the Seventh Session of the Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular of UPOV (Hanover, Germany. 21–23.11.2001) [32].

A molecular genetic formula of a variety is proposed [33]. In the mentioned formula, the tested variable locus is coded by a Latin letter, and the molecular mass of a detected allele is presented in the lower index. Thus, the formula consists of two parts. One of them is differentiating, which gives the opportunity to identify a variety, a line, or a hybrid. The second part contains data concerning the allelic condition of microsatellite loci. Such formula gives representation of the genetic structure of variety and the conformity of a variety to the UPOV requirements for monotony. The variety definition by DNA technology has incomparably larger productivity, opportunity for the objective evaluation of data, testing at all stages of ontogenesis, and other advantages in comparison to traditional methods based on phenotypic analysis (DUS tests). The use of 12–15 SSR loci gives the possibility to differentiate uniquely, identify and register varieties of wheat [34], barley [35–37], maize [38], sunflower [39, 40], sorghum [15, 41], rye [42], hop [19] and rice [13].

***Number of varieties, lines and hybrids of different agricultural crops which were DNA typed by microsatellite markers.*** A variety that consists of several genotypes and all the genotypes differ in the allelic composition, has a combination of biotypes and each of them differs in the molecular mass of alleles; each biotype of such variety is characterized by microsatellite loci that have certain alleles detected at appropriate loci; and it is desirable to determine the frequency of the occurrence of each of them in the variety [33]. A list of varieties, lines and hybrids which were DNA typed in the department of general and molecular biology (PBGI–NCSCI) is given in Table 1.

Information about genetic diversity pattern among modern varieties is essentially important for understanding direction of contemporary breeding and for further genetic improvement of varieties or creation new ones. The effectiveness of the new improvement technologies of crops depends largely on studies of the genetic diversity in collections of cereals on the basis of the molecular genetic markers. The allele characterization of the microsatellite loci of varieties allows to evaluate genetic variability level in the pool of the modern Ukrainian agricultural crops as well as cataloging of different varieties. The evaluation of genetic heterogeneity makes it possible not only to characterize the structure and composition of varieties, but also allows to control the quality of seeds and genetic purity of varieties.



Table 1

Consolidated list of varieties, lines and hybrids DNA typed in department of general and molecular biology, PBGI–NCSCI

Crop	Number of varieties / lines / hybrids	Studied SSR loci	Overall number of detected alleles
Wheat	Varieties Hospodynia, Scarbnytsia, Kosovytsia, Antonivka, Zamozhnist', Blahodarka odes'ka, Misiia odes'ka, Dal'nyts'ka, Yednist', Kiriia, Liona, Kuial'nyk, Poshana, Zaporuka, Bunchuk, Podiaka, Oksana, Zahrava odes'ka, Epokha odes'ka, Lytanivka, Sluzhnytsia odes'ka, Hoduval'nutsia odes'ka, Istyna odes'ka, Zmina, Dovira, Krasen', Otaman, Albatros odes'kyi, Bezosta 1 (two samples), Borvii, Turunchuk, Diuk, Nebokrai, Khyst, Pylypivka, Zorepad, Zhaivir, Uzhynok, Hurt, Dobrochyn, Vatazhok, Pol'ovyk, Holubka odes'ka, Kniahynia O'lha, Lebidka odes'ka (two samples), Zhuravka odes'ka, Bezmezna, Lastivka odes'ka (48 varieties, 172 biotypes)	<i>Xgwm357</i> –1A, <i>Xgwm18</i> –1B, <i>Xtaglgap</i> –1B, <i>Xgwm095</i> –2A, <i>Xgwm155</i> –3A, <i>Xgwm389</i> –3B, <i>Xgwm3</i> –3D, <i>Xgwm165/l</i> –4D, <i>Xgwm186</i> –5A, <i>Xgwm408</i> –5B, <i>Xgwm190</i> –5D, <i>Xgwm325</i> –6D, <i>Xgwm577</i> –7B, <i>Xgwm437</i> –7D, <i>Xbarc126</i> –7D, <i>Xgwm44</i> –7D, <i>Xwmc405</i> –7D,	114
Barley	Pallidum 32, Medykum 46, Odeskyy 9, Odeskyy 14, Odeskyy 18, Uzhnyy, Stepovyy, Nutans 106, Odeskyy 36, Chornomorets, Nutans 244, Slavutich, Odeskyy 69, Odeskyy 70, Odeskyy 82, Nutans 518, Druzhba, Pervenets, Odeskyy 100, Visnyk, Odeskyy 111, Nutans 778, Romantyk, Typhun, Eney 1, Odeskyy 115, Ityl, Gelios 1, Preriya, Poss, Pallidum 107, Odeskyy 131, Odeskyy 151, Spomyn, Prestij, Deribas, Peremozhnyy, Gambrynus, Stalker, Edem, Nezaleznyy, Adapt, Galateya, Galactyk, Zoriany, Pivdenny, Getman, Obolon, Chudovyy, Vacula, Selenit, Charivnyy, Kazkovyy, Vodogray, Gelios 2, Komandor, Eney 2 (57 varieties)	EBmac501, UMB503, AWBMS56, Bmac93, Bmag225, EBmac701, Bmac310, Bmac96, EBmac602, Bmag321, Bmag341, Bmag120	126
Sorghum	grain sorghum (NK-180, K 35-E5, NK-5418, NK-2517, NK-1486); sugar sorghum (Odesskiy 1800, 1969 Budzhak, Odesskiy 2111, Odesskiy 2113, 2179 Budzhak); broom sorghum (2645 Budzhak, 2806 Budzhak, 2778 Budzhak);	p 13, p 32, p 37, p 39, p 43, p 44, p 48, p 49, p 57, p 83, Sb4–32, Sb4–12, Sb6–36, Sb6–57, Sb6–84,	50

Table 1 continued

Crop	Number of varieties / lines / hybrids	Studied SSR loci	Overall number of detected alleles
Sorghum	sudanka (2810 Budzhak, Sudanka 1); soryz (4005 Budzhak, 2265 Budzhak, 721/I, 1/II, Odesskiy 302) (20 lines)	Xtxp 18, Xtxp 250, Xtxp 400, Xtxp 406	
Maize	Lines GK11, GK26, DK2/427–5, DK66, DK185, DK266/417, DK267, DK267–4, DK277–9, DK277–10, DK279, DK293, DK312, DK315, DK322, DK347, DK366, DK374/707, DK403, DK411–12, DK417–32, DK420–17, DK427, DK429, DK437, DK487, DK507, DK517, DK633/619–5, DK710, DK714, IK107–1, IK205–2, Odes'ka 7, Odes'ka 17, Odes'ka 18, Odes'ka 24, Odes'ka 141, Odes'ka 221, Odes'ka 308, Odes'ka 329, Odes'ka 384, Odes'ka 386, A654, BAM97, CA33, F2, F564, F564–12, H MV404, Oh43, OK109, OM74, P101, P346, P502, PLS61, 156Rf. Hybrids DAR 347, Dneprovs'kiy 181, Dneprovs'kiy 196, Dneprovs'kiy 197, Dneprovs'kiy 223, Dneprovs'kiy 227, Dneprovs'kiy 293, Dneprovs'kiy 335, Dneprovs'kiy 407, Dneprovs'kiy 453, Kadr 195, Kadr 217, Kadr 307, Kadr 443, Kedr, Kross 403, Melodiya, Odes'kiy 346, Odes'kiy 360, Odes'kiy 375, Odes'kiy 385, Odes'kiy 480, OdMa 310, OdMa 338, Platan, Roza, SiD 247, SiD 357, Siren', Smena, Stozhar, Suvenir, Syurpriz, P 3978 (58 lines; 34 hybrids)	phi055, phi064, phi083, phi127, phi029, phi073, phi021, phi079, phi093, phi024, phi070, phi078, phi034, phi116, phi115, phi015, phi022, phi027, phi062, phi084	65
Sunflower	inbred lines: Orange, Odol1, Od391, Od973, Od1318, Od1295; parental lines of hybrids: Siver, Kovcheg, Noy, Etyud, Dariy; hybrids: Odor, Oliver, Sapfir, Karat, Siver, Jason, Vsesvit, Dariy, Etyud, Kovcheg, Noy, Oskil, Psyol, Oberig, Slavutych, Lakomka, Master, Rodnik, Flagman, Oniks, Chas, Zlatibor, Serzhan, Iberiko, Latino, PR64G, Tayfun, KVS Geliya (13 inbred lines; 28 hybrids)	ORS 409, ORS 509, ORS 78, ORS 1024, ORS 3, Ha 1796, ORS 546, ORS 595, ORS 599, ORS 4, Ha 1608, ORS 815, ORS 307, ORS 533, Ha 1209,	74

Table 1 continued

Crop	Number of varieties / lines / hybrids	Studied SSR loci	Overall number of detected alleles
Hop	Al'ta, Zmina, Ksanta, Kumyr, Nadiya, Nazaryi, Obolons'kyi, Poles'kyi, Promin', Chaklun (bitter varieties); Vydybor, Haidamats'kyi, Zhytomyrs'kyi 75, Zahrava, Klon 18, Oskar, Pyvovar, Polisianka, Slavianka, Khmeleslav (aroma varieties), Granit, National'ny (22 varieties)	HIGA3, HIGA4, HIGA9, HIGA29, HIGT1, HIGT2, HIGT4, HIGT5, HIGT9, HIGT10, HIAGA7	44
Rice	Ukraina_96, Ontario, Pam'yati Gichkina, Vicont, Agat, Prestizh, Debut, Serpnev, Yantarny, Premium, Antey (11 varieties)	RM1, RM20, RM21, RM161, RM222, RM259, RM283, RM307, RM316, RM474, RM510, RM552	31

\*PBGI–NCSCI is abbreviation from Plant breeding and genetics Institute — National center of seed and cultivar investigation.

Thus, DNA typing holds considerable promise as a reliable tool of intellectual property protection of crop varieties and germplasm. Moreover, a system of codominant molecular markers is able to fix the genotype of a hybrid. For the definition of novelty, the molecular genetic formula of a variety is compared with data, which are available in an information base. Depending on the used equipment and the uniformity of the variety, the DNA typing procedure can take several weeks, instead of two or three years, which are required for field experiments according to the DUS test.

**Creation of molecular-genetic formulas given as passports to protect plant breeder's rights.** Based on the results of an SSR analysis of a variety, a molecular genetic registration certificate of a variety is created. This document certifies the distinctive features of the type of DNA of a variety, a line, or a hybrid [34–42]. The typing of DNA is the specific distribution of DNA fragments as amplification products in an electrophoretic gel or peaks on a densitogram. A molecular genetic passport reflects the features of the DNA structure of a variety, a line, or a hybrid, which allows identifying it and differing from other variety, line or hybrid. Table 2 contains examples of molecular genetic formulas of studied crop varieties, lines and hybrids which can serve as molecular genetic passports.

From the given wheat formulas we can see that varieties Podiaka and Nezalezhnyy are heterogeneous, consisting of five and two biotypes, respectively. On the contrary varieties Oksana and Vacula are presented by only one biotype and meet the requirements of the UPOV in the parameter of uniformity.

The universality of the approach of DNA typing by microsatellite loci lies in the possibility of registration of any agriculture crop variety on condition of availability of microsatellite markers panel with high discriminatory potential. The examples of applying of DNA typing by microsatellite loci on other agriculture crops in different institutions of Ukraine and abroad are represented in scientific works [14, 43].

Table 2

Examples of molecular genetic formulas of studied crop varieties, lines and hybrids

Crops		Molecular genetic formulas*
Wheat	Oksana (homogenous variety)	$A_{123} B_{110} C_{149} D_{195} E_{115} F_{188} H_{138} L_{86} M_{204} O_{107} P_{144} Q_{164} R_{185}$ $S_{218} T_{188} U_{173} V_{215}$
	Podiaka (biotype 1)	$A_{125} B_{120} C_{129} D_{193} E_{125} F_{186} H_{136} L_{208} M_{107} O_{142} P_{156} Q_{187}$ $S_{216} T_{188,192} U_{173} V_{218}$
	Podiaka (biotype 2)	$A_{123} B_{122} C_{141} D_{193} E_{139} F_{186} H_{138} L_{210} M_{107} O_{142} P_{164} Q_{185}$ $S_{218} T_{188,192} U_{173} V_{218}$
	Podiaka (biotype 3)	$A_{123} B_{110} C_{141} D_{193} E_{129} F_{192} H_{138} L_{77} M_{212} O_{107} P_{142} Q_{164} R_{185}$ $S_{216} T_{188,192} U_{137} V_{218}$
	Podiaka (biotype 4)	$A_{123} B_{120} C_{129} D_{193} E_{125} F_{188} H_{117} L_{77} M_{208} O_{107} P_{142} Q_{164} R_{185}$ $S_{218} T_{188,192} U_{173} V_{218}$
	Podiaka (biotype 5)	$A_{123} B_{120} C_{129} D_{193} E_{125} F_{188} H_{117} L_{79} M_{208} O_{111} P_{138} Q_{164} R_{187}$ $S_{216} T_{188,192} U_{137} V_{218}$
Barley	Vacula (homogenous variety)	$A_{146} B_{143} C_{222} D_{156} E_{148} F_{142} G_{136} H_{173} L_{148} M_{208} O_{224} P_{258}$
	Nezalezhnyy (biotype 1)	$A_{146} B_{134} C_{230} D_{154} E_{148} F_{146} G_{138} H_{173} L_{172} M_{208} O_{218} P_{234}$
	Nezalezhnyy (biotype 2)	$A_{146} B_{134} C_{230} D_{154} E_{160} F_{146} G_{138} H_{173} L_{172} M_{208} O_{218} P_{234}$
Maize	A 654	$A_{109} B_{101} C_{121} D_{132} E_{150} F_{205} G_{134} H_{180} I_{290} J_{162} K_{78} L_{122} M_{128} N_{157} O_{97} P_{98}$ $Q_{376} R_{142} S_{167} T_{156}$
	Roza	$A_{109} B_{101,117} C_{121} D_{128,132} E_{146} F_{202,205} G_{134} H_{180} I_{286,290} J_{159,162} K_{78,83} L_{122}$ $M_{131} N_{162} O_{97,101} P_{94,98} Q_{376} R_{142,157} S_{167} T_{159}$
Sunflower	Od1036 (inbred line)	$A_{216} B_{204} C_{140} D_{175} E_{223} F_{172} G_{165} H_{228} I_{149} J_{154} K_{150} L_{114} M_{189} N_{178} O_{228}$
	Od122 (hybrid F <sub>1</sub> )	$A_{204} A_{216} B_{204} C_{140} D_{185} E_{175} F_{190} G_{223} H_{172} I_{165} J_{252} K_{228} L_{263} M_{149} N_{152} O_{154}$ $P_{181} Q_{150} R_{153} S_{114} T_{189} U_{178} V_{228}$
Hop	Al'ta	$A_{194} B_{198} C_{194} D_{186} E_{186} F_{228,230} G_{201} H_{195} I_{204} J_{200} K_{247,267}$ $L_{248,264} M_{580,580} N_{230,240} O_{188,188} P_{917,1303} Q_{183,207}$
	Khmeleslav	$A_{184,194} B_{198} C_{194} D_{182} E_{186,196} F_{232} G_{201} H_{195} I_{204,208} J_{208} K_{247,267}$ $L_{248,264} M_{580,580} N_{237,237} O_{175,185} P_{1303,1303} Q_{183,207}$
Rice	Premium	$A_{91} B_{204} C_{143,130} D_{172} E_{184} F_{159} G_{157} H_{130} I_{198} J_{253} K_{121} L_{215}$
	Ukraina_96	$A_{91} B_{201} C_{143} D_{176} E_{184} F_{159} G_{157} H_{130} I_{198} J_{253} K_{121} L_{215}$

Table 2 continued

Crops		Molecular genetic formulas*
Sorghum	Odesskiy 1800	A <sub>201</sub> , B <sub>197</sub> , C <sub>299</sub> , D <sub>177</sub> , E <sub>140</sub> , F <sub>412</sub> , G <sub>450</sub> , H <sub>373</sub> , I <sub>169</sub>
	Sudanka 1	A <sub>201</sub> , B <sub>185</sub> , C <sub>293</sub> , D <sub>192</sub> , E <sub>137</sub> , F <sub>415</sub> , G <sub>453</sub> , H <sub>373</sub> , I <sub>163</sub>

\*Letters A – V encode microsatellite loci as follows: for wheat varieties A – *Xgwm357-1A*, B – *Xgwm095-2A*, C – *Xgwm155-3A*, D – *Xgwm165/1-4A*, E – *Xgwm186-5A*, F – *Xgwm18-1B*, H – *Xgwm389-3B*, L – *Xgwm3-3D*, M – *Xgwm190-5D*, O – *Xgwm437-7D*, P – *Xgwm325-6D*, Q – *Xbarc126-7D*, R – *Xgwm44-7D*, S – *Xwmc405-7D*, T – *Xgwm408-5B*, U – *Xgwm577-7B*, V – *Xtaglgap-1B*; for barley varieties A – EBmac501, B – UMB503, C – AWBMS56, D – Bmac93, E – Bmag225, F – EBmac701, G – Bmac310, H – Bmac96, L – EBmac602, M – Bmag321, O – Bmag341, P – Bmag120; for maize lines and hybrids A – phi055, B – phi064, C – phi083, D – phi127, E – phi029, F – phi073, G – phi021, H – phi079, I – phi093, J – phi024, K – phi070, L – phi078, M – phi034, N – phi116, O – phi115, P – phi015, Q – phi022, R – phi027, S – phi062, T – phi084; for sunflower lines and hybrids A – ORS 409, B – ORS 509, C – ORS 78, D – ORS 1024, E – ORS 3, F – *Ha 1796*, G – ORS 546, H – ORS 595, I – ORS 599, J – ORS 4, K – *Ha 1608*, L – ORS 815, M – ORS 307, N – ORS 533, O – *Ha 1209*; for hop varieties A – J – microsatellite loci; K–R – the list of genes encoding chalcone synthases; for rice varieties A – RM1, B – RM307, C – RM316, D – RM474, E – RM552, F – RM20, G – RM21, H – RM161, I – RM222, J – RM259, K – RM283, L – RM510; for sorghum varieties A – Sb4-32, B – Sb4-12, C – Sb6-57, D – Sb6-84, E – Xtxp 18, F – Xtxp 250, G – Xtxp 400, H – Xtxp 406, I – Sb6-36.

**Markers of agriculturally important genes used to supply the existing molecular genetic formulas.** Markers of a number of agriculturally important genes, such as the quality of reserve proteins [44] and the Wx-genotypes [45] for wheat, have been created and added as an informative part to the existing molecular genetic formulas of crop varieties. As for hop (*Humulus lupulus* L.), the most important genes in its genome are genes *chs\_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* and *vps* (*chs5*), which encode chalcone synthases catalyzing biosynthesis of aroma and bitter substances. Depending on content of aroma and bitter substances hop varieties are derived in aroma and bitter samples. Table 2 contains information about allelic state of chalcone synthase genes of both aroma and bitter hop varieties. Application of molecular markers for detection of aroma and bitter substances levels in hop is cheaper and needs less time than applying of biochemical methods. Creating of hop genome database is important for studying of hop diversity, evolution and identification of varieties, members of population and individual samples of hop.

In result, DNA technology for the identification of varieties of agricultural cultures has a number of advantages, among them obtaining of a molecular genetic passport of a variety, which can serve as a protection document of breeders' copyrights as well as a significant decrease in time necessary for the determination of the novelty, uniformity and stability of varieties.

## Conclusions

The analyzed material was characterized using SSR markers and molecular genetic formulas of the examined varieties, lines and hybrids were designed according to the allelic state of microsatellite loci. Notwithstanding that genetic differentiation of the varieties was sometimes low, the use of the SSR markers was found to be an effective tool to make assessment of genetic diversity and to genotyping within varieties of different breeding origin. The results provide guidance for future efficient use of the selected microsatellite markers in molecular genetic analysis to characterize genetic diversity, perform their differentiation, identification and registration which allows appearance of new and diverse varieties on the Ukrainian and world market suitable for cultivation under a variety of biotic and abiotic stresses.

## BIBLIOGRAPHY

1. Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры и селекция / Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2013. — Т. 47, № 3. — С. 71–80.
2. UPOV. Working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular. BMT/7/2. — 2001–11–9.
3. UPOV. Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS). UPOV/INF/18/1. — 2011–10–20.
4. UPOV. Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction («BMT guidelines»). UPOV/INF/17/1. — 2010–10–21.
5. Jones H. Variety protection and plant breeders' rights in the 'DNA Era' / H. Jones, C. Norris, J. Cockram, D. Lee // Diagnostics in Plant Breeding. — 2013. — Vol. 15, № 3. — P. 369–402.
6. Pourabed E. Identification and DUS testing of rice varieties through microsatellite markers / E. Pourabed, M. R. J. Noushabadi, S. H. Jamali., N. M. Alipour, A. Zareyan, L. Sadeghi // International Journal of Plant Genomics. — 2015. — doi: 10.1155/2015/96507
7. Kalia R. K. Microsatellite Markers: An Overview of the Recent Progress in Plants / R. K. Kalia, M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh, A. K. Dhawan // Euphytica. — 2011. — Vol. 177, № 3. — P. 309–334.
8. Varshney R. K. Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Application / R. K. Varshney, A. Graner and M. E. Sorrells // Trends in Biotechnology. — 2005. — Vol. 23, № 1. — P. 48–55.
9. Hong J. Construction of EST-SSR Databases for Effective Cultivar Identification and Their Applicability to Complement for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Distinctness Test / J. Hong, Y. Kwon, R. K. Mishra, D. H. Kim // American Journal of Plant Sciences. — 2015. — Vol. 6, № 1. — P. 113–125.
10. Peng J. H. Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid / J. H. Peng, Y. Bai, S. D. Haley et al. // Genetica. — 2009. — Vol. 135, № 1. — P. 95–122.
11. Landjeva S. Genetic diversity of old bread wheat germplasm from the Black Sea region evaluated by microsatellites and agronomic traits / S. Landjeva, G. Ganeva, V. Korzun [et al.] // Gen. Res. Crop Evol. — 2014. — doi:10.1017/S1479262114000781.

12. Miah G. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance / G. Miah, M. Y. Rafii, M. R. Ismail, A. B. Puteh, H. A. Rahim., K. N. Islam, M. A. Latif // *Int J Mol Sci.* — 2013. — Vol. 14, № 11. — P. 22499–22528.
13. Безуглий М. Д. ДНК-ідентифікація сортів рису (*Oryza sativa* L.) української селекції / М. Д. Безуглий, Ю. М. Сиволап, О. В. Галаєв, В. В. Дудченко, Р. А. Вожегова // *Цитология и генетика.* — 2011. — Т. 45, № 1. — С. 35–40.
14. Бочарова В. Р. Ідентифікація генотипів клонів винограду за допомогою мікросателітних маркерів / В. Р. Бочарова., І. А. Ковальова, Л. С. Мазуренко // *Цитология и генетика.* — 2009. — Т. 43, № 6. — С. 8–17.
15. Шевчук А. Ю. Молекулярно-генетический анализ форм сорго, возделываемых в Украине / А. Ю. Шевчук, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика.* — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 47–53.
16. Chebotar S. Molecular studies on genetic integrity of open-pollinating species rye (*Secale cereale* L.) after long-term genebank maintenance / S. Chebotar, M. S. Röder, V. Korzun, B. Saal, W. E. Weber, A. Börner // *Theor Appl Genet.* — 2003. — Vol. 107, № 8. — P. 1469–1476.
17. Kolesnyk O. O. Differentiating ability of wheat variety identification methods using microsatellite analysis and computer analysis of the grain morphometric parameters / O. O. Kolesnyk, S. V. Chebotar, O. M. Khokhlov, Yu. M. Sivolap // *Bulletin of Odessa I. I. Mechnikov National University (biology).* — 2009. — Vol. 4, № 8. — P. 27– 42.
18. Kolesnyk O. O. Differentiation of the modern winter wheat varieties of South Ukraine by the allelic composition of microsatellite loci / O. O. Kolesnyk, Chebotar S. V., Khokhlov O. M., Sivolap Yu. M. // *Zb Nauk. Pr. SGI.* — Odessa, 2012. — Vol. 19, № 59. — P. 47–59.
19. Сиволап Ю. М. Сучасні біотехнології в оцінці генетичного різноманіття українських сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Ю. М. Сиволап, О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, С. О. Ігнатова, М. С. Приставський, Г. А. Зеленина // *Цитология и генетика.* — 2010. — Т. 44, № 5. — С. 3–12.
20. Ispol'zovanie PТSR-analiza v genetiko-seleksiionnykh issledovaniyakh: Nauch.-metod. Rukovodstvo (The Use of PCR in Genetic and Breeding Research: Scientific Guidelines) / Sivolap Yu. M., Ed. — Kyiv : Agrar. Nauka., 1998. — 159 p.
21. Röder M. S. A microsatellite map of wheat / M. S. Röder, V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M. H. Tixier, P. Leroy, M. W. Ganal // *Genetics.* — 1998. — Vol. 149, № 4. — P. 2007–2023.
22. Dorocicz I. An analysis of polymorphism of large-motif barley microsatellites / I. Dorocicz, K. Kasha // *Theor Appl Genet.* — 2000. — Vol. 100. — P. 601–609.
23. Holton T. Genetic screening of Australian barley varieties using microsatellite markers / T. Holton, M. Cross, A. Karakousis, R. J. Henry // *Australian Genetic Journal.* — 1998. — № 5. — P. 710–716.
24. Macaulay M. A representative, highly informative 'genotyping set' of barley SSRs. / M. Macaulay, L. Ramsay, W. Powell, R. Waugh // *Theor Appl Genet.* — 2001. — Vol. 102. — P. 801–809.
25. Paniego N. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). / N. Paniego, M. Eschaide, M. Munoz, L. Fernandez, S. Torales, P. Faccoi, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeny, E. Suarez, H. Hopp // *Genome.* — 2002. — Vol. 45. — P. 34–43.

26. Tang S. Simple Sequence Repeat map of the sunflower genome. / S. Tang, J.-K. Yu., M. Slabaugh, D. Shintani, S. Knapp // *Theor Appl Genet.* — 2002. — Vol. 105. — P. 1124–1136.
27. Senior M. L. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer / M. L. Senior, M. Heun // *Genome.* — 1993. — Vol. 36, № 5. — P. 884–889.
28. Taramino G. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize / G. Taramino, S. Tingey // *Genome.* — 1996. — Vol. 39, № 2. — P. 277–287.
29. Technical manual GenePrint® STR Systems (Silver Stain Detection). — Promega Corporation, 2001. — 47 p.
30. Rokitskii P. F. *Biological Statistics.* — Moscow : Kolos, 1973. — 320 p.
31. Sivolap Yu. M., Volkodav V. V., Bal'vins'ka M. S., Kozhukhova N. E., Solodenko A. E., Chebotar S. V., Identification and registration of genotypes of common wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), maize (*Zea mays* L.), and sunflower (*Helianthus annuus* L.) by microsatellite locus analysis: guidelines. — Odessa, 2004. — 14 p.
32. Report on the Seventh Session of the Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular of UPOV. Hanover, Germany. 21–23.11.2001. Document UPOV BMT/7/19. 09.10.2002. Annex III. P. — 1–15.
33. Sivolap Yu. M., Kozhukhova N. E., Kalendar R. N. Variability and specificity of the genomes of crop plants : monograph. — Odesa : Astroprint, 2011. — P. 126–148.
34. Chebotar S. V., Sivolap Yu. M., UA Patent No. 19828 «The way of novelty determining of bread wheat varieties and lines by DNA-typing», 2007.
35. Sivolap Yu. M., Bal'vins'ka M. S. UA Patent No. 67905 A «The way of identification of barley genotypes», 2004.
36. Sivolap Yu. M., Kalendar R. N., Stratula O. R. UA Patent No. 15273 «The way of differentiation and identification of barley genotype varieties», 2006.
37. Sivolap Yu. M., Kalendar R. N., Stratula O. R. UA Patent No. 16082 «The way of passportization of barley genotypes», 2006.
38. Sivolap Yu. M., Kozhukhova N. E. UA Patent No. 62244 A «The way of registration of maize genotypes», 2003.
39. Sivolap Yu. M., Solodenko A. E. UA Patent No. 68813 A «The way of identification of sunflower genotypes», 2004.
40. Солоденко А. Є. Мікросателітні маркери в дослідженні генетичного різноманіття ліній та гібридів соняшнику / А. Є. Солоденко // Вісник Одеського національного університету. — 2011. — Т. 16 (вип. 6. Біологія.). — С. 42–48.
41. Sivolap Yu. M., Kozhukhova N. E., Shevchuk A. Yu. UA Patent No. 48475 «The way of registration of sorghum genotypes», 2010.
42. Chebotar S. V., Sivolap Yu. M. UA Patent No. 10230 «The way of registration of rye varieties by DNA-typing», 2005.
43. Картель Н. А. Молекулярные маркеры в изучении хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных культур / Н. А. Картель, С. В. Малышев, О. Ю. Урбанович, А. А. Хацкевич // Молекулярная и прикладная генетика. — 2009. — Т. 9. — С. 19–27.
44. Поліщук А. М. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-1* та *Glu-3* локусів /



- А. М. Поліщук, С. В. Чеботар, О. М. Благодарова, Н. О. Козуб, І. О. Созінов, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2010. — Т. 44, № 6. — С. 22–31.
45. Петрова И. В. Идентификация *Wx* генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы / И. В. Петрова, С. В. Чеботарь, А. И. Рыбалка, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2007. — Т. 41, № 6. — С. 11–17.

Received 26.05.2015.

УДК 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

**Колесник О. О., Чеботар С. В., Волкова Н. Е., Бальвінська М. С.,  
Солоденко А. Є., Галаєв О. В.**

### **ДНК-ТИПУВАННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ, ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА РЕЄСТРАЦІЇ ГЕНОТИПІВ**

На матеріалі пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.), ячменя (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшнику (*Helianthus annuus* L.), хмелю (*Humulus lupulus* L.), рису (*Oriza sativa* L.), сорго (*Sorghum bicolor* L.) проаналізовано шляхи функціонування систем, заснованих на використанні мікросателітних маркерів для ідентифікації сортів, а також для задач селекції та сортовивчення. Ключовими особливостями таких систем є їх мультиалельна природа, відтворюваність, високий поліморфізм, легкість автоматизації та кодомінантне успадкування. Приділяється увага визначенню алельного стану агрономічно важливих генів, що можуть бути використані як додаток до існуючих молекулярно-генетичних формул.

УДК 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

**Колесник О. А., Чеботарь С. В., Волкова Н. Э., Бальвинская М. С., Солоденко А. Е., Галаев А. В.**

**ДНК-ТИПИРОВАНИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР  
С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА С ЦЕЛЬЮ  
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И РЕГИСТРАЦИИ  
ГЕНОТИПОВ**

На материале пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.), ячменя (*Hordeum vulgare* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), хмеля (*Humulus lupulus* L.), риса (*Oriza sativa* L.), сорго (*Sorghum bicolor* L.) исследованы пути функционирования систем, основанных на использовании микросателлитных маркеров для идентификации сортов, а также для задач селекции и сортоизучения. Ключевыми элементами таких систем являются их мультиаллельная природа, воспроизводимость, высокий полиморфизм, легкость автоматизации и кодоминантное наследование. Уделяется внимание определению аллельного состояния агрономически ценных генов, которые могут быть использованы в качестве дополнения существующих молекулярно-генетических формул.

## ОГЛЯДИ

UDC 577.2.08

R. N. KALENDAR

PhD, Head of the laboratory, RSE «National Center for Biotechnology»,  
Kazakhstan

e-mail: ruslan.kalendar@biocenter.kz

### RETROTRANSPOSON-BASED MOLECULAR MARKERS

*Molecular markers play an essential role in all aspects of genetics, modern plant breeding, in human forensics, for map-based cloning of genes, ranging from the identification of genes responsible for desired traits to the management of backcrossing programs. Retrotransposons are ideally suited as molecular markers. As dispersed and ubiquitous transposable elements, their «copy and paste» life cycle of replicative transposition leads to new genome insertions without excision of the original element. Both the overall structure of retrotransposons and the domains responsible for the various steps of their replication are highly conserved in all eukaryotes. Following the demonstration that retrotransposons are ubiquitous, active, and abundant in plant genomes, various marker systems were developed to exploit polymorphisms in retrotransposon insertion patterns. This review provides an insight into the spectrum of retrotransposon-based marker systems developed for plant species, evaluates the contributions of retrotransposon markers to the analysis of population diversity in plants and the way for the rapid isolation of retrotransposon termini.*

*Key words: molecular marker, phylogeny, polymorphism, repeats, retrotransposon, transposable element.*

**Introduction.** Markers play an essential role in the study of genetically variability and diversity, in the construction of linkage maps, and in the diagnosis of individuals or lines carrying certain linked genes. The emergence of marker systems has, for the last 40 years [1], closely tracked developments in biochemistry and molecular biology. The shortcomings of biochemically-based markers, such as isozymes, drove the development of markers based on DNA polymorphisms [2]. These marker types generate «fingerprints,» distinctive patterns of DNA fragments resolved by electrophoresis and detected by staining or labelling. A molecular marker in essence detects nucleotide sequence variation at a particular location in the genome. This nucleotide sequence must be different between the parents of the chosen cross to be distinguishable between plant accessions and to finally study its pattern of inheritance. The advent of the polymerase chain reaction (PCR) was a break-

through for molecular marker technologies, and made possible many fingerprinting methods. These fall into two broad categories, namely methods that detect single loci and multiplex methods that detect multiple loci simultaneously.

Interspersed repetitive sequences comprise a large fraction of the genome of many eukaryotic organisms and they are predominantly comprised of transposable elements (TEs). In most species that have been studied interspersed repeats are distributed unevenly across the nuclear genome and some repeats have a tendency to cluster around the centromeres or telomeres. Following the induction of recombinational processes during the meiotic prophase variation in the copy number of repeat elements and internal rearrangements on both homologous chromosomes can ensue. The resulting heterogeneity in the arrangement of distinguishable repeats has been exploited for specific molecular markers technique targeted this repeat element.

It is therefore not surprising that many DNA marker techniques that are based on these repeats have been devised.

Numerous methods have been developed that exploit repeated sequences as molecular markers. In an early example, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), probes derived from repetitive sequences were hybridized to Southern blots of restriction-digested genomic DNA to produce a highly variable pattern [3]. The RFLP technique was used extensively in the past, but has been replaced by PCR-based methods due to the slowness of Southern blotting.

Alternatively, repeats can be used as single primers in the polymerase chain reaction. The first multiplex methods to be developed were named Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [4, 5] and DNA Amplification Fingerprinting (DAF)[6] respectively, and involve amplification of random repetitive sites in the genome using short primers, typically 8–12 nt in length. The approaches involve quick and easy reaction set-up and no genome sequence information is needed to design the primers. However, problems in reproducibility due to the presence of huge numbers of potential priming sites in the genome and the low annealing temperatures in the reactions, derived from the nature of the primers themselves, have led to this method largely disappearing from the molecular marker toolkit today.

Nucleotide sequences matching repetitive sequences showing polymorphism in RFLP analyses have also been used as PCR primers for the inter-repeat amplification polymorphism marker method [7–9]. Such repetitive sequences include microsatellites, such as  $(CA/GT)_n$  or  $(CAC/GTG)_n$  which are distributed throughout the genome. A derived approach was developed to generate PCR markers based on amplification of microsatellites near the 3' end of the *Alu* (SINE) transposable elements (TEs), called *Alu*-PCR or SINE-PCR [10]. The successful application of microsatellite-specific oligonucleotides as PCR primers was first described by [7, 8, 11, 12] who amplified DNA from different sources, for example, with primers  $(GATA)_n$ ,  $(GACA)_n$ .

**Retrotransposons.** Retrotransposons present one of the most fluid genomic components, varying greatly in copy number over relatively short evolutionary timescale and represent a major component of the structural evolution of plant genomes [13, 14, 15].

Retrotransposons are one of the two major groups of transposable elements in eukaryotic genomes and are defined according to their mode of propagation. Retrotransposons belongs to class I TEs and transpose via an RNA intermediate in contrast to other transposons (class II) that do not have an RNA intermediate (Fig. 1). Retrotransposons are separated in two major subclasses that differ in their structure and transposition cycle. These are the LTR retrotransposons and the non-LTR retrotransposons (long interspersed repetitive elements (LINE) and short interspersed nuclear elements (SINE), are distinguished by the respective presence or absence of long terminal repeats (LTRs) at their ends. All groups are complemented by their respective non-autonomous forms which lack one or more of the genes essential for transposition: MITEs (Miniature Inverted-Repeat Tandem Elements) for Class II, SINEs for non-LTR retrotransposons, and TRIMs (Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature) and LARDs (Large Retrotransposon Derivatives) for LTR retrotransposons [16].

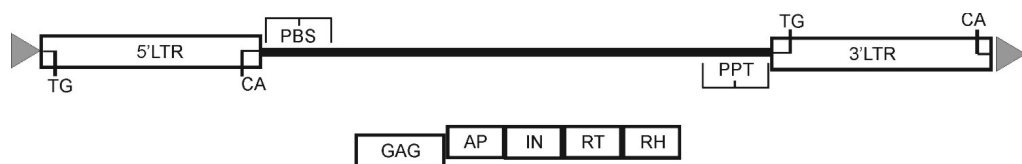


Fig. 1. Organization of an LTR retrotransposon. The retrotransposon is bounded by long terminal repeats (LTRs) which contain the transcriptional promoter and terminator. The LTRs contain short inverted repeats at either end, shown as filled triangles. Reverse transcription is primed at the PBS and PPT domains, respectively for the (–)– and (+)–strands of the cDNA. The internal region of the retrotransposon codes for the proteins necessary for the retrotransposon life cycle: the capsid protein (GAG), which packages the transcript into a virus-like particle; aspartic proteinase (AP), which cleaves the polyprotein (AP); integrase (IN), which inserts the cDNA copy into the genome; reverse transcriptase (RT) and RNaseH (RH), which together copy the transcript into cDNA. The GAG is often in a different reading frame, shown as a shifted box. The order of coding domains shown here is typical for *copia* – like elements; in *gypsy* – like elements, the IN domain is found at the 3' end of the internal domain. The internal region contains evolutionarily conserved domains, necessary for function that can be used to isolate retrotransposons from previously unstudied plant species. These are noted below the element as black boxes. The LTRs are generally well-conserved within families, and can serve for the design of primers to generate DNA footprints (Fig. 2). The areas of conservation suitable for primer design are noted as hatched boxes below the element diagram. Direct repeats in the flanking genomic DNA are generated upon retrotransposon integration; these are depicted as large arrow heads. The flanking genomic DNA is shown as a wavy line. The apposition of a long element bearing conserved sequences, with genomic DNA of random sequence is the basis for retrotransposon marker methods

LTR retrotransposons are transcribed from one LTR of an integrated element to produce a nearly full length RNA copy containing a single copy of the LTR split between its two ends (the LTR provides both the start site and polyadenylation signal for the element; Fig. 1, 2). This RNA is then reverse-transcribed into an extrachromosomal cDNA, reconstituting the full length element that is ultimately integrated back into the genome. Immediately internal to the LTRs are the priming sites for reverse transcription. The large central part of the retrotransposon encodes the structural components of a virus-like particle into which the RNA is inserted, together with reverse transcriptase and integrase enzymes.

Both the overall structural features as well as the basic stages of the life cycle are shared by the retrotransposons and the retroviruses [17, 18].

However, rather than escaping the genome to infect new individuals as do retroviruses, retrotransposons insert the new copies only into their host genomes. If the integration takes place within a cell lineage from which pollen or egg cells are ultimately derived, then a new polymorphism is contributed to the gene pool. These new copies are useful for distinguishing breeding lines, varieties, or populations of plants from each other.

In plants, the LTR retrotransposons are typically more plentiful and active than their non-LTR relatives. In many crop plants between 40–90 % of the total DNA is comprised of LTR retrotransposons [19–21]. Although most prevalent retrotransposons are dispersed throughout the genome, at least in the cereals and citrus they are often locally nested one into another and in extensive domains that have been referred to as «retrotransposon seas» surrounding gene islands [19–21]. Their abundance, general dispersion, and activity make them ideal sources for the development of molecular markers.

**Retrotransposons as molecular markers.** The emergence of retrotransposon-based methods followed the basic research that demonstrated their ubiquity and activity in the plants [14, 15, 22]. The most recent marker methods based on retrotransposons rely on PCR. Transposable elements have been exploited as molecular markers in various ways. For example, mammalian SINE like Alu-repeats are dispersed throughout their genomes. Primer sequences complementary to any of these repeats may produce many non-specific bands from single-primer amplification and be used as markers for detecting Alu-repeat polymorphisms [23, 24].

It has been proved that TE families evolve with different profiles so TE marker systems based on different TEs show different levels of resolution and can be chosen to fit with the required analysis [25–32]. Retrotransposon insertions behave as Mendelian loci [33]. Hence, retrotransposon-based markers would be expected to be co-dominant and involve a different level of genetic variability, i.e. transposition events, than arbitrary markers systems such as RAPD or AFLPs, which detect polymorphism from simple nucleotide changes to genomic rearrangements. Nearby TEs may be found in different orientations in the genome (head-to-head, tail-to-tail, or head-to-tail) in-

creasing the range of tools to available to detect polymorphism depending on the method and primer combinations.

Most of the retrotransposon techniques are anonymous, producing fingerprints from multiple sites of retrotransposon insertion in the genome. They all exploit the combination of a known retrotransposon sequence and a variety of adjacent sequences. Primers are generally designed to the LTRs near to the joint, in domains that are conserved within families but that differ between families (Fig. 2). Although regions internal to the LTR that also contain conserved segments can be used for this purpose, generally the LTRs are chosen to minimize the size of the target to be amplified. Because the LTRs are direct repeats, a primer facing outward from the left or 5' LTR will necessarily face inward from the right, or 3' LTR.

Depending on the nature of the second primer, the inward facing primer will either not amplify a product, produce a monomorphic band, or will detect polymorphism resulting from a nested insertion pattern. The internal amplicon can also be removed by judicious use of an infrequent cutting enzyme. For retrotransposons with relatively short LTRs the transposon specific primer can derive from an internal sequence present only once per element, simplifying this process. For S-SAP with low copy number elements it is also possible to use simplified digestion and amplification protocols.

The various retrotransposon marker systems differ in the nature of the second primer used in the amplification reactions (Fig. 2). The second primer can be any feature in the genome that is dispersed and conserved.

**S-SAP/TD.** The Amplified Fragment Length Polymorphism method (AFLP), introduced in the mid 1990s, is an anonymous marker method. It detects restriction sites by amplifying a subset of all the sites for a given enzyme pair in the genome by PCR between ligated adapters. S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism), a modified AFLP method based on BARE-1, was described by Waugh and co-authors in 1997 [34]. This method is based on the sharing of genomic DNA with two different enzymes to generate a template for the specific primer PCR: amplification between retrotransposon and adapters ligated at restriction sites (usually *MseI* and *PstI* or any other restriction enzyme) using selective bases in the adaptor primer. The S-SAP method can be considered as a modification of AFLP but it usually displays a higher level of polymorphism than AFLPs. Primers are usually designed in the LTR region, but could also correspond to internal part of the element, like to the polypurine tract (PPT) which is found internal to the 3'-LTR in retrotransposons.

Nonselective primers could be used when enzymes used for digestion have a larger recognition sequence, or when the copy number of the TE is lower. For high-copy-number families, the number of selective bases may be increased. The use of two enzymes in S-SAP corresponds to a reduction in genomic complexity as does the use of selective bases on the primers associated with the adapters. Low copy number TEs are not well suited to methods

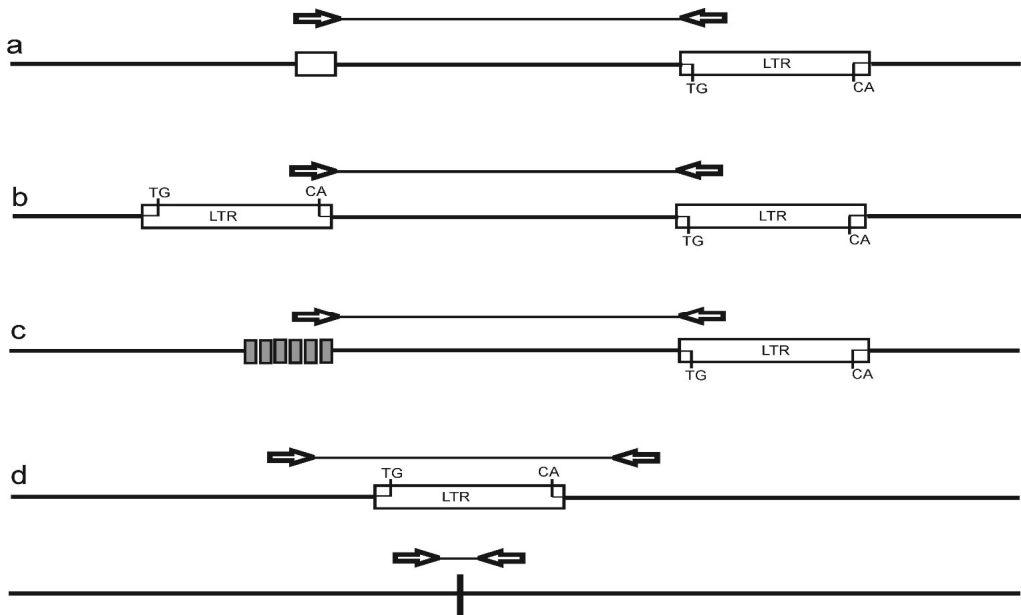


Fig. 2. Retrotransposon-based molecular marker methods. Multiplex products of various lengths from different loci are indicated by the bars beneath the diagrams of each reaction. **(a)** The SSAP method. The geometry of amplification from a DNA fragment cut with two restriction enzymes (E1, E2), containing a retrotransposon LTR (shaded, labeled) and ligated to an adapter (stippled) is shown. Primers used for amplification match the adapter (P<sub>A</sub>) and retrotransposon (P<sub>T</sub>). **(b)** The IRAP method. Amplification takes place between retrotransposons (internal regions hatched) near each other in the genome (open bar), using retrotransposon primers (P<sub>T</sub>). The elements are shown oriented head-to-head, using a single primer. **(c)** The REMAP method. Amplification takes place between a microsatellite domain (vertical bars) and a retrotransposon, using a primer anchored to the proximal side of the microsatellite (P<sub>M</sub>) and a retrotransposon primer (P<sub>T</sub>). **(d)** RBIP. Full sites, depicted left, are scored by amplification between a primer in the flanking genomic DNA (here, primer P<sub>FL</sub> matches the left flank) and a retrotransposon primer (P<sub>T</sub>). The single product is shown as one bar beneath the diagram. The alternative reaction between the primers for the left and right flanks, P<sub>FL</sub>' and P<sub>FR</sub>', respectively, is inhibited in the full site by the length of the retrotransposon. The product that is not amplified is indicated by the grey bar beneath the diagram. The flanking primers are able to amplify the empty site, right, depicted as a bar beneath the diagram

that involve such reduction in genomic complexity, the use of single enzyme digests with selective bases (or infrequent cutting enzymes) allows the survey of all insertion sites for a given TE, and can be considered as a variant of anchored PCR.

A S-SAP marker system based on three long terminal repeat (LTR) sequences of Ty1-copia retrotransposons displayed a higher level of polymorphism than AFLPs in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [35]. S-SAP insertion patterns of 8 retrotransposon families on 10 *Vitis* accessions showed that these retrotransposon families are present across the *Vitis* genus and only a



few insertion sites are fixed in all accessions, which should have been maintained during speciation. Most of the scored bands are polymorphic, indicating that these families have been active after speciation across the genus [36]. S-SAP can be used mainly to measure the distribution and structure of specific retroelement populations in an organism. It has been used to evaluate the distribution and structure of specific retrotransposons populations in oat [37, 38], *Medicago sativa* L. [39], barley [25, 34], wheat *Triticum aestivum* and wild relatives [38, 40], sweet potato [41], pea [42], tomato [43], *Aegilops* species [44], apple [45], artichoke, lettuce [46, 47] and *Medicago sativa* [39]. S-SAP was also used to show evolutionary history in *Zea* [48], wheat [38] and in tobacco [49]. S-SAP has been optimised for multiple plant species and protocols for rapidly obtaining retrotransposon sequence information for S-SAP primer design have been developed [47].

The same technique was named Transposon Display (TD) when applied to DNA transposons rather than retrotransposons [50]. Rim2/Hipa-TD produced highly polymorphic profiles with ample reproducibility within a species as well as between species in the *Oryza* genus.

Usually, S-SAP shows more polymorphism, more co-dominance and more chromosomal distribution than AFLP. However, S-SAP also requires restriction digestion of genomic DNA to provide sites for adapter ligation as in AFLP method. Sensitivity of commonly used restriction enzymes to DNA methylation could provide false genotyping results.

**IRAP/REMAP.** In plants, the inter-repeat amplification polymorphism techniques such as inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), retrotransposon microsatellite amplification polymorphisms (REMAP) or inter-MITE amplification [32, 51- 53] have exploited the highly abundant dispersed repeats such as the LTRs of retrotransposons and SINE-like sequences. The association of these sequences with each other makes possible to amplify a series of bands (DNA fingerprints) using primers homologous to these high copy number repeats. The markers generated are very informative genetic markers. IRAP detects retrotransposon insertional polymorphisms by amplifying the portion of DNA between two retroelements [52]. One or two primers are used pointing outwards from an LTR, and therefore amplifies the tract of DNA between two nearby retrotransposons. IRAP can be carried out with a single primer matching either the 5' or 3' end of the LTR but oriented away from the LTR itself, or with two primers. The two primers may be from the same retrotransposon element family or may be from different families. The PCR products, and therefore the fingerprint patterns, result from amplification of hundreds to thousands of target sites in the genome (Fig.3). Retrotransposons generally tend to cluster together in «repeat seas» surrounding «genome islands», and may even nest within each other. Hence, the pattern obtained will be related to the TE copy number, insertion pattern and size of the TE family.

The REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) method is similar to IRAP, but one of the two primers matches a microsatellite

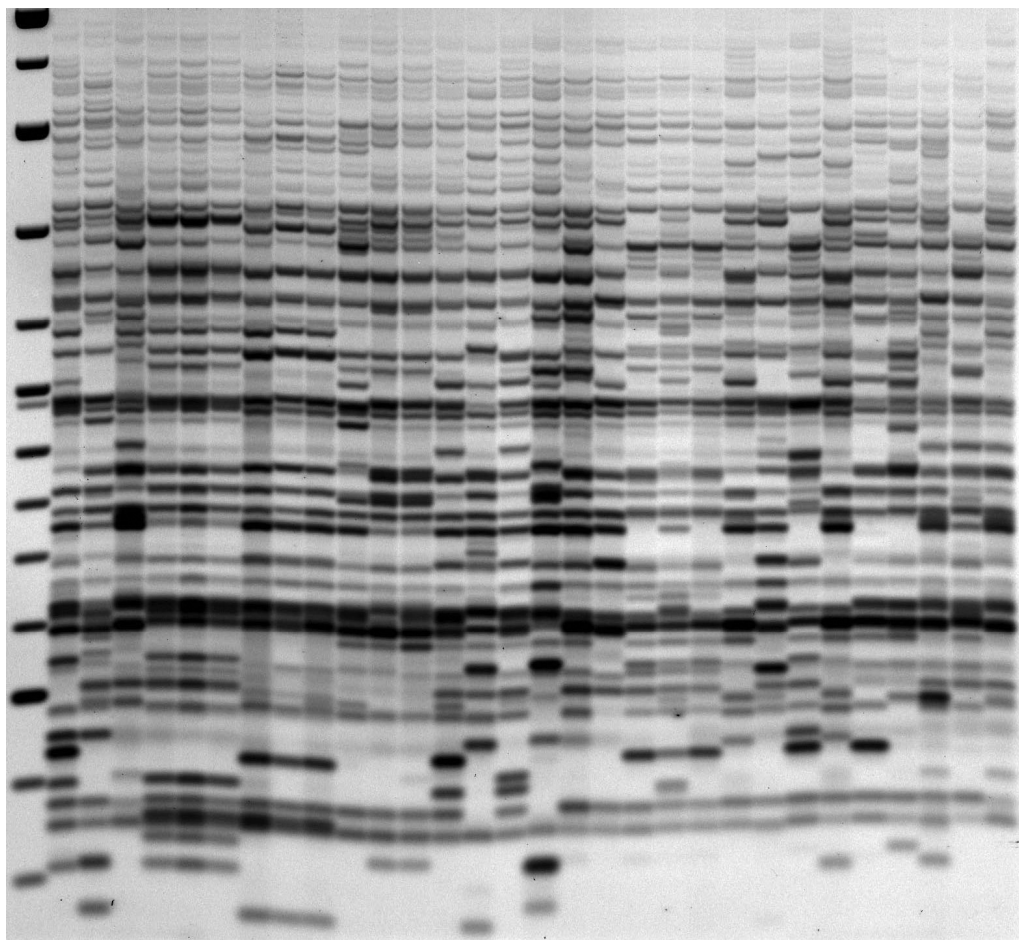


Fig. 3. Utility of IRAP for a diversity of plant species. The phenogram of 30 genotypes of populations of *H. spontaneum* based on IRAP analysis are shown as negative images of ethidium bromide — stained agarose gels following electrophoresis. Results for BARE-1 LTR primer 1369 (5'-TGCCTCTAGGGCATATTTCCAACAC) are shown. A 100 bp DNA ladder is present on the left

motif [52]. Founded throughout genomes, microsatellites appear to be associated with retrotransposons and have high mutation rates due to polymerase slippage. Therefore, they may show much variation at individual loci within a species. In REMAP, anchor nucleotides are used at the 3' end of the SSR primer to avoid slippage of the primer within the SSR. It also prevents the detection of variation in repeat numbers within the microsatellite.

IRAP and REMAP methods have been used in gene mapping in barley, wheat, oat, rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea* SP.), in studies of genome evolution in the grasses, in a variety of applications, including measurement of genetic diversity and population structure, chromatin modification and epigenetic reprogramming, similarity and cladistic relationships, determination of essential derivation, marker-assisted selection, in barley [54], banana [26], grapevine, *Pisum*, apple, in citrus, *Aegilops* and *Triticum* [55],

banana, rice, flax [56], sunflower [29] and medicinal plants — *Adonis vernalis*, *Paeonia anomala*, *Adenophora lilifolia*, *Digitalis grandiflora* [57]. REMAP has been used also as a sensitive method for detecting genomic copies of retrotransposons amidst retrotransposon cDNAs, to examine genome evolution in wild barley [58].

**RBIP/ TAM.** RBIP (Retrotransposons-based insertion polymorphism) was described as a simple PCR-based detection of retrotransposon insertions using PCR between primers flanking the insertion site and primers from the insertion itself. The basic RBIP method has been developed for high-throughput applications by replacing gel electrophoresis with hybridization to a filter. PCR reactions detecting the occupied sites and unoccupied sites are carried out together, the products spotted onto membranes, and probed with a locus-specific probe. By using sensitive, oligo-based hybridisation to spotted PCR products, TAM, has allowed the dot blot approach to be scaled down to microarrays with the attendant advantages in throughput, efficiency and data collection. Using three primers, RBIP can detect both the presence and absence of the TE insertion and generates single-locus codominant markers. In the case of a retrotransposon, a primer designed in the LTR is used together with a primer designed in the flanking region and allow the amplification of an insertion site, when primers specific of both 5' and 3' flanking regions are used to scored the corresponding empty site. TE insertions are usually more than thousands of bases long so the empty site primers do not generate an amplicon from the occupied site. Hence, RBIP detects both the presence and absence of the insertion but requires that the sequence of the 5' and 3' flanking sequences of the TE insertions are known. RBIP analysis was used to show evolutionary history in pea and rice.

TAM (Tagged Microarray Marker) is a microarray-based method developed from RBIP for scoring thousands of DNAs for a co-dominant molecular marker on a glass microarray slide. RBIP also works well with single nucleotide polymorphism (SNP) markers [59]. In this approach, biotin-terminated allele-specific PCR products are spotted unpurified onto streptavidin-coated glass slides and visualised by hybridisation of fluorescent detector oligonucleotides to tags attached to the allele-specific PCR primers. Two tagged primer oligonucleotides are used per locus and each tag is detected by hybridisation to form a concatameric DNA probe labelled with multiple copies of a fluorochrome.

**Inter PBS amplification (iPBS), a universal method for isolating and displaying retrotransposon polymorphisms.** A major disadvantage of all retrotransposon-based molecular markers techniques is the need for sequence information to design element-specific primers. Although rapid retrotransposon isolation methods based on PCR with conservative primer for TE have been designed, it maybe still necessary to clone and sequence hundreds of clones to obtain a few good primers sequences. The LTRs contain no conserved motifs, which would allow their direct amplification by PCR.

There are several restriction and adaptor-based methods for LTR cloning, based on conservancy of reverse transcriptase domain, especially for Ty1-copia. Major classes of retroelements include the Pseudoviridae (Ty1-copia), the Metaviridae (Ty3 -gypsy) and the Retroposineae *LINE* (non-LTR) groups. All reverse transcribing elements can be obtained by PCR with degenerate primers. For example, Ty1-copia two degenerate primers were designed for RT domain encoding TAF<sub>10</sub>LHG and reverse site YVDDML also encoding QMDVKT and reverse YVDDML. For Ty3-gypsy element degenerate primers were designed for RT domain encoding RMCVDYR or LSGYHQI or YPLPRID and reverse encoding site YAKLSKC and LSGYHQI. The reverse transcriptase based isolation method is limited to the families of retrotransposons, which contain this sequence. Thus, for example TRIM or LARDs and unknown yet classes LTR-retrotransposons cannot be found using this approach [32].

LTR retrotransposons and all retroviruses contain tRNA conservative primer binding site for tRNA<sup>iMet</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Leu</sup> and tRNA<sup>Gln</sup>. Elongation from the 3'-terminal nucleotides of the respective tRNA results in the conversion of the viral/retrotransposon RNA genome to double-stranded DNA prior to its integration into the host DNA. While the process of reverse transcription is conserved among all retroviruses, the specific tRNA capture varies for different retroviruses and retroelements. The primer binding sequences (PBS) is universally present in all LTR-retrotransposons sequences. Hence, an isolation method for retrotransposon LTRs, which is based on the PBS sequence, has potential for cloning all possible LTR-retrotransposons.

Kalendar et al. [60] describes the development of exceedingly universal and efficient method, which utilizes the conserved parts of PBS sequences, both for direct visualization of polymorphism between individuals, transcription profile polymorphism, as for fast cloning of LTR parts from genomic DNA, or in a form of database search. In this way, any eukaryotic organism possessing LTR type of retrotransposon can be investigated. Primers, which were designed to match the conserved regions of the primer binding sequences in LTR retrotransposons, proved to be very efficient in PCR amplification of eukaryotic genomic DNA. Single PBS primers can only amplify nested inverted retrotransposons or related elements' sequences dispersed through genome DNA. PCR amplification occurs between two nested PBS and contains two LTR sequences. The PBS sequences are nested near each other in all eukaryotes (Fig.4).

Most of retrotransposons are nested, mixed, inverted or truncated in chromosomal sequences, and can be easily amplified using conservative PBS primers in any plant species tested. Fragments of LTR with retrotransposons internal part are located near other retrotransposons. Therefore, PBS sequences are very often located near to each other. This situation allows the use PBS sequences for cloning LTR.

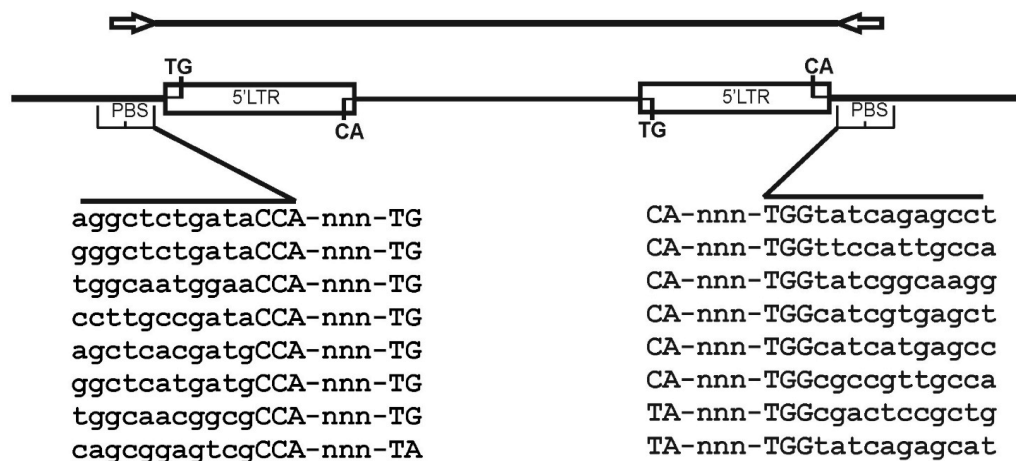


Fig. 4. The inter PBS amplification (iPBS) scheme and LTR retrotransposon structure. LTR and PBS sequence. Two nested LTR retrotransposons in inverted orientations amplified from single primer or two different primers from primer binding sites. PCR product contains both LTRs and PBS sequences as PCR primers in the termini. In figure schematically showing general structure for PBS and LTR sequences, between 5'LTR (5'-.CA) and PBS (5'-TGG..3') is spacer with several nucleotides (0–5 bases)

Where the retrotransposon density is high within genome, PBS sequences can be exploited for detection of their chance association with other retrotransposons. When retrotransposon activity or recombination has led to new genome integrations, this can be used to distinguish reproductively isolated plant line. In this case, amplified bands derived from newly inserted or recombination will be polymorphic, appearing only in plant lines in which the insertions or recombination have taken place.

After retrieving LTR sequences of a selected family of retrotransposon, and alignment is made of them to find out the most conserved region in them. The related plant species have conservative regions in LTR for identical retroelement, thus alignments of several LTR sequences from one species or mixing with sequences from the related species will identify conservative regions. Subsequently this conservative parts of LTR regions are used for inverted primers design for long distance PCR, for cloning of whole element and also for IRAP, REMAP or SSAP techniques.

The iPBS amplification technique shows about the same level of polymorphism in comparisons with IRAP and REMAP techniques and an efficient method for the detection of cDNA polymorphism and clonal differences resulting from retrotransposon activities or retrotransposon recombination after crossing-over [60].

**Retrotransposon-based molecular markers to analyse genetics diversity.** The analysis of genetic diversity and relatedness between or within different populations, species and individuals is a central task in genetics. The combination of different LTR primers or with combinations with microsatellite

primers (REMAP) allows for the generation of an almost unlimited number of unique markers.

Banding patterns were completely different if the same primers were used alone or in combinations, indicating that the majority of IRAP/REMAP bands were derived from sequences bordered by other LTR or a microsatellite on one side, and by an LTR on the other. Usually, the REMAP pattern was considerably more variable than the corresponding ISSR pattern; and often (but not always, depending from LTR sequence) IRAP pattern with primer combinations shown more variability than a single priming PCR [25; 2].

Related species have phylogenetically related TE sequences (retroelements or transposons) meaning that PCR primers from one species can be used in another. In this case, primers designed to conservative TE sequences are advantageous. TEs are dispersed at whole chromosomes and most often mixed with other elements and repeats, that is the combinations of PCR primers from different repeats help to improving PCR fingerprint.

To study closely related varieties or breeding lines, one should develop a native retrotransposon system. This requires the cloning and sequencing of elements from the new species by using iPBS amplification method or technique based on conservancy of reverse transcriptase domain. This process begins with amplification and cloning of segments between retrotransposon domains that highly or universally conserved, development of new primers specific for the retrotransposon families found, and testing these for their efficacy as markers.

The genome size of studied organism is positively correlated with the efficiency of repeat-based amplification techniques; the larger genome the most easy developing good primers for revealing multiple bands for polymorphism detection (barley, wheat); small genome organism like *Brachypodium distachyon* or *Vitis vinifera* is most difficult to PCR marker development.

S-SAP is generally carried out on sequencing gels due to the large number of products generated, whereas IRAP and REMAP are used on agarose systems. However, IRAP and REMAP can be adapted to sequencers. These methods generate tens to hundreds of products in each amplification reaction, depending on the prevalence of the retrotransposon family, the selection of the second primer — the restriction site and number of selective bases in S-SAP -, and the organization of the genome of the plant.

A marker from any of the multilocus, anonymous systems (S-SAP, IRAP, and REMAP) can be converted into a corresponding RBIP marker and vice versa. Markers from the former methods are very easy to harvest and they can be quickly examined for their informativeness before taking on the investment of developing a corresponding RBIP marker. Electrophoretically resolved bands from S-SAP, IRAP, and REMAP are derived from one side of a retrotransposon insertion. Sequencing of the isolated, informative bands will enable the design of a PCR primer corresponding to the flanking genomic DNA at one side of the insertion, assuming that the sequence is not repetitive

and therefore unusable. However, the genomic sequence flanking the other side of the element needs to be found in order to score the empty site. This can be obtained by screening germplasm accessions that are polymorphic for the original band, then carrying out S-SAP reaction on these, where the LTR primer is replaced with a primer designed to the known flank that is facing toward the insertion site.

**Conclusions.** Many features of retrotransposons make them appealing as the basis of molecular marker systems. They are ubiquitous, abundant, dispersed components of eukaryotic genomes. Their activity simultaneously leads to genome diversification and provides a means of its detection. Retrotransposons are long and produce a large genetic change at the point of insertion, thereby providing conserved sequences that can be used to detect their own integration. This event is not linked to removal of the transposable element from another locus, as it is for DNA transposons. Even the loss of the core domain of a retrotransposon by LTR-LTR recombination is invisible to the marker methods using outward-facing LTR primers. The ancestral state of a retrotransposon insertion is obvious — it is the empty site. This is very helpful in pedigree and phylogenetic analyses. Later recombination events at a full site are highly unlikely to regenerate the original empty site. In contrast, microsatellites, SNPs, and methods relying on gain or loss of restriction sites (in essence SNPs), suffer from a lack of temporal directionality in the changes they detect, resulting in the problem of homoplasy. For example, SINE elements have served to trace human roots to Africa, to determine the relationship of whales to even-toed ungulates. 1997), and to clarify the relationships between wild rice species.

Markers based on LTR retrotransposons, in one or other of the manifestations described above, generically referred to as «transposon display. The applications range from investigations of retrotransposon activation and mobility to studies of biodiversity, genome evolution and chromatin modification and epigenetic reprogramming to the mapping of genes and the estimation of genetic distance, to assessment of essential derivation of varieties, detection of somaclonal variation and cDNA fingerprinting. The retrotransposon insertions that provide useful polymorphisms are, of course, only those that are passed into the egg cells and pollen. One can thus think of the retrotransposons as sexually transmitted diseases, albeit ones that moves by a cellular, rather than extracellular, pathway into the new host.

Because LTR retrotransposons are ubiquitous, these methods are generic. Furthermore, similar approaches have been applied to the non-LTR retrotransposons in the plants, in particular to the SINE elements. The insertion pattern of the human Alu, a SINE and the most prevalent transposable element in the human genome, has not only served as a tool in many studies of human population structure, but also been linked to various heritable diseases. In principle, retrotransposon- or endogenous retrovirus-based molecular markers could prove highly useful in animals, including mammals and birds.

Commercial platforms for SNP detection (e.g., Illumina) have been developed and garnered much popularity for major crops, domestic animals, and humans. Development of SNPs depends on having abundant sequence data. The costs of acquiring this data, as well as of applying commercial assays, represent a barrier for research on underfunded tropical crops and wild species. Furthermore, evolutionary studies with SNPs are affected by the problems of homoplasy in SNP state, the lack of neutrality of genic markers, and the uneven chromosomal distribution of the highly expressed genes that are used to generate SNPs. While genetic analysis by shotgun sequencing remains a tantalizing possibility, the cost is still prohibitive. For these reasons, cheap, generic, easily applied retrotransposon marker systems will remain a viable choice for genetic markers for the foreseeable future.

#### REFERENCES

1. Lewontin R. C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* / R. C. Lewontin, J. L. Hubby // *Genetics*. — 1966. — Vol. 54, № 2. — P. 595–609.
2. Kan Y.W. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation / Y.W. Kan, A. M. Dozy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1978. — Vol. 75, № 11. — P. 5631–5635.
3. Lee D. A copia-like element in *Pisum* demonstrates the uses of dispersed repeated sequences in genetic analysis / D. Lee, T. Ellis, L. Turner [et al.] // *Plant Mol. Biol.* — 1990. — Vol. 15. — P. 707–722.
4. Williams J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers / J. Williams, A. Kubelik, K. Livak [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 18, № 22. — P. 6531–6535.
5. Welsh J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh, M. McClelland // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 18, № 24. — P. 7213–7218.
6. Caetano-Anolles G. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers / G. Caetano-Anolles, B. Bassam, P. Gresshoff // *Bio/Technology*. — 1991. — Vol. 9. — P. 553–557.
7. Meyer W. Hybridization probes for conventional DNA-fingerprinting used as single primers in the polymerase chain-reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans* / W. Meyer, T. Mitchell, E. Freedman [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31, № 9. — P. 2274–2280.
8. Sivolap Y. The genetic polymorphism of cereals demonstrated by PCR with random primers / Y. Sivolap, R. Kalendar, S. Chebotar // *Cytology and Genetics*. — 1994. — Vol. 28, № 6. — P. 54–61.
9. Salimath S. S. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers / S. Salimath, A. de Oliveira, I. Godwin [et al.] // *Genome*. — 1995. — Vol. 38, № 4. — P. 757–763.
10. Charlieu J. P. 3' Alu PCR: a simple and rapid method to isolate human polymorphic markers / J. Charlieu, A. Laurent, D. Carter [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1992. — Vol. 20, № 6. — P. 1333–1337.



11. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers / D. Tautz // *Nucleic Acids Res.* — 1989. — Vol. 17, № 16. — P. 6463–6471.
12. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // *Genomics.* — 1994. — Vol. 20, № 2. — P. 176–183.
13. Finnegan D. Eukaryotic transposable elements and genome evolution / D. Finnegan // *Trends in Genetics.* — 1989. — Vol. 5. — P. 103–107.
14. Flavell A. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants / A. Flavell, E. Dunbar, R. Anderson [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1992. — Vol. 20, № 14. — P. 3639–3644.
15. Voytas D. Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants / D. Voytas, M. Cummings, A. Konieczny [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1992. — Vol. 89. — P. 7124–7128.
16. Kalendar R. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes / R. Kalendar, C. Vicent, O. Peleg et al. // *Genetics.* — 2004. — Vol. 166, № 3. — P. 1437–1450.
17. Frankel A. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA / A. Frankel, J. Young // *Annu. Rev. Biochem.* — 1998. — Vol. 67. — P. 1–25.
18. Wicker T. A unified classification system for eukaryotic transposable elements / T. Wicker, F. Sabot, A. Hua-Van [et al.] // *Nature Rev. Genet.* — 2007. — Vol. 8, № 12. — P. 973–982.
19. Paterson A. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses / A. Paterson, J. Bowers, R. Bruggmann et al. // *Nature.* — 2009. — Vol. 457, № 7229. — P. 551–556.
20. Consortium I. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome / I. Consortium, K. Mayer, R. Waugh [et al.] // *Nature.* — 2012. — Vol. 491, № 7426. — P. 711–716.
21. International Wheat Genome Sequencing C. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome // *Science.* — 2014. — Vol. 345, № 6194. — P. 1251788.
22. Grandbastien M. *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics / M. Grandbastien, A. Spielmann, M. Caboche // *Nature.* — 1989. — Vol. 337. — P. 376–380.
23. Nelson D. Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources / D. Nelson, S. Ledbetter, L. Corbo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1989. — Vol. 86, № 17. — P. 6686–6690.
24. Sinnott D. Alu-morphs--human DNA polymorphisms detected by polymerase chain reaction using Alu-specific primers / D. Sinnott, M. Deragon, L. Simard [et al.] // *Genomics.* — 1990. — Vol. 7, № 3. — P. 331–334.
25. Leigh F. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques / F. Leigh, R. Kalendar, V. Lea [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* — 2003. — Vol. 269, № 4. — P. 464–474.
26. Teo C. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana / C. Teo, S. Tan, C. Ho [et al.] // *J. Plant Biol.* — 2005. — Vol. 48, № 1. — P. 96–105.
27. Antonius-Klemola K. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports / K. Antonius-Klemola, R. Kalendar

- dar, A. Schulman // *Theor. Appl. Genet.* — 2006. — Vol. 112, № 6. — P. 999–1008.
28. Schulman A. A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics / A. Schulman, R. Kalendar // *Cytogen. Genome Res.* — 2005. — Vol. 110, № 1–4. — P. 598–605.
  29. Vukich M. Genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and in the *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers / M. Vukich, A. Schulman, T. Giordani [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2009. — Vol. 119, № 6. — P. 1027–1038.
  30. Kalendar R. The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity / R. Kalendar // *Ratarstvo i povrtarstvo.* — 2011. — Vol. 48, № 2. — P. 261–274.
  31. Kalendar R. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers / R. Kalendar, A. Flavell, T. Ellis et al. // *Heredity.* — 2011. — Vol. 106, № 4. — P. 520–530.
  32. Kalendar R. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS / R. Kalendar, A. Schulman // *Methods Mol Biol.* — 2014. — Vol. 1115. — P. 233–255.
  33. Manninen O. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley / O. Manninen, R. Kalendar, J. Robinson [et al.] // *Mol. General Genet.* — 2000. — Vol. 264, № 3. — P. 325–334.
  34. Waugh R. Genetic distribution of BARE-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). / R. Waugh, K. McLean, A. Flavell [et al.] // *Mol. General Genet.* — 1997. — T. 253. — P. 687–694.
  35. Lou Q. Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits / Q. Lou, J. Chen // *Genome.* — 2007. — Vol. 50, № 9. — P. 802–810.
  36. Moisy C. The *Tw1* retrotransposon family is conserved between plant genomes separated by over 100 million years / C. Moisy, A. Schulman, R. Kalendar [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2014. — Vol. 127, № 5. — P. 1223–1235.
  37. Yu G. An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid *Avena* / G. Yu. R. Wise // *Genome.* — 2000. — Vol. 43. — P. 736–749.
  38. Queen R. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat / R. Queen, B. Gribbon, C. James [et al.] // *Mol. General Genomics.* — 2004. — Vol. 271. — P. 91–97.
  39. Porceddu A. Development of S-SAP markers based on an LTR-like sequence from *Medicago sativa* L. / A. Porceddu, E. Albertini, G. Baracaccia [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* — 2002. — Vol. 267. — P. 107–114.
  40. Gribbon B. Phylogeny and transpositional activity of *Ty1*-copia group retrotransposons in cereal genomes / B. Gribbon, S. Pearce, R. Kalendar [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* — 1999. — Vol. 261, № 6. — P. 883–891.
  41. Tahara M. Isolation of an active element from a high-copy-number family of retrotransposons in the sweetpotato genome / M. Tahara, T. Aoki, S. Suzuka et al. // *Mol. General Genomics.* — 2004. — Vol. 272. — P. 116–127.
  42. Ellis T. Polymorphism of insertion sites of *Ty1*-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea / T. Ellis, S. Poyser, M. Knox et al. // *Mol. General Genet.* — 1998. — Vol. 260. — P. 9–19.

43. Tam S. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR / S. Tam, C. Mhiri, A. Vogelaar et al. // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — Vol. 110. — P. 819–831.
44. Nagy E. Characterization of chromosome-specific S-SAP markers and their use in studying genetic diversity in *Aegilops* species / E. Nagy, I. Molnar, A. Schneider et al. // *Genome.* — 2006. — Vol. 49. — P. 289–296.
45. Venturi S. Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers / S. Venturi, L. Dondini, P. Donini [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2006. — Vol. 112. — P. 440–444.
46. Syed N. Sequence-specific amplification polymorphisms (SSAPs): a multi-locus approach for analyzing transposon insertions / N. Syed, A. Flavell // *Nature Protocols.* — 2006. — Vol. 1, № 6. — P. 2746–2752.
47. Syed N. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers / N. Syed, A. Sørensen, R. Antonise et al. // *Theor. Appl. Genet.* — 2006. — Vol. 112, № 3. — P. 517–527.
48. García-Martínez J. Study on the evolution of the grande retrotransposon in the *Zea* genus / J. García-Martínez, J. Martínez-Izquierdo // *Mol. Biol. Evol.* — 2003. — Vol. 20, № 5. — P. 831–841.
49. Petit M. Differential impact of retrotransposon populations on the genome of allotetraploid tobacco (*Nicotiana tabacum*) / M. Petit, K. Lim, E. Julio [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* — 2007. — Vol. 278, № 1. — P. 1–15.
50. Van den Broeck D. Transposon Display identifies individual transposable elements in high copy number lines / D. van den Broeck, T. Maes, M. Sauer [et al.] // *Plant J.* — 1998. — Vol. 13. — P. 121–129.
51. Chang R. Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach / R. Chang, L. O'Donoghue, T. Bureau // *Theor. Appl. Genet.* — 2001. — Vol. 102, № 5. — P. 773–781.
52. Kalendar R. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar, T. Grob, M. Regina et al. // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — Vol. 98, № 5. — P. 704–711.
53. Kalendar R. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting / R. Kalendar, A. Schulman // *Nature Protocols.* — 2006. — Vol. 1, № 5. — P. 2478–2484.
54. Brik A. F. IRAP-and REMAP-analyses of barley varieties of Odessa breeding / A. Brik, R. Kalendar, O. Stratula et al. // *Cytology and Genetics.* — 2006. — Vol. 40, № 3. — P. 24–33.
55. Boyko E. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function / E. Boyko, R. Kalendar, V. Korzun [et al.] // *Plant Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 48, № 5. — P. 767–790.
56. Smykal P. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers / P. Smykal, N. Bacova-Kerteszo-va, R. Kalendar et al. // *Theor. Appl. Genet.* — 2011. — Vol. 122, № 7. — P. 1385–1397.
57. Boronnikova S. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants / S. Boronnikova, R. Kalendar // *Russian J. Genet.* — 2010. — Vol. 46, № 1. — P. 36–42.

58. Kalendar R. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence / R. Kalendar, J. Tanskanen, S. Immonen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2000. — Vol. 97, № 12. — P. 6603–6607.
59. Flavell A. A microarray-based high throughput molecular marker genotyping method: the tagged microarray marker (TAM) approach / A. Flavell, V. Bolshakov, A. Booth [et al.] // Nucleic Acids Res. — 2003. — Vol. 31. — P. e115.
60. Kalendar R. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar, K. Antonius, P. Smýkal [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 2010. — Vol. 121, № 8. — P. 1419–1430.

Receive 10.07.2015.

УДК 577.2.08

**Календар Р. М.**

### **МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ НА ОСНОВІ РЕТРОТРАНСПОЗОНІВ**

Молекулярні маркери набули широкого застосування в сучасній генетиці, селекції рослин, генетичному картуванні та ідентифікації генів, у судово-медичній експертизі людини та ветеринарії. Ретротранспозони є ідеальними маркерами, адже вони локалізовані у всіх хромосомах еукаріот і мають потенційну можливість копіювати себе способом реплікативної транспозиції. Оскільки ретротранспозони складають основну частину геному еукаріот і потенційно активні, на їхній основі були розроблені різні системи ДНК-маркерів для виявлення генетичного поліморфізму. Огляд дає уявлення про основні напрями застосування послідовностей ретротранспозонів як молекулярних маркерів, розроблених для рослин, оцінює можливості їхнього застосування при аналізі генетичного різноманіття досліджуваних культур. Також розглянуто способи швидкого виділення ретротранспозонів для нових видів.

УДК 577.2.08

**Календарь Р. Н.****МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ НА ОСНОВЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ**

Молекулярные маркеры широко используются в современной генетике, селекции растений, при генетическом картировании и идентификации генов, в судебно-медицинской экспертизе человека, ветеринарии. Ретротранспозоны являются идеальными молекулярными маркерами, так как локализованы во всех хромосомах эукариот и имеют потенциальную возможность копировать себя способом репликативной транспозиции. Поскольку ретротранспозоны составляют основную часть генома эукариот и потенциально активны, на их основе были разработаны различные системы ДНК-маркеров для выявления генетического полиморфизма. Обзор дает представление об основных подходах применения последовательностей ретротранспозонов в качестве молекулярных маркеров, разработанных для растений, оценивает возможности их применения при анализе генетического разнообразия исследуемых культур. Также рассмотрены способы быстрого выделения ретротранспозонов для новых видов.

УДК 633.16:631.527

О. І. РИБАЛКА, д. б. н., зав. від.,

З. В. ЩЕРБИНА, к. с.-г. н., пров. наук. співроб.

СГІ — НЦНС, Одеса

e-mail: rybalkaalexander@gmail.com, zoyasgi09@ukr.net

## **ПШЕНИЦЯ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ АМІЛОЗИ — НОВЕ СЛОВО В СЕЛЕКЦІЇ КУЛЬТУРИ**

*Пшеничний крохмаль є важливим джерелом енергії у харчуванні людини, а надто той, що містить підвищену кількість амілози. Існує висока кореляційна залежність між умістом амілози і резистентного крохмалю, який має доведений позитивний вплив на здоров'я людини, зокрема знижує ризик ожиріння і діабету. У статті наведено характеристики генетичних методів RNAi та TILLING, застосування яких дозволяє суттєво підвищити вміст амілози в зерні. Найефективнішим є метод RNAi — забезпечує зростання кількості амілози до більш ніж 70 %, що є радикальним шляхом поліпшення харчової цінності культури.*

*Ключові слова: пшениця, дієтична клітковина, крохмаль, резистентний крохмаль, амілоза, амілопектин, ключові ферменти, біосинтез, RNAi, TILLING, харчова цінність.*

**Вступ.** Зерно пшениці містить до 70 % крохмалю, який є основним запасним вуглеводом і відіграє важливу роль у нашому харчуванні. До складу крохмалю входять два типи водонерозчинних гомоглюканів: 25–28 % амілози і 72–75 % амілопектину [1].

Амілоза — це лінійний полімер D-глюкопіранозил залишків глюкози, пов'язаних між собою  $\alpha$ -(1,4)-зв'язками. Ступінь полімеризації амілози — у межах 500–6000 залишків глюкози з молекулярною масою  $8 \times 10^4$ – $10^6$ . Амілопектин, як основний компонент натурального крохмалю, відповідає за гранулярну структуру останнього, містить від 30000 до 3000000 залишків глюкози і має значно вищу, ніж амілоза, молекулярну масу —  $10^7$ – $10^9$ . На відміну від лінійної амілози, амілопектин є полісахаридом з високим ступенем розгалуження і містить лінійні ланцюги  $\alpha$ -(1,4)-D-глюкопіранози з численним боковим (через кожні 20–25 залишків глюкози) розгалуженням за рахунок  $\alpha$ -(1,6)-глікозидних зв'язків, що їх називають точками гілкування амілопектину (рис. 1, 2) [2]. Бокові відгалуження амілопектину розміщені упродовж молекулярної структури не випадково, а організовані у кластерні структури у формі А, В і С ланцюгів. Ланцюги А не містять жодних інших ланцюгів, вони з'єднані з ланцюгами В, які, своєю чергою, поєднані з ланцюгами С (рис. 2).

Амілоза і амілопектин, як складові крохмалю, упаковані в крохмальні гранули трьох типів: А тип — великі за розміром (10–20 мікрон у діаметрі) лінзоподібні гранули, що становлять 50 % загальної маси крохмалю; В тип — сферичні (< 10 мікрон) гранули і С тип — дрібні (< 10 мікрон), переважно нерегулярні за формою. Гранули В і С типів переважають серед усіх типів гранул за кількістю (> 90 %) [5].

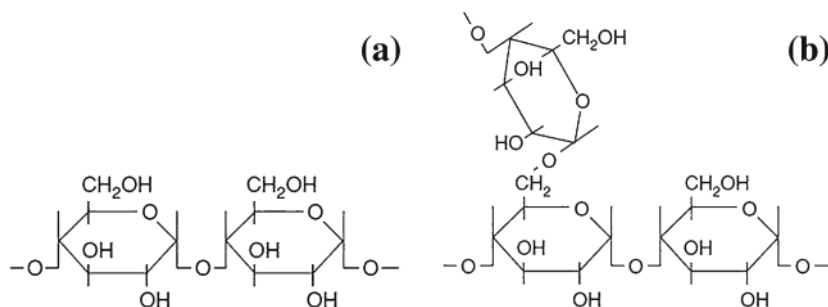


Рис. 1. Молекулярна структура амілози (а) і амілопектину (b) [3]

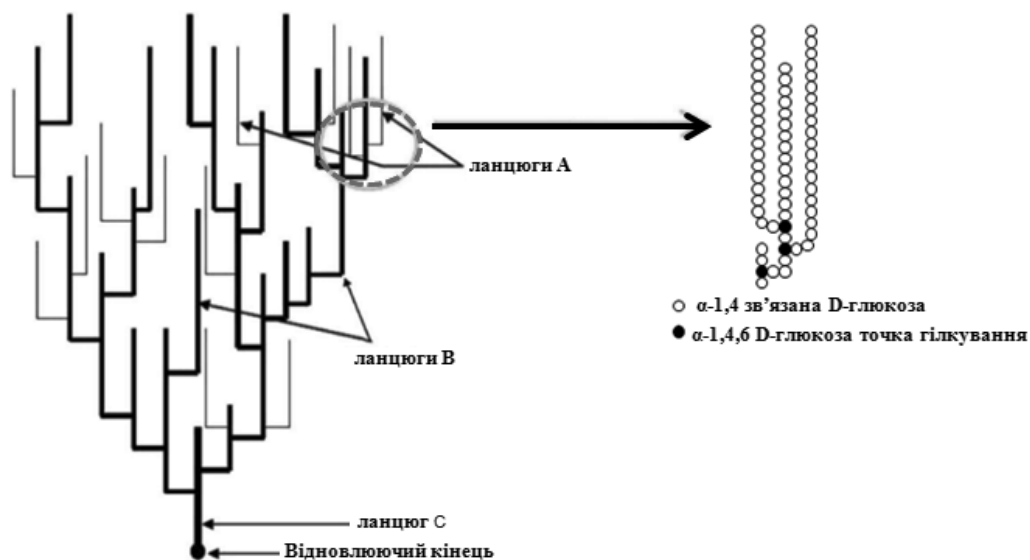


Рис. 2. Кластерна організація молекули амілопектину [4]

Крохмальна гранула є напівкристалічною структурою і містить відповідно кристалічну (30 % маси гранули) та аморфну (70 % маси гранули) зони. Аморфна зона крохмальної гранули містить, в основному, амілозу і незначну частину амілопектину. Кристалічну зону крохмальної гранули утворює амілопектин. Ця частина поліморфна за структурою амілопектину, яку поділяють на три типи: амілопектин А (ланцюги розміром 23–29 залишків глюкози); амілопектин В (30–44 залишків глюкози); амілопектин С — суміш А і В типів. Пшениця містить крохмальні гранули, утворені переважно амілопектином типу А [6].

**Співвідношення амілоза/амілопектин у структурі крохмалю відіграють стратегічну роль у визначенні форми і фізичної організації крохмальних гранул, біохімічних, технологічних і, головне, харчових характеристик крохмалю.** Оскільки масово вживані продукти переробки зерна пшениці містять левову частку крохмалю, то його харчова (біологічна) цінність є головним предметом обговорення цієї статті.

**Однією з найважливіших характеристик крохмалю у контексті його біологічної цінності є кінетика або швидкість трансформації крохмалю в глюкозу у шлунково-кишковому тракті людини.** Слід наголосити, що в шлунково-кишковому тракті людини є лише один фермент, який бере участь у засвоєнні вуглеводів, — це  $\alpha$ -амілаза. З-поміж вуглеводів їжі вона розщеплює лише крохмаль. Для характеристики швидкості трансформації крохмалю в глюкозу в дієтології використовується гліцемічний індекс (glycemic index, GI), скорочено ГІ (рис. 3). ГІ глюкози прийнято за 100 одиниць. ГІ продукту харчування вважають високим у межах 70–100 одиниць, середнім — між 50 і 70 і низьким — менше 50 одиниць.

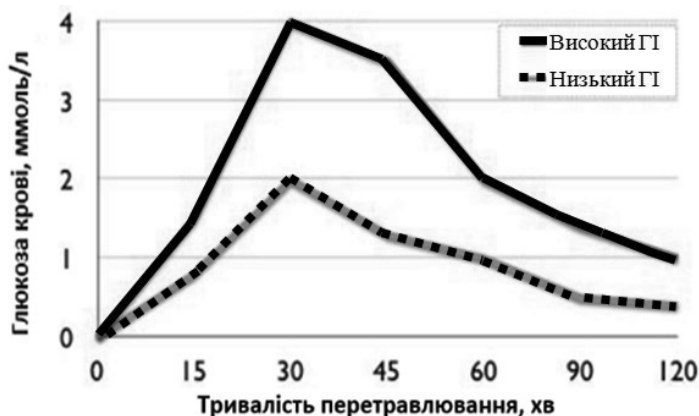


Рис. 3. Концентрація глюкози у крові при вживанні продуктів з високим ГІ і низьким ГІ гліцемічними індексами [7]

**Що вище гліцемічний індекс продукту, то і вищий пік глюкози утворюється в крові після вживання такої їжі, і тим вищою має бути секреція підшлунковою залозою гормону інсуліну для засвоєння глюкози клітинами** (рис. 4).

Систематичний надлишок глюкози в крові має важкі патологічні наслідки, такі як запалення органів, надлишкова маса тіла, поява стійкості до інсуліну, метаболічний синдром і кінцевий результат — діабет 2-го типу (рис. 5, 6).

При цьому **важливо наголосити, що хліб і хлібопродукти із зерна пшениці, як зазначено вище, містять у складі крохмалю амілопектин, тип А, який швидше від інших типів амілопектину трансформується в глюкозу.** Як наслідок, хліб і хлібопродукти мають високі



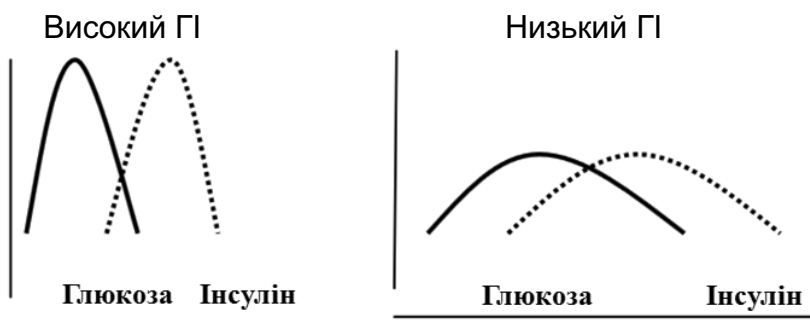


Рис. 4. Секреція інсуліну при вживанні продуктів з високим і низьким гліцемічними індексами [7]

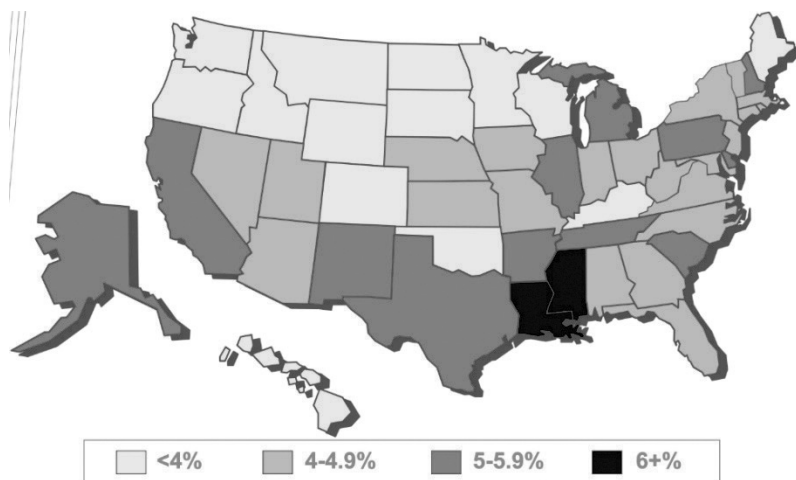


Рис. 5. Захворюваність на діабет у США у 1994 році [7]

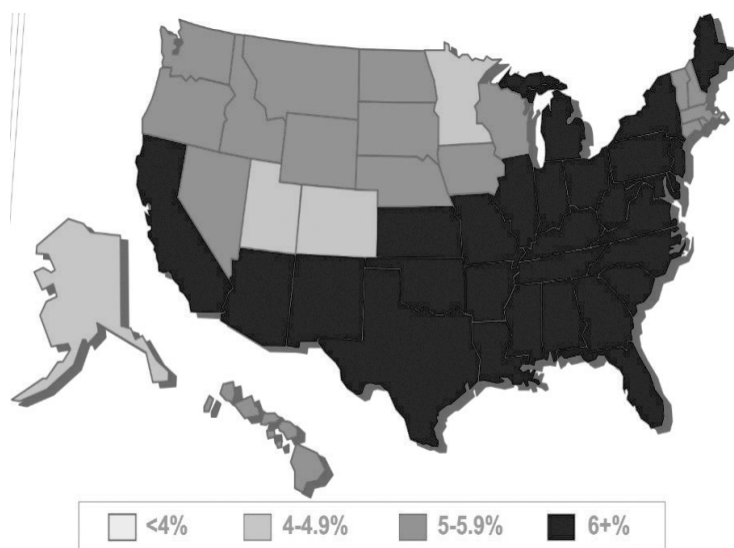


Рис. 6. Захворюваність на діабет у США у 2004 році [7]

гліцемічні індекси — від 70 до 90 і вище, і, отже створюють ризик розвитку перелічених вище патологій. Тому не випадково нормування вуглеводистих продуктів для діабетиків визначають у хлібних одиницях. Одна хлібна одиниця дорівнює 10–12 г засвоюваних вуглеводів або 20 г білого пшеничного хліба. Одна хлібна одиниця підвищує вміст цукру у крові на 2,8 ммоль/літр і потребує для засвоєння організмом 2 одиниці інсуліну.

Сучасний стиль харчування цивілізованого людства суттєво змістився в бік зменшення в раціоні натуральних продуктів та їхнього заміщення рафінованими крохмалистими продуктами, які швидко готуються та засвоюються, мають високу калорійність. Малорухомий спосіб життя людей у поєднанні з сучасним стилем харчування створюють умови для накопичення надлишкової маси тіла, ожиріння, яке в сучасному технологічно розвинутому світі набуває ознак пандемії. І як наслідок, останніми десятиріччями суттєво зріс ризик поширення ознак гіпертензії, дисліпідемії, діабету 2-го типу, серцево-судинних та інших хронічних патологій (рис. 5, 6). Серед крохмалистих продуктів, що є складовою сучасного стилю нездорового харчування, чільне місце займають саме продукти із зерна пшениці.

**Радикальним шляхом поліпшення раціону щодо здорового харчування людей сучасна дієтологія вважає суттєве збільшення у їхньому раціоні частки дієтичної клітковини.** Згідно з визначенням Асоціації зернових хіміків США (ААСС), «дієтична клітковина... стійка до дії ферментів травлення та всмоктування у тонкому кишківнику, але з повним або частковим перетравлюванням у товстому кишківнику... спричиняє позитивний фізіологічний ефект включно з релаксацією, зниженням у крові вмісту холестерину та глюкози». На жаль, цивілізоване людство у більшості належним чином ще не оцінило значення дієтичної клітковини у харчуванні. Так, згідно даних Національної академії наук та Інституту медицини США, американці в середньому вживають менше 20 г/добу дієтичної клітковини замість рекомендованих 38 г/добу для дорослої особи чоловічої і 25 г/добу для особи жіночої статі. **Одним із важливих для здоров'я різновидів дієтичної клітковини експерти ФАО та ВОЗ вважають стійкий до перетравлювання так званий резистентний крохмаль (resistant starch, RS) [7].**

Саме термін «резистентний крохмаль» означає, що між типами крохмалю існує істотна відмінність за їхньою стійкістю до ферментів. Крохмаль, що вживається для харчових цілей, за швидкістю перетравлювання розподіляється на три категорії (за Englyst тестом): швидко перетравлюваний (RDS) — тривалість деградації у середовищі зі стандартною ферментною сумішшю 20 хв; повільно перетравлюваний (SDS) — тривалість ферментативної деградації 120 хв; стійкий до перетравлювання (RS) резистентний крохмаль з тривалістю деградації понад 120 хв [8]. Вперше запропонований Englyst et al. (1982) термін «резистентний крохмаль» був згодом формально визначений європейською інституцією EURESTA

як «крохмаль або продукт деградації крохмалю, що не перетравлюється у тонкому кишківнику людини, але повністю або частково ферментується у товстому кишківнику і діє як харчовий субстрат для мікрофлори кишківника, як пребіотичний матеріал» [9, 10].

Мимохідь пояснимо два, пов'язані з темою статті, терміни «пребіотики» і «пробіотики», оскільки це важливо для подальшого тлумачення матеріалу. Пробіотики (probiotics) — мікроорганізми (лактобактерії, біфідобактерії), що належать переважно до таких родів як *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* та *Lactobacillus*. Це мікроорганізми-симбіотики, що населяють кишківник, переробляють речовини-пребіотики як поживний субстрат і спричинюють позитивний фізіологічний вплив на здоров'я людини, синтезуючи в результаті своєї життєдіяльності коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК): оцтову, пропіонову, молочну та особливо бутилову. Своєю чергою КЛЖК всмоктуються у кишківнику, поліпшуючи засвоєння організмом води та мінеральних солей. КЛЖК є надзвичайно важливим джерелом енергії для печінки, вони живлять епітеліальні клітини, що вистилають кишківник, сприяють їх відновленню, росту і диференціації. **В результаті метаболічного засвоєння мікрофлорою кишківника резистентного крохмалю виявлені наступні позитивні фізіологічні ефекти: покращується загальний стан санації і здоров'я кишківника; зростає чисельність корисної мікрофлори (пребіотичний ефект); збільшується вихід калових мас та покращується процес очищення кишківника; знижується рН кишкового середовища та зменшується синтез потенційно шкідливих вторинних жовчних кислот, аміаку і фенолів; спостерігається протидія деградації мукоїдного шару, що захищає клітини кишківника; посилюється ефект зворотної дії на процеси неоплазії і канцерогенезу; індукується апоптоз (програмована смерть) пошкоджених клітин кишківника тощо** [15].

Пребіотики (prebiotics) — дієтична клітковина або речовини — компоненти продуктів харчування, що не всмоктуються у тонкому кишківнику, але справляють перелічені вище позитивні фізіологічні ефекти на здоров'я людини, стимулюючи ріст і розвиток корисної мікрофлори кишківника. До класу дієтичної клітковини (пребіотичного матеріалу) належать наступні компоненти їжі: полісахариди (пектин, геміцеллюлози, гуммі, інулін і резистентний крохмаль), олігосахариди (рафіноза, стахіоза, фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, резистентний декстрин) та деякі цукри і полози, що не всмоктуються у тонкому відділі кишківника (манітол, лактітол). **Отже, резистентний крохмаль є дієтичною клітковиною і водночас типовим пребіотиком рослинного походження, продуктом «харчування» для корисної мікрофлори кишківника (пробіотиків) і дієтичною клітковиною у раціоні людини.** Зазначимо, що 50 % резистентного крохмалю в організм людини надходить з продуктами масового вжитку із зерна пшениці. Тому підви-

щення вмісту резистентного крохмалю в зерні пшениці — це стратегічне завдання сучасної біотехнології взагалі. Резистентний крохмаль класифікують у чотири загальні підтипи: RS1, RS2, RS3 та RS4, що схематично зображені на рис. 7 [8,11,12].

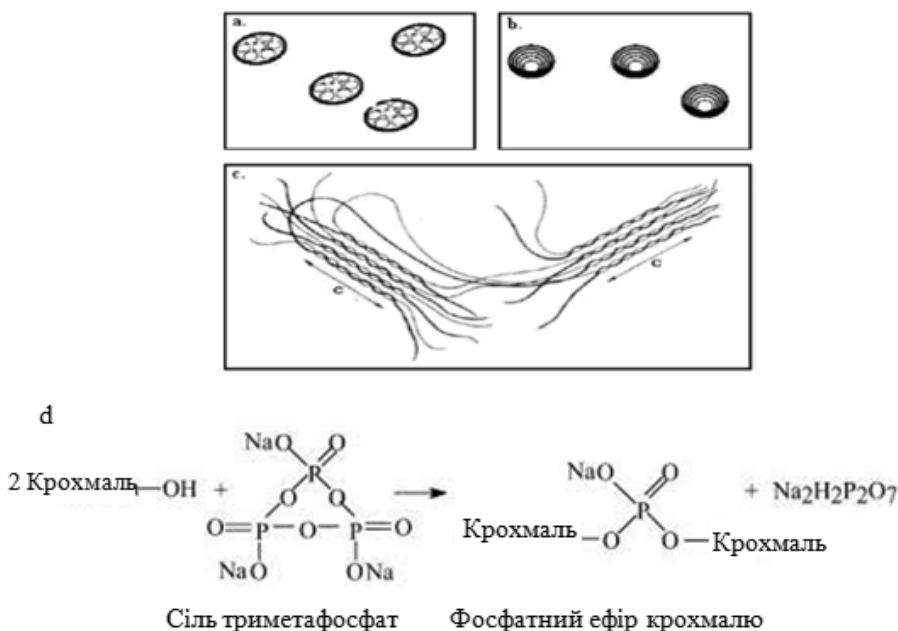


Рис. 7. Підтипи резистентного крохмалю: (a) RS1, (b) RS2, (c) RS3, (d) RS4 [12]

Підтип RS1 — нативний крохмаль, що має компакту кристалічну структуру, яка утруднює доступ ферментів травлення, термостійкий, знаходиться у зерні зернових культур, коренеплодах. Підтип RS2 — це також нативний крохмаль, присутній у сирій картоплі, бананах та зерні високоамілозної кукурудзи. Унікальна кристалічна структура цього крохмалю не руйнується навіть при кулінарній обробці та лімітує дію ферментів травлення. **Саме про цей тип крохмалю піде мова нижче.** Підтип RS3 — це негранулярний крохмаль, що набуває резистентності після кулінарної, термічної, обробки (желатинізації) та охолодження. Це так званий деградований крохмаль. Підтип RS4 — хімічно модифікований крохмаль як результат молекулярної конверсії, заміщення, зшивки, етерифікації. Внаслідок хімічної модифікації він набуває стійкості до ферментів травлення.

Розглянемо механізм формування резистентного крохмалю у зерні пшениці. **В його основі лежить співвідношення між вмістом у крохмалі амілози і амілопектину. Підвищення у складі крохмалю вмісту амілози, яка суттєво гірша за амілопектин А, перетравлюється у шлунково-кишковому тракті, тісно позитивно корелює з формуванням резистентного крохмалю** [12]. Молекула амілопектину має значно більші розміри, ніж молекула амілози. Як наслідок, вона має більшу площу, яку спроможні атакувати амілолітичні ферменти і тому швид-

ше перетравлюється у шлунково-кишковому тракті. Молекули ж амілози тісно пов'язані одна з одною водневими зав'язками, що підвищує стійкість амілози до дії ферментів і лежить в основі формування резистентного крохмалю [13].

**Отже, що вище вміст амілози у крохмалі, то гірше такий крохмаль желатинізується, то більш чутливий він до ретроградації. Відповідно високоамілозний крохмаль як *in vitro*, так і *in vivo* значно гірше перетравлюється у порівнянні зі звичайним крохмалем з типовим співвідношенням амілоза/амілопектин 25–28 % / 75–72 % [14].**

Яким же чином можна підвищити вміст амілози у складі крохмалю пшениці? На це запитання дає чітку відповідь сучасна генетика і біотехнологія. На сьогодні генетика біосинтезу крохмалю пшениці достатньо добре вивчена і розроблені ефективні методи експериментальної зміни вмісту амілози в крохмалі як у бік її часткового зниження (пшениця частково ваксі) або повного блокування біосинтезу (пшениця ваксі), так і її суттєвого підвищення (високоамілозна пшениця).

На рисунку 8 і таблиці 1 подано схему біосинтезу крохмалю зерна пшениці, роль ключових ферментів у трансформації глюкози в амілозу і амілопектин та локалізацію у хромосомах генів, що кодують біосинтез ключових ферментів біосинтезу крохмалю.

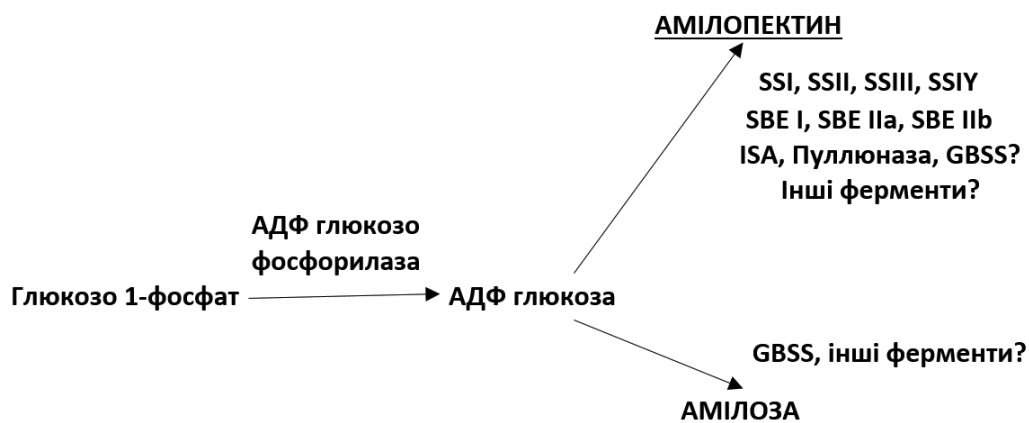


Рис. 8. Схема біосинтезу крохмалю зерна пшениці [16]

У таблиці 1 подано також інформацію про те, серед яких генетичних систем контролю біосинтезу крохмалю ідентифіковано мутантні алелі. Наведемо коротко характеристику окремих ключових ферментів біосинтезу крохмалю та їхні функції.

*GBSS I* — синтаза крохмалю, фермент відповідає за функцію елонгації ланцюгів глюкози шляхом додавання залишків глюкози з нередукованого кінця. Фермент відомий ще як «протеїн ваксі» і є одноланцюговим поліпептидом з молекулярною масою близько 68 кДа, кодується домінуючими алелями *Wx* відповідних генів [17]. Відсутність активності

Таблиця 1

Генетичний контроль ключових ферментів біосинтезу крохмалю в зерні пшениці [16]

Гени для ключових ферментів	Розмір кодового поліпептиду, кДа	Локалізація генів у хромосомах	Ідентифіковані мутації
АДФ-глюкозо пірофосфорилаза велика субодиниця	57,8	1AS, 1B, 1D	Ні
АДФ-глюкозо пірофосфорилаза мала субодиниця	52,1	7AS, 7B, 7D	Ні
Асоційована з гранулами синтаза крохмалю I (GBSS I)	67,7	7AS, 4AL, 7DS	Так
Синтаза крохмалю I (SS I)	71	7AS, 7BS, 7DS	Ні
Синтаза крохмалю II (SS II)	87,2	7AS, 7BS, 7DS	Так
Синтаза крохмалю III (SS III)	183,1	1AS	Ні
Синтаза крохмалю IV (SS IV)	103,1	?	Ні
Фермент гілкування I (SBE I)	91,3	7AL, 7BL, 7DL	Так
Фермент гілкування IIa (SBE IIa)	92,6	2AL, 2BL, 2DL	Ні
Фермент гілкування IIb (SBE IIb)	94,4	2A, 2B, 2D	Ні
Ізоамілаза I (ISA 3)	88,7	7AS, 7BS, 7DS	Ні

*GBSS I* призводить до появи відомого фенотипу «ваксі» і практично повного блокування біосинтезу амілози. Ген *Wx* для *GBSS I* містить 11 екзонів і має відносно невеликий розмір, приблизно 3 кб від першого до останнього ексону. Гени *Wx* для *GBSS I* локалізовані на кінцях коротких плечей гомеологічних хромосом 7A (*Wx-A1*) і 7D (*Wx-D1*) та в довгому плечі хромосоми 4A (*Wx-B1*) — як результат транслокації короткого плеча хромосоми 7B (7BS.4AL). Геном-специфічні гомеологічні ізоформи *GBSS I* характеризуються 95 %-ою ідентичністю у послідовності нуклеотидів. Активність *GBSS I* і відповідно біосинтез амілози повністю заблокований, а фенотип «ваксі» проявляється у генотипів, що несуть у гомозиготному стані всі три рецесивні алелі генів *Wx*.

*SS I* — синтаза крохмалю, асоційована з крохмальними гранулами. Синтаза крохмалю — це поліпептид масою 70 кДа. Ген, що кодує *SS I*, локалізований у короткому плечі хромосом гомеологічної групи 7 проксимально *GBSS I* генів. Ген для *SS I* має розмір 10 кб і містить 15 екзонів. Ідентичність нуклеотидних гомеологічних послідовностей генів для *SS I*, як і для *GBSS I*, становить 95 %. Конкретна роль цього ферменту у пшениці не відома [18]. Дослідження аналогічного ферменту у кукурудзи дає підстави для припущення, що він здійснює елонгацію коротких ланцюгів до 10 залишків глюкози.

*SS II* — синтаза крохмалю, фермент, асоційований з крохмальними гранулами, представлений кількома поліпептидами *SS IIa* і *SS IIb* різної молекулярної маси. *SS IIb* в ендоспермі не експресується. Ген для *SS IIa* локалізований у коротких плечах хромосом гомеологічної групи 7 проксимально гена для *SS I*. Він містить 8 екзонів і має розмір 10 кб. За від-

сутності активності *SS IIa* у мутантної форми пшениці крохмаль містить до 35 % амілози разом з підвищеною часткою резистентного крохмалю і має температуру желатинізації на 10°C нижчу від норми [19].

*SS III* — синтаза крохмалю, поліпептид масою 184 кДа, кодується геном, що розміщений у короткому плечі хромосоми 1AS пшениці. У кукурудзи відсутність активності *SS III* призводить до скорочення довжини ланцюгів амілопектину та підвищення густини крохмалю. У пшениці функція *SS III* залишається малодослідженою [20].

*SS IV* — синтаза крохмалю добре досліджена на культурі рису. У пшениці фермент ідентифікований у листях і наразі мало досліджений.

*SBE I* — фермент гілкування амілопектину, асоційований з крохмальними гранулами великих розмірів. Ген, що кодує *SBE I*, містить 22 екسونи і розміщений у довгому плечі хромосом гомеологічної групи 7. Відсутність цього гена у мутантної лінії пшениці не приводить до якихось суттєвих змін у складі та фізичних властивостях крохмалю [21].

*SBE II* — фермент гілкування амілопектину. В усіх злаків фермент *SBE II* представлений у двох ізоформах — *SBE IIa* та *SBE IIb*. В ендоспермі пшениці ізоформа *SBE IIa* є домінуючим ферментом гілкування амілопектину. Однак у крохмальних гранулах домінує ізоформа *SBE IIb* у співвідношенні до *SBE IIa* як 3:2. Обидві ізоформи мають однакову молекулярну масу і не розділяються шляхом електрофорезу, а лише шляхом йонообмінної хроматографії. *SBE IIa* ген містить 22 екسونи, і має розмір 17 кб. У пшениці гени для обох *SBE IIa* та *SBE IIb* ферментів локалізовані у довгих плечах хромосом гомеологічної групи 2. Є ще кілька ферментів, роль яких у біосинтезі крохмалю є мінорною, тому ми не зупинятимемось на них.

**Отже, за логікою процесу біосинтезу крохмалю в основі технології підвищення вмісту амілози (і відповідно *RS* крохмалю) мають бути генетичні маніпуляції, спрямовані на інактивацію ключових ферментів біосинтезу амілопектину. Особливо це стосується ферментів, які виконують функцію гілкування молекули амілопектину, адже молекула амілопектину, що не гілкується, практично трансформується в молекулу амілози.** Сьогодні цільовими генами, на блокування експресії яких спрямовані сучасні біотехнологічні методи, головним чином є гени, що кодують ферменти гілкування амілопектину класу II (*SBE IIa/b*) та синтаза II (*SS II* або *SGP-1*) [22]. Найбільш ефективними за отриманими результатами підвищення вмісту амілози в зерні пшениці сьогодні визнані методи РНК інтерференції (RNAi, або технологія мовчазних генів *gene silencing*) та метод, відомий під назвою TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*). Метод RNAi належить до розділу типових трансгенних технологій. Метод TILLING — це різновид сучасного високотехнологічного мутагенезу, спрямованого на отримання мутацій специфічних генів та детекцію цілеспрямованих мутацій шляхом скринінгу індукованого SNP (*single nucleotide polymorphism*) поліморфізму. Зупинимось коротко на цих двох процедурах.

Метод RNAi з метою створення високоамілозної пшениці був уперше застосований у 2005 році співробітниками австралійської компанії CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) [23]. У результаті блокування активності обох *SBE IIa/b* генів автори отримали трансгенні рослини хлібопекарської пшениці, у яких вміст амілози в зерні було підвищено з 25 % до 70 % [24].

Ці оригінальні дослідження виконані шляхом створення ДНК конструкції, за допомогою якої індуковано експресію специфічної шпильки-РНК (*hp*-RNA). Конструкція створена шляхом клонування фрагмента кДНК генів пшениці *SBE IIa* та *SBE IIb*, що відповідає регіону між 1 і 3 ексонами цих генів з інвертованою послідовністю, яка розділяє інтрон 3. Ендосперм-специфічний промотор гена для субодиниці *Dx5* високомолекулярних глютенінів (зразок *GenBank* № X12928) був інтегрований з 5' кінця інвертованої ділянки. А термінальна ділянка гена, що кодує фермент опалін-синтазу, була інтегрована до 3' кінця (рис. 9).

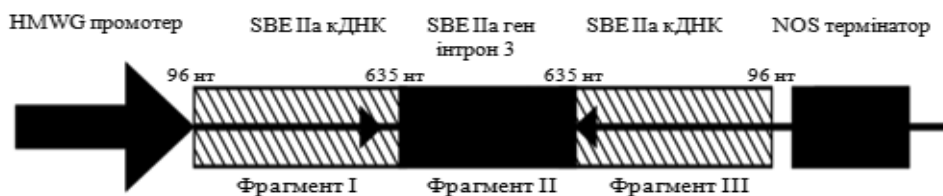


Рис. 9. RNAi конструкція *hp-SBE IIa* створена для трансгенної супресії ферментів гілкування амілопектину *SBE IIa* та *SBE IIb* [23]

Створена «промотор-інверсія / повтор-термінатор» конструкція була перенесена до бінарного трансформаційного вектора, похідного від векторів pSB11 та pSB1, і була використана для бактеріальної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Позитивні трансформаційні події фіксували за допомогою ПЛР та Southern blot гібридизації. В результаті отримано два типи трансгенних ліній *hp-SBE IIa* та *hp-SBE IIb*. Конструкція *hp-SBE IIa* блокувала експресію обох *SBE IIa* та *SBE IIb* ферментів, тоді як конструкція трансгенних ліній з супресією *SBE IIa/b* (А) та *SBE IIb* (Б). Перший пік — амілопектин, другий пік — амілоза [23].

Ендосперми Т2 рослин Т1 були досліджені за експресією *SBE IIa* та *SBE IIb* імуно-блот методом з антисироваткою, специфічною до цих білків. Аналіз показав ефект від часткового до повного блокування біосинтезу *SBE IIa* та *SBE IIb* у трансформованих рослин.

Склад крохмалю у зерні трансформованих ліній з RNAi-супресією *SBE IIa* та *SBE IIb* досліджено методом розподільної гель-хроматографії за розміром часток. У ліній з супресією *SBE IIb* вміст амілози в крохмалі зріс несуттєво, тоді як у ліній з супресією *SBE IIa/b* спостерігалось значне зростання вмісту амілози до 74 % (рис. 10).

Трансгенні лінії *hp-SBE IIa* та *hp-SBE IIb* відрізнялись також за морфологією крохмальних гранул (рис. 11).



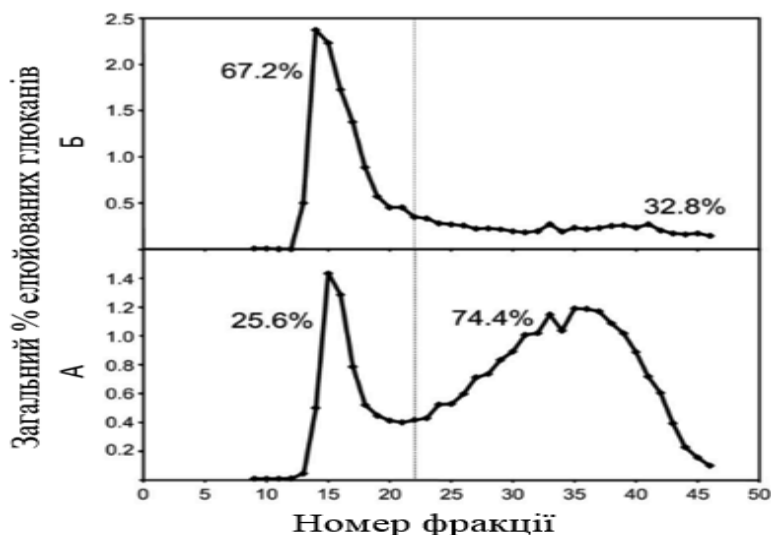


Рис. 10. Гель-хроматографія за розміром часток у CL2B сефарозі крохмалю зерна

Крохмальні гранули ліній *hp-SBE IIa* були надто нерегулярні за розміром, а великі гранули мали серповидну форму. В той же час крохмальні гранули ліній *hp-SBE IIb* за формою і розмірами практично не відрізнялися від гранул нетрансформованої пшениці.

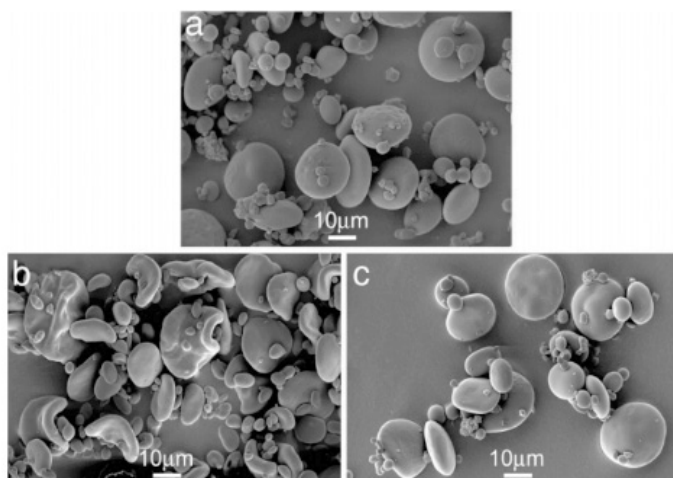


Рис. 11. Крохмальні гранули нетрансформованої пшениці (а) та трансгенних ліній *hp-SBE IIa* (b) та *hp-SBE IIb* (c) [23]

Зерно отриманих трансгенних ліній з високим вмістом амілози включили в раціон для годівлі лабораторних щурів. Результати досліджень наведені в таблиці 2.

**Високий вміст амілози в зерні пшениці, як наголошувалося раніше, тісно пов'язаний з вмістом резистентного до ферментів травлення крохмалю.** Як наслідок, він стимулює активність бактеріаль-

ної мікрофлори кишківника і синтез цінних для організму людини КЛЖК, особливо бутилової, що й підтверджено даними таблиці 2.

Таблиця 2

Вміст коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК)  
у товстому кишківнику лабораторних щурів [23]

Дієта	Концентрація КЛЖК, мкмоль/л			
	оцтова	пропіонова	бутилова	загальна
Звичайна пшениця	44	14	31	88
Високоамілозна пшениця	106	38	57	202

Виявлений у цьому унікальному дослідженні феномен блокування конструкцією *hp-SBE IIa* експресії обох ферментів гілкування амілопектину *SBE IIa* та *SBE IIb* і відповідне зростання вмісту амілози в крохмалі до 70 % і більше, а також факт блокування конструкцією *hp-SBE IIb* лише одного *SBE IIb* з несуттєвим підвищенням вмісту амілози, залишаються поки що без пояснення. **Разом з тим, отриманий генетичний матеріал з високим вмістом амілози в крохмалі слід вважати історичним етапом у біотехнології і селекції пшениці, спрямованим на радикальну генетичну зміну харчового статусу пшениці як одного з найважливіших продуктів, що вживає людина.**

Слідом за цитованою вище піонерською роботою вчених австралійського CSIRO подібні дослідження з використанням RNAi технології було виконано на культурі твердої пшениці в Італії в університеті Tuscia (Viterbo, Italy). Трансформації у цих дослідках здійснювалися як шляхом бактеріальної *Agrobacterium*-опосередкованої, так і біолістичної трансформації [25].

Процедура біолістичної трансформації здійснювалася з використанням 1954 недозрілих зародків твердої пшениці сорту Svevo. Зародки були ко-трансформовані за допомогою касети експресії *rRDPT+SBEIIa*(RNAi) і селективного маркера *bar*, інтегрованих у плазмід. У результаті було отримано 48 рослин T<sub>0</sub>, стійких до гербіциду білафос, що містили RNAi-касету з ефективністю ко-трансформації 2,5 %. Детекція трансгенів виконувалася за допомогою ПЛР аналізу геномної ДНК регенерованих рослин з використанням двох пар праймерів: один специфічний до промотора конструкції (*PromDx5Fw/PromDx5R*), а інший до *bar* гена (*BarFx/BarR*) та продуктів ампліфікації розміром 473пн і 405пн відповідно.

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація здійснювалася з використанням у досліді 1759 недозрілих зародків твердої пшениці сорту Ofanto та конструкції *rGUB-G+SBEIIa*(RNAi) у поєднанні з геном *bar*. У результаті було отримано 13 рослин T<sub>0</sub> з ефективністю трансформації 0,74 %. Детекція трансформованих рослин виконувалася у такий же спосіб, як і при біолістичній трансформації. Як у досліді з використанням біолістичної трансформації, так і *Agrobacterium*-опосередкованої транс-

формовані рослини за морфологічними ознаками не відрізнялися від нетрансформованих.

Відсутність *SBElIa* транскриптів досліджували напівкількісним аналізом ПЛР у реальному часі на загальній РНК екстрагованій з недозрілих зерен (18-й день після колосіння) рослин Т2 з використанням пари специфічних для *SBElIa* гена праймерів (*SBElIaFw/ SBElIaR*). Для подальших досліджень було взято три трансгенні лінії від біолістичної і три лінії від *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Повне блокування гена *SBElIa* спостерігали у чотирьох і часткове у двох ліній. У ліній, отриманих шляхом біолістичного бомбардування, дві мали часткове блокування *SBElIa* гена. У ліній, отриманих опосередкованою *Agrobacterium* трансформацією, спостерігали повне блокування *SBElIa*.

Значення вмісту амілози у крохмалі зерна отриманих трансгенних ліній варіювали від 30,8 до 75 %. Найвищий показник вмісту амілози в крохмалі спостерігали у лінії MJ16–112, яка за морфологічними ознаками та ознаками зерна і урожаєм зерна не відрізнялася від нетрансформованого контролю (рис. 12).

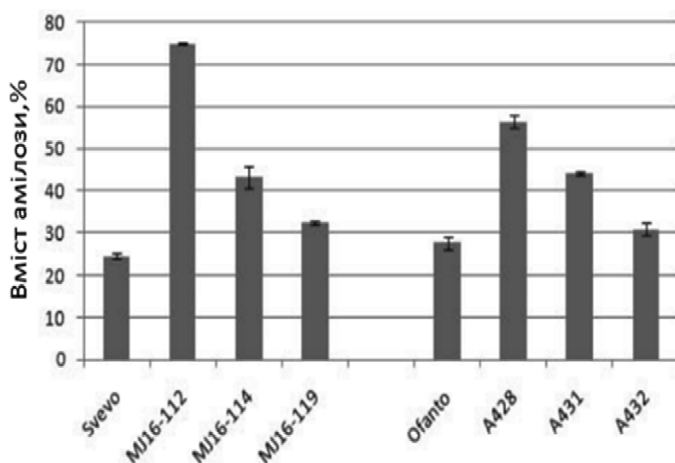


Рис. 12. Вміст амілози в крохмалі *SBElIa*/RNAi трансформованих ліній та сортів Svevo і Ofanto [25]

Електронно-мікроскопічне сканування крохмальних гранул трансгенних ліній твердої пшениці показало, що гранули типу А лінії MJ16–112 з найвищим вмістом амілози у порівнянні з гранулами контрольного сорту Svevo були значно менші за розмірами, а гранули типу В втратили сферичну форму (рис. 13).

Дослідження фізичних властивостей крохмалю трансгенної лінії MJ16–112 за допомогою швидкого віско-аналізатора (RVA) показало суттєві відмінності в поведінці крохмалю у порівнянні з нетрансформованим сортом за всіма показниками.

Автори цієї роботи провели цікаві спостереження взаємодії заблокованого *SBElIa* гена з іншими генами, що беруть участь у біосинтезі

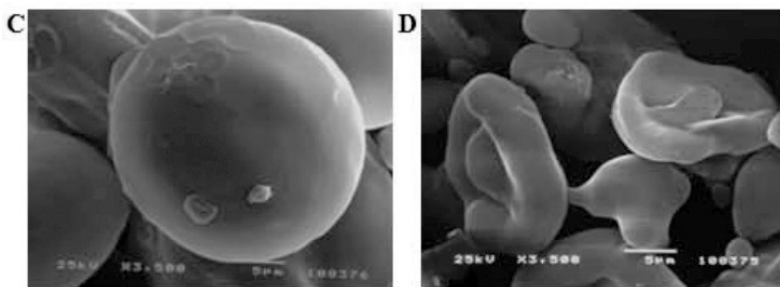


Рис. 13. Крохмальні гранули сорту Svevo (C) і трансгенної лінії (D) SBEIIa/RNAi MJ16–112 [25]

крохмалю *GBSSI*, *SSI*, *SSII*, *SSIII*, *SBEI*, *SBEIIb*, *ISA1* та *LD* за допомогою напівкількісного ПЛП аналізу у реальному часі. Особливо помітне було підвищення експресії гена *GBSSI*, яке сягало від 12 до 28 разів у порівнянні з контролем. Активність транскрипції генів *GBSSI*, *SSIII*, *LD* та *ISA1* у порівнянні з контрольним сортом була суттєво підвищеною, в той час як транскрипти генів *SSI*, *SSII*, *SBEI* та *SBEIIb* залишалися без значних змін.

Отримані результати цитованих вище унікальних праць показують, що трансгенні технології здатні радикально змінювати механізми біосинтезу крохмалю, спрямовуючи кількісний перерозподіл складових пшеничного крохмалю та його властивості у бажаному для експериментатора напрямі.

Другою сучасною нетрансгенною технологією молекулярної генетики, за допомогою якої вдалося суттєво вплинути на вміст амілози в крохмалі зерна пшениці, є метод TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Це сучасний високотехнологічний метод хімічного мутагенезу, який дозволяє цілеспрямовано здійснювати як індукцію, так і ідентифікацію нових мутацій у специфічних генах, отримувати мутації цільових генів у бажаному для експериментатора напрямі. TILLING — метод так званої реверсивної генетики, яка на відміну від класичної, досліджує фенотипові ефекти специфічних ДНК послідовностей, отриманих шляхом секвенування ДНК. Метод був вперше використаний у 2000 році на модельній рослині *Arabidopsis thaliana* і відтоді активно застосовується на різних культурах [26].

Суть методу TILLING полягає у тому, що в цільовому гені шляхом хімічного мутагенезу індукується поліморфізм окремих нуклеотидів — single nucleotide polymorphism (SNPs). Наприклад, під дією хімічного мутагену етилметансульфонату (EMS) відбувається алкілювання нуклеотидів, в результаті якого залишок гуаніну (G) трансформується в аденін (A), або залишок цитозину (C) трансформується в тимін (T), що призводить до так званих точкових або місенс (missense) мутацій. Отримані таким чином SNPs спричинюють появу в цільовому гені нових алелів, які ідентифікуються за допомогою ПЛП аналізу шляхом використання специфічних праймерів.

Метод TILLING уперше був запропонований Colbert et al. у 2001 році [27], а з метою підвищення вмісту амілози в крохмалі зерна пшениці цей метод уперше був застосований групою американських вчених у 2012 році [28]. Автори цієї роботи виконували дослідження одночасно на культурі твердої і м'якої пшениці. З метою оптимізації детекції мутацій гена *SBEIIa* ПЛР праймери були сконструйовані таким чином, щоб ампліфікація ділянки цього гена відбувалася одночасно в трьох А, В і D геномах між ексонами 11 і 12 і ексонами 14 і 15. Ділянка, що містить екзони 12 і 14 із 22 екзонів *SBEIIa* гена, був обраний для TILLING тому, що він містить позиції 8 нуклеотидів, які під дією EMS високою імовірністю можуть мутувати у stop-кодон та блокувати таким чином експресію *SBEIIa* гена і відповідно гілкування амілопектину. В отриманій популяції мутантних генотипів твердої і м'якої пшениці були ідентифіковані лінії зі stop-мутаціями у послідовності гена *SBEIIa*. Як показав кількісний ПЛР аналіз кДНК, експресія гена *SBEIIa* в ендоспермі у stop-мутацій була знижена від 6 до 12 разів у порівнянні з вихідними зразками пшениці. Відповідно спостерігали підвищення вмісту амілози в ендоспермі з цікавою закономірністю. Підвищення вмісту амілози в зерні незначною мірою спостерігалось лише у подвійних stop-мутацій сполученням з різних геномів А, В і D (рис. 14).

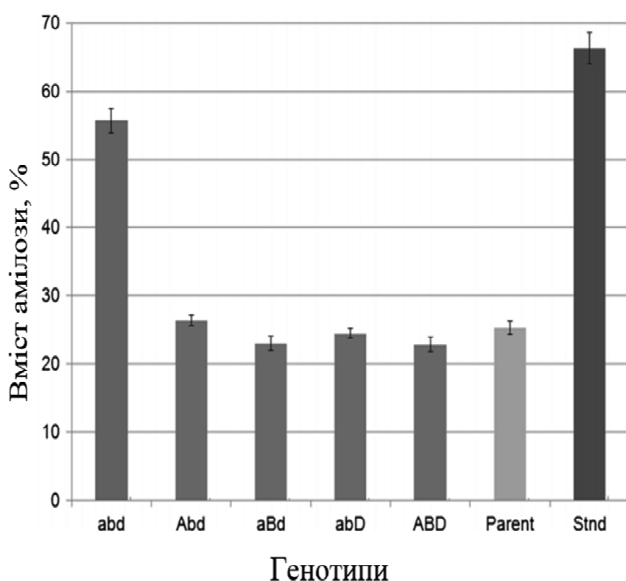


Рис. 14. Вміст амілози в зерні ліній м'якої пшениці з подвійною (Abd, aBd, abD) і потрійною (abd) stop-мутацією у послідовності гена *SBEIIa*. Stnd — високоамілозна кукурудза (66 %)

І лише у ліній м'якої пшениці з потрійною stop-мутацією гена *SBEIIa* в різних геномах А, В і D спостерігалось суттєве підвищення вмісту амілози (55 %). Аналогічний генотип твердої пшениці містив амілози 45 %. Відповідно вміст резистентного крохмалю у зерні генотипів з потрійною

stop-мутацією м'якої пшениці зріс від вихідного 0,83 до 11,22 %, а у твердої пшениці ці величини становили відповідно 1,58 і 6,21 %.

На жаль, слід констатувати, що дослідження з підвищення вмісту амілози в зерні пшениці подібні до тих, що наведені у цій статті, до сих пір не виконуються в жодній науковій лабораторії України.

У Селекційно-генетичному інституті доктором біологічних наук, професором, академіком НААН Ю. М. Сиволапом та доктором біологічних наук О. І. Рибалкою були ініційовані дослідження щодо оптимізації методів прогнозування та контролю вмісту амілози у крохмалі селекційного матеріалу пшениці української селекції [30].

На жаль, масштабної селекційної роботи розгорнуто не було. Складність полягала в тому, що лінії пшениці з високим вмістом амілози є високотехнологічними і доступ до їх використання в іноземних програмах селекції є суворо обмеженим. Однак нам пощастило отримати від авторів цитованого вище дослідження з Італії (проф. Д. Лафіандра) лінію *SBEIIa/RNAi* ярої твердої пшениці MJ16–112 сорту Svevo з вмістом амілози до 75 %. Цей матеріал, як вихідне джерело високого вмісту амілози, ми використали в міжвидових схрещуваннях з метою підвищення вмісту амілози і резистентного крохмалю в зерні м'якої хлібопекарської пшениці. Схрещування виконано в 2014 році і отримано достатню кількість зерен  $F_1$  від схрещування лінії MJ16–112 з сортом озимої пшениці Куяльник. Ці дослідження започатковують в Україні нову програму зі створення сортів м'якої хлібопекарської і твердої пшениці з підвищеним вмістом у зерні амілози і резистентного крохмалю.

**Висновки.** Як видно з наведених вище результатів досліджень, вміст амілози в зерні пшениці і, відповідно, вміст критично важливого для здорового харчування людини резистентного крохмалю можна суттєво підвищити шляхом використання сучасних високотехнологічних методів генної інженерії. Для створення високоамілозної пшениці у світовій практиці використовуються методи звичайної мутаційної селекції [29], метод сучасного високотехнологічного мутагенезу TILLING та метод РНК інтерференції RNAi, який є, очевидно, найбільш результативним. **Створення високоамілозної пшениці є докорінно новим словом у сучасній селекції цієї важливої продовольчої культури, є реальним шляхом радикального поліпшення харчової цінності зерна пшениці та продуктів її переробки.**

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Colonna P. A. New insights on starch structure and properties. In: Cereal chemistry and technology: a long past and a bright future / P. Colonna, A. Buléon // Proceedings of the 9th international cereal and bread congress. — Institut de Recherche Technologique Agroalimentaire des Céréales (IRTAC). — Paris, France. — 1992. — P. 25–42.
2. Buléon A. Starch granules: structure and biosynthesis / A. Buléon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball // Int. Journal Biol. Macromol. — 1998. — Vol. 23. — P. 85–112.

3. Liu Q. Understanding starches and their role in foods / Q. Liu // In Food carbohydrates: Chemistry, physical properties and applications (ed. S. W. Cui). — CRC Press, Boca Raton, USA. — 2005. — P. 309–355.
4. Manners D. J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure / D. J. Manners // Carbohydrate Polymorphism. — 1989. — Vol. 11. — P. 87–112.
5. Wei C. Physicochemical properties and development of wheat large and small starch granules during endosperm development / C. Wei, J. Zhang, Y. Chen, W. Zhou, B. Xu, Y. Wang // Acta Physiol. Plant. — 2010. — Vol. 32. — P. 905–916.
6. Butardo Jr V. M. Biomolecular analyses of starch and starch granule proteins in the high-amylose rice mutant goami 2 / Jr V. M. Butardo, V. D. Daygon, M. L. Colgrave, P. M. Campbell, A. Resurreccion, R. P. Cuevas // Journal of Agriculture Food Chemistry. — 2012. — Vol. 60. — P. 11576–11585.
7. Mária Hódsági. Recent results of investigations of resistant starches. — Ph.D. thesis / Hódsági Mária. — Budapest, 2011. — 108 p.
8. Englyst H. N. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions / H. N. Englyst, S. M. Kingman, J. H. Cummings // European Journal of Clinical Nutrition. — 1992. — Vol. 46(2). — P. 33–50.
9. Englyst H. N. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates / H. N. Englyst, H. S. Wiggins, J. H. Cummings // Analyst. — 1982. — Vol. 107. — P. 307–318.
10. Faraj A. The effect of extrusion cooking on resistant starch formation in waxy and regular barley flours / A. Faraj, T. Vasanthan, R. Hoover // Food Research International. — 2004. — Vol. 37. — P. 517–525.
11. Nugent A. P. Health properties of resistant starch / A. P. Nugent // Nutrition Bulletin. — 2005. — Vol. 30. — P. 27–54.
12. Sajilata M. G. Resistant starch — A review / M. G. Sajilata, R. S. Singhal, P. R. Kulkarni // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. — 2006. — Vol. 5. — P. 1–17.
13. Singh J. Starch digestibility in food matrix: a review / J. Singh, A. Dartois, L. Kaur // Trends in Food Science & Technology. — 2010. — Vol. 21(4). — P. 168–180.
14. Gelencsér T. Comparative study of resistant starches and investigations of their application in starch-based products (bread and pasta). — PhD Thesis / Gelencsér T. — Department of Applied Biotechnology and Food Science. — Budapest University of Technology and Economics. — 2009. — Budapest, Hungary.
15. Mentschel J. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to stem cell compartment / J. Mentschel, R. Claus // Metabolism. — 2003. — Vol. 52(11). — P. 1400–1405.
16. Rahman S. Genetic control of wheat starch biosynthesis Frontiers of Wheat Bioscience: Memorial Issue / S. Rahman, Z. Regina, B. Kosar-Hashemi, S. McMaugh, C. Konik-Rose, M. Morell // Wheat Information Service. — 2010. — № 100. — P. 77–87.
17. Vrinten P. L. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues / P. L. Vrinten, T. Nakamura // Plant Physiology. — 2000. — Vol. 122. — P. 255–263.

18. Commuri P. D. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties / P. D. Commuri, P. L. Keeling // *Plant Journal*. — 2001. — Vol. 25. — P. 475–486.
19. Yamamori M. Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose / M. Yamamori, S. Fujita, K. Hayakawa, J. Matsuki // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — Vol. 101. — P. 21–29.
20. Li Z. The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase HI gene family / Z. Li, G. Mouille, B. Kosar-Hashemi, S. Rahman, B. Clarke, K. R. Gale, R. Appels, M. X. Morell // *Plant Physiol.* — 2000. — Vol. 123. — P. 613–624.
21. Regina A. Multiple isoforms of starch branching enzyme I in wheat: lack of the major SBE-I isoform does not alter starch phenotype / A. Regina, B. Kosar-Hashemi, Z. Li, L. Rampling, M. Cmiel, C. Gianibelli, C. Konik-Rose, O. Larroque, S. Rahman, M. K. Morell // *Fund Plant Biol.* — 2004. — Vol. 31. — P. 591–601.
22. Lafiandra D. Improving wheat health benefits through manipulation of starch composition / D. Lafiandra, F. Sestili, E. Botticella, A. Phillips // 19<sup>th</sup> Eucarpia General Congress. — Budapest, Hungary. — 2012. — P. 1–4.
23. Regina A. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats / A. Regina, A. Bird, D. Topping, S. Bowden, J. Freeman, T. Barsby, B. Kosar-Hashemi, Z. Li, S. Rahman, M. K. Morell // *Proc. Natl. Acad. Sci. — U. S. A.* — 2006. — Vol. 103. — P. 3546–3551.
24. Filmer M. New wheat promises dual benefits / M. Filmer // *Farming Ahead*. — 2006. — № 174. — P. 50–51.
25. Sestili F. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes / F. Sestili, M. Janni, A. Doherty, E. Botticella, R. D'Ovidio, S. Masci, H. Jones, D. Lafiandra // *Plant Biology*. — 2010. — Vol. 10. — № 144. — P. 2–12.
26. McCallum C. Targeted screening for induced mutations / C. McCallum, L. Comai, E. Greene, S. Henikoff // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 18. — No 4. — P. 455–457.
27. Colbert T. High-throughput screening for induced point mutations / T. Colbert, B. Till, R. Tompa, S. Reynolds, M. Steine, A. Yeung, C. McCallum, L. Comai, S. Henikoff // *Plant Physiol.* — 2001. — Vol. 126. — P. 480–484.
28. Slade A. Development of high amylose wheat through TILLING / A. Slade, C. McGuire, D. Loeffler, J. Mullenberg, W. Skinner, G. Fazio, A. Holm, K. Brandt, M. Steine, J. Goodstal, V. Knauf // *BMC Plant Biology*. — 2012. — Vol. 12. — P. 69–85.
29. Hogg A. Creation of a high-amylose durum wheat through mutagenesis of starch synthase II (*SSIIa*) / A. Hogg, K. Gause, P. Hofer, J. Martin, R. Graybosch, L. Hansen, M. Giroux // *Journ. of Cereal Science*. — 2013. — Vol. 57. — P. 377–383.
30. Петрова І. В. Оптимізація спектрометричного визначення вмісту амілози в зерновому крохмалі селекційного матеріалу пшениці / І. В. Петрова, О. М. Хохлов, С. В. Чеботар, О. І. Рибалка, Ю. М. Сиволап // *Фізіологія та біохімія культурних рослин*. — 2008. — Т. 40. — № 3(233). — С. 223–230.

Надійшла 17.06.2015.



UDK 633.16:631.527

**Rybalka O. I., Shcherbyna Z. V.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **HIGH-AMYLOSE WHEAT — A NEW WORD IN THE WHEAT BREEDING**

Wheat starch is an important source of energy in human nutrition. Starch with elevated level of amylose is of interest due to correlation between higher amylose content and increased level of resistant starch that have evidenced positive effects on human health for combating obesity and diabetes. A review of genetic approaches to elevate amylose content in wheat grain such as RNAi and TILLING are presented in the paper. The RNAi is the most efficient method allows increase the amylose content in wheat up to 70 %. The amylose up regulation is a drastic way of wheat nutritional quality amelioration.

УДК 633.16:631.527

**Рыбалка А. И., Щербина З. В.**

### **ПШЕНИЦА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ АМИЛОЗЫ — НОВОЕ СЛОВО В СЕЛЕКЦИИ КУЛЬТУРЫ**

Пшеничный крахмал является важным источником энергии в питании человека. Крахмал с высоким содержанием амилозы представляет особый интерес для исследований, поскольку существует высокая корреляционная зависимость между содержанием амилозы и резистентного крахмала, который оказывает позитивный эффект на здоровье человека, снижает риск ожирения и диабета. Представлены характеристики генетических методов RNAi и TILLING, использование которых позволяет существенно повысить содержание амилозы в зерне. Наиболее эффективным является метод RNAi, применение которого дает возможность повысить содержание амилозы до 70 % и более. Увеличение содержания амилозы в зерне пшеницы является радикальным путем повышения пищевой ценности пшеницы.

**ПОРТРЕТИ****ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ СИВОЛАП:  
ЛЮДИНА, НАУКОВЕЦЬ, ВЧИТЕЛЬ**

У 2014 році наукова спільнота зазнала значної втрати — після тяжкої хвороби пішов із життя Юрій Михайлович Сиволап, видатний вчений і організатор науки, навколо якого впродовж багатьох років гуртувалися біотехнологи-рослинники України.

Народився Юрій Михайлович 18 листопада 1939 р. в м. Дніпропетровськ у родині державного службовця. В 1944 р. батько був направлений на роботу до Одеси. Отож з 1946 р. Юрій вчиться в школі, а в 1956–1961 рр. — в Одеському сільськогосподарському інституті на агрономічному факультеті. На жаль, генетику в той період відносили до категорії «буржуазних псевдонаук», тому пробіл у знаннях генетики до-

велось заповнювати пізніше, як згадував Юрій Михайлович. Після закінчення інституту Ю. М. Сиволап кілька років працював агрономом в елітно-насінницькому господарстві у Котовському районі Одещини.

Шлях у науку розпочався з навчання в аспірантурі (1963–1966 рр.) у Всесоюзному селекційно-генетичному інституті (ВСГІ, м. Одеса). Через кілька років тут була захищена дисертація й отримано науковий ступінь кандидата сільськогосподарських наук. Саме в аспірантурі молодий науковець пересвідчився, що вирішення багатьох проблем у створенні сортів сільськогосподарських рослин пов'язано з аналізом специфічності та мінливості їхньої ДНК.

Усвідомлюючи важливість цього напрямку, молодий вчений пройшов стажування в Московському державному університеті ім. М. В. Ломоносова у відділі академіка А. Н. Білозерського, Всесоюзному інституті рослинництва ім. М. І. Вавилова в лабораторії професора В. Г. Конарева, а також у 1969–1970 рр. у Каліфорнійському технологічному інституті (США) в лабораторії професора Джеймса Боннера (James Frederick Bonner), відомого молекулярного біолога.

У 1971 р., після повернення до ВСГІ, Ю. М. Сиволап створив та очолив одну з перших в країні лабораторію молекулярної біології. За його актив-

ної участі було споруджено спеціалізований корпус, для якого придбане за кордоном новітнє устаткування. З самого початку дослідження спрямовувались на вивчення організації ДНК різних видів і сортів рослин, а також виявлення впливу екзогенної ДНК на рослини. Це, по суті, була «прелюдія» робіт з генетичної трансформації рослин, чи не перші в СРСР дослідження геному сільськогосподарських рослин на молекулярному рівні.

Через кілька років за рівнем обладнання та кваліфікації наукових працівників, а також за першими здобутками лабораторія стала широко відомим науковим підрозділом: тут було розроблено основні методи виділення й аналізу хроматину та високополімерних сполук із тканин злакових рослин, досліджували молекулярну організацію геномів, вивчали вплив екзогенної ДНК на спадковість рослин тощо. Оригінальність цих робіт привернула увагу закордонних колег: у 1974 р. Ю. М. Сиволап був запрошений до участі у Міжнародному комітеті з дослідження перспектив селекції рослин, відвідав багато відомих наукових центрів США, Європи, Азії.

Саме за ініціативою Ю. М. Сиволапа та колег-однодумців розпочалась розробка Всесоюзної програми «Геном рослин» з метою подолання відставання від розвинених країн та об'єднання наукового потенціалу для розвитку молекулярної біології і генетики рослин. У рамках програми відбувалися конференції в Києві, Одесі, Чернівцях, Уфі, Тбілісі, а також діяла школа з молекулярної біології рослин у Чернівцях.

Особливу, хвилюючу турботу про розвиток науки виявив Юрій Михайлович після здобуття Україною незалежності. Він прагнув прискорити і поглибити молекулярно-генетичні та біотехнологічні дослідження, підняти їх до світового рівня. Саме заради цього, за підтримки керівництва Національної академії аграрних наук України, він добився створення на базі двох наукових відділів Селекційно-генетичного інституту Південного біотехнологічного центру в рослинництві. Дванадцять років Ю. М. Сиволап керував ним, підтримував і розвивав біотехнологічні дослідження в рослинництві на високому науковому та методичному рівні, був визнаним лідером у цій галузі науки в Україні.

Дослідження геному сільськогосподарських рослин червоною лінією пройшли крізь все життя вченого, здійснювалися в межах Програми наукових досліджень Національної академії аграрних наук «Сільськогосподарська біотехнологія», незмінним керівником якої був Ю. М. Сиволап.

Наукові здобутки вченого забезпечили йому заслужене визнання: у 1987 р. він отримав науковий ступінь доктора біологічних наук, через два роки — вчене звання професора. У 1995 р. він став членом-кореспондентом, а в 2000 р. — дійсним членом Української академії аграрних наук.

Юрій Михайлович був відкритий до усього нового в науці, активно пропагував новітні методи і активно впроваджував їх у селекцію. Саме за його ініціативи в країні почалось освоєння багатообіцяючого методу —

полімеразної ланцюгової реакції, а молекулярна генетика стала реальним учасником селекційних програм зі створення сортів і гібридів різноманітних сільськогосподарських рослин.

Участь академіка Ю. М. Сиволапа в роботі міжнародних конгресів, конференцій, симпозіумів неодноразово засвідчувала його високий авторитет у світовій науковій спільноті. Останніми роками за керівництва Юрія Михайловича були проведені пріоритетні дослідження генетичного поліморфізму багатьох видів культивованих рослин: пшениці, ячменю, рису, сорго, сої, винограду, хмелю, ліній та гібридів кукурудзи, соняшнику, здійснено маркування генів агрономічно важливих ознак, розроблено принципову схему реєстрації цінних генотипів у вигляді ідентифікаційних формул. Піонерами впровадження цих розробок були вчені Селекційно-генетичного інституту: саме тут з використанням молекулярних маркерів створено перші в країні гібриди кукурудзи.

Ю. М. Сиволап обирався віце-президентом Українського товариства генетиків і селекціонерів імені М. І. Вавилова, був членом ради директорів Біотехнологічної асоціації країн Чорноморського регіону, членом Міжвідомчої ради з питань біотехнології Міністерства освіти і науки України, членом редакційних колегій багатьох фахових журналів, членом експертних та спеціалізованих вчених рад.

Багато років Ю. М. Сиволап співпрацював з Одеським бюро судово-медичної експертизи, започаткувавши в Південному регіоні України новітні методи ДНК-дактилоскопії. Тривалий час він викладав на кафедрі генетики і молекулярної біології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Наукові здобутки вченого знайшли втілення у ряді монографій, понад 500 наукових публікаціях, методичних рекомендаціях, науково-методичних посібниках, патентах, державних стандартах.

У 2009 р. академіку Ю. М. Сиволапу присвоєно звання «Заслужений діяч науки і техніки України».



Ю. М. Сиволап з колегами

Але чи не найбільшим надбанням Ю. М. Сиволапа стало створення школи молекулярних біологів, відкриття шляхів до наукової роботи багатьом талановитим дослідникам. Під його керівництвом виконано та захищено 5 докторських і 17 кандидатських дисертацій. Нині його учні трудяться у науково-до-

слідних та навчальних установах Одеси, інших міст України, в Німеччині, США, Канаді, Казахстані.

Юрій Михайлович був сильною, принциповою особистістю, всього себе віддавав служінню науці, яка стала його життям. Він завжди знаходив добрі слова для відзначення успіхів своїх колег, учнів, міг і суворо критикувати їх за неправильні рішення або неприпустиму поведінку, але завжди приходив на допомогу, якщо це було потрібно.

Він був життєрадісним і відвертим. Захоплювався рибалкою, був пристрасним автолюбителем, щиро «відпочивав» за настільним тенісом. І співрозмовник він був цікавий — з почуттям гумору, з одеськими жартами.

До останніх днів Юрій Михайлович Сиволап працював на посаді завідувача відділу геноміки і біотехнології Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннізнавства та сортовивчення, реалізуючи своє покликання у пізнанні світу рослин, пошуку шляхів їхнього удосконалення для потреб людства.

При написанні статті використано матеріали статей Ю. М. Сиволапа «О себе» (Видные ученые Одессы. По воспоминаниям учеников и сотрудников. Вып. 9. — Одесса: Астропринт, 2002. — С. 77–83) і «ДНК-технології сільгоспрослин в Україні: початок шляху» (Вісник аграрної науки); спеціального збірника «Селекційно–генетичному інституту — Національному центру насіннізнавства та сортовивчення — 100». — 2012. — С. 99–105).

*Н. Е. Волкова,  
головний науковий співробітник  
відділу загальної та молекулярної  
генетики СГІ–НЦНС*

**Вимоги до оформлення статей  
до «Збірника наукових праць Селекційно-генетичного  
інституту — Національного центру насіннезнавства  
та сортовивчення»**

1. Статті до «Збірника...» подаються у 2-х примірниках та в електронній версії (Word) українською або російською, або англійською мовами. До статей українською чи російською мовами додається переклад тексту (з відповідними складовими — анотація, резюме тощо) англійською для розміщення на веб-сайті інституту.

Обсяг статті — до 12 друкарських сторінок.

2. Форма подання: формат А-4; шрифт Arial, розмір 12, інтервал 1,5. Поля: верхнє, нижнє, лівє, правє — 2,0 см.

3. Порядок розташування елементів оформлення сторінки, згори до низу:

- 2 інтервали;
  - УДК (великими літерами);
  - 1 інтервал;
  - прізвище, ініціали автора (авторів) (великими літерами), його (їх-ній) науковий ступінь, вчене звання, академічне звання, посада (скорочено); електронна адреса;
  - назва установи;
  - 1 інтервал;
  - назва статті (великими літерами, жирним шрифтом);
  - 1 інтервал;
  - анотація мовою написання статті (курсив);
  - 1 інтервал;
  - ключові слова (курсив);
  - 1 інтервал;
  - текст статті;
  - 2 інтервали;
- список літератури в порядку цитування за стандартом наведення бібліографічних даних;
- резюме українською, англійською, російською мовами після бібліографії з коротким викладом результатів досліджень.

4. Стаття містить вступ, опис матеріалів та методів досліджень, обговорення результатів, висновки.

5. Таблиці та рисунки мають бути пронумеровані і вмонтовані в текст з обов'язковим посиланням на них. Підписи до рисунків друкуються під ними, до таблиць — над ними.

6. Літературні джерела подаються в тексті в порядку посилання на них цифрами у квадратних дужках.

7. До матеріалів додається довідка про автора (авторів) із зазначенням місця роботи, посади, наукового ступеня, вченого звання, номерів телефону, факсу, електронної пошти.

8. До статті додаються рекомендація вченої ради установи, де працює автор, та рецензія на статтю від фахівця у даній галузі.

9. Статті, які не відповідатимуть означеним вимогам, прийматись не будуть.

Друкується за рішенням вченої ради  
Селекційно-генетичного інституту —  
Національного центру  
насіннезнавства та сортовивчення  
(протокол № 10 від 18.12.2015 р.)

Збірник внесено до переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук з галузей сільськогосподарських (генетика, селекція рослин, насінництво) та біологічних (генетика) наук.

Постанова президії ВАК України від 16 грудня 2009 р. № 1–05/6

Свідоцтво про державну реєстрацію  
друкованого засобу масової інформації  
Серія KB № 9531 від 18.01.2005 року

Відповідальні за випуск: *В. Я. Крижанівський, М. Г. Музикант*

Тираж 100 прим. Зам. № 848 (183).

Адреса редакції:

Селекційно-генетичний інститут —  
Національний центр насіннезнавства та сортовивчення,  
65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3.  
Тел. (048) 789-54-01, факс (048) 789-52-89  
e-mail: [sgi-uaan@ukr.net](mailto:sgi-uaan@ukr.net), [www.sgi.in.ua](http://www.sgi.in.ua)

Друкарня видавництва «Астропринт»  
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21  
Тел.: (0482) 37-07-95, 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855  
[astro\\_print@ukr.net](mailto:astro_print@ukr.net)  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.