

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Попов Віталій Миколайович

УДК 633.854.78:631.527:575

**Використання молекулярно-генетичних маркерів в генетико-селекційних дослідженнях
соняшнику**

03.00.15 – генетика

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2002

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН, м. Харків

Науковий керівник:

кандидат біологічних наук,

Кириченко Віктор Васильович,

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН, завідувач відділом олійних культур, директор інституту

Офіційні опоненти:

Доктор біологічних наук **Парій Федір Микитович**, Інститут цукрових буряків УААН, провідний науковий співробітник лабораторії селекції цукрових буряків

Кандидат біологічних наук **Солоденко Анжелла Євгенівна**, Південний біотехнологічний центр в рослинництві, старший науковий співробітник

Провідна установа:

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, м.Київ

Захист відбудеться 23.04.2002 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного 148

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного 148

Автореферат розісланий 22.03.2002 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук
Науменко В.Д.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В Україні соняшник у структурі посівних площ посідає одне з перших місць серед олійних культур. Харчова цінність насіння і олії пов'язана не лише із жирнокислотним складом, а й з наявністю вітамінів, пігментів, природних інгібіторів окислення. У зв'язку з цим в селекції соняшнику з'явилися нові напрямки, що потребують всебічного вивчення біології цієї культури.

Значні успіхи в селекції гетерозисних гібридів соняшнику, насамперед, пов'язані з використанням стійких до основних патогенів, несприятливих умов середовища інбредних ліній. Нині процес створення ліній займає 8-12 років. Це пов'язане з тим, що добір йде за комплексом полігенних ознак, що зазнають значної модифікаційної мінливості. Це ускладнює добір потрібних генотипів, а також вихідних форм для схрещування. Одним з шляхів прискорення селекційного процесу є використання молекулярно-генетичних маркерів.

Використання ізоферментних систем в генетико-селекційних програмах дозволить вивчати мінливість вихідного матеріалу, здійснювати добір вихідних форм для схрещування, оцінювати генетичну чистоту вихідного матеріалу і встановлювати рівень гібридності гібридів, занесених до "Реєстру рослин України", а також проводити маркування важливих господарсько-цінних ознак. Останнім часом у світі широко використовуються ДНК-маркери, зокрема RAPD-маркери. Вивчення генетично детермінованого поліморфізму RAPD-локусів у багатьох культур дозволило виявити високий рівень поліморфізму, маркувати цінні агрономічні ознаки, сконструювати генетичні карти, класифікувати колекції. Використання аналогічного типу маркерів у соняшнику могло б підвищити результативність селекційного процесу. Однак відомості про генетично детермінований поліморфізм ферментних локусів і RAPD-локусів в інбредних лініях соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва відсутні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва протягом 1997-2000 р. в рамках завдання "Створити і передати до державного сорто випробування високопродуктивні міжлінійні гібриди соняшнику різних груп стиглості, стійкості до основних хвороб, з урожайністю насіння 35-42 ц/га, олійністю 52-54%, збором олії 16-18 ц/га, технологічних в переробці, з високим виходом олії" (номер державної реєстрації 019U012413).

Мета і завдання досліджень. Основною метою роботи було з'ясування рівня поліморфізму ізоферментних систем та їх генетичного контролю, з'ясування рівня поліморфізму RAPD-локусів і можливості використання молекулярно-генетичних маркерів в генетико-селекційних дослідженнях соняшнику. У зв'язку з цим були поставлені завдання:

1. З'ясувати внутрішньовидову мінливість ізоферментних систем і можливості їх використання в селекції і генетиці соняшнику.
2. З'ясувати характер спадкування і генетичного контролю таких ізоферментних систем: анодна естераза, катодна естераза, катодна кисла фосфатаза і НАД-залежна

- малатдегідрогеназа.
3. Визначити залежність між генетичним різноманіттям вихідного матеріалу за ізоферментами та господарсько-важливими ознаками.
 4. Оцінити генетичне різноманіття вихідного матеріалу за RAPD-локусами.
- Об'єкт досліджень* - інбредні лінії соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. Вибір об'єкта дослідження зумовлений їх селекційною і комерційною цінністю.

Предмет досліджень - ізоферментні системи, а також RAPD-локуси, що виявляли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Методи досліджень. У роботі використані сучасні біохімічні та молекулярно-генетичні методи. Генетично детермінований поліморфізм ферментів і ДНК вивчали відповідно за допомогою методу електрофорезу в поліакриламідному гелі і ПЛР з довільними праймерами. Для розподілу продуктів ампліфікації використовували метод електрофорезу в агарозному гелі.

Наукова новизна роботи. Вперше в світовій практиці вивчено генетичний контроль катодної естерази і катодної кислої фосфатази. Детально вивчений генетичний контроль генів насінневої анодної естерази і НАД-залежної малатдегідрогенази за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Показано, що анодна естераза контролюється генами *Est1*, *Est2*, *Est3* і *Est4*; катодна естераза – геном *cEst5*; катодна кисла фосфатаза – геном *sAcp1*; малатдегідрогеназа – генами *Mdh1*, *Mdh2*, *Mdh3*. Встановлено генетичний контроль генів анодної й катодної естерази в листках. Показано, що в насінні й листках експресуються різні гени. У листках спостерігається експресія таких генів: *Est2*, *cEst5* і *cEst6*, а в насінні – *Est1*, *Est2*, *Est3*, *Est4* і *cEst5*. Виявлено дві групи зчеплення між вивченими генами.

Вперше в Україні вивчений міжлінійний поліморфізм, проведено біохімічну паспортизацію, класифікацію інбредних ліній соняшнику харківської селекції і встановлено рівень гібридності простих гібридів соняшнику за допомогою ізоферментних систем. Показана також можливість використання ізоферментних маркерів для прогнозування ефекту гетерозису у соняшнику.

Вивчено молекулярно-генетичний поліморфізм інбредних ліній соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва з використанням RAPD-аналізу, а також отримано їх розподілення за ступенем генетичної віддаленості.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть бути використані у дослідженнях спряженої мінливості алельних варіантів ферментних локусів і господарсько-цінних ознак, визначення груп зчеплення, вірогідності й чистоти інбредних ліній, при ресстрації рослинних ресурсів, а також для встановлення рівня гібридності міжлінійних гібридів.

Дані стосовно RAPD-локусів можуть бути використані для побудови детальної генетичної карти соняшнику, виявлення зчеплення з вивченими ферментними локусами, а також для маркування важливих агрономічних ознак.

Особистий внесок здобувача. Основні результати досліджень, представлені у дисертації, отримані автором самостійно у відділі якості зерна Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН. Полімеразна ланцюгова реакція була проведена в лабораторії молекулярної генетики Інституту генетики і цитології НАН Білорусі (м. Мінськ).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації були представлені на міжнародній конференції “Наукові основи стабілізації виробництва продукції рослинництва” (Харків, 1999); на конференції молодих вчених “Проблеми фізіології рослин і генетики на рубежі третього тисячоліття” (Київ, 2000); на 5-й Пуцинській конференції молодих вчених “Биология – наука 21-го века” (Пушино, 2001); на

міжнародній конференції молодих вчених “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений” (Харьков, 2001) та міжнародній конференції “Genetic collection, isogenic and alloplasmic lines” (Novosibirsk, 2001).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи були викладені в 6 статтях і 5 тезах доповідей.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, п'яти розділів, висновків, та списку використаної літератури.

Робота викладена на 143 сторінках машинописного тексту, вміщує 31 рисуноків та 16 таблиць. Список використаних літературних джерел містить 215 назв, з них 121 іноземні.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень були інбредні лінії соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва.

По кожній лінії аналізували не менш 30 сім'янок. Лінії, які були залучені в схрещування, також перевіряли на однорідність. По кожній лінії вивчалось по 100 сім'янок.

Для вивчення генетичного контролю ізоферментів анодної естерази, катодної естерази, катодної кислої фосфатази і НАД-залежної малатдегідрогенази в сухому насінні використовували такі популяції F₂: Сх2552хХ982 (схрещування 1), Сх2552хХ854 (схрещування 2) і Сх2552хХ790 (схрещування 3). Генетичний контроль листової анодної естерази і катодної естерази вивчали у популяції F₂ від схрещування двох інбредних ліній Сх2552 і Х982. По кожній гібридній комбінації було проаналізовано таку кількість насінин: схрещування 1 – 96, схрещування 2- 33, схрещування 3 – 107 та 160 рослин F₂ для встановлення генетичного контролю листової анодної та катодної естерази.

Для встановлення рівня гібридності було взято 6 простих гібридів соняшнику, які були надані дослідними господарствами. По кожному гібриду аналізували не менш 100 насінин.

Для вивчення мінливості досліджували колекцію з 46 інбредних ліній. 79 інбредних ліній селекції Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва використовували для їх класифікації й вивчення генетичних зв'язків між ними.

Екстракцію ферментів проводили з окремих насінин і свіжої рослинної (листової) тканини 0,02 М Трис-НСІ буфером (рН 7,5), що містив 0,01 мМ РVP, 0,006 мМ ЕДТА, 0,1 мМ DTT і 20% сахарозу при охолодженні протягом 1 год. Екстракти ферментів одразу ж використовували для електрофорезу.

Для розділення ізоферментів ізоцитратдегідрогенази, алкогольдегідрогенази і малатдегідрогенази (НАДФ) використовували Трис-гліцинову буферну систему – 0,009 М Трис; 0,06 М гліцину (рН 8,9).

Для електрофорезу анодної естерази, малатдегідрогенази (НАД), б-фосфоглюконатдегідрогенази, лейцинамінопептидази, аспаратамінотрансферази використовували Трис-ЕДТА-боратну буферну систему - 0,09 М Трис; 0,09 М НЗВО₃; 0,0031 М ЕДТА (рН 8,3). Розділяючий гель містив 7% акриламід і 0,37% метиленбісакріламід.

Для розподілу ізоферментів катодної естерази і катодної кислої фосфатази використовували алюміній-лактат буферну систему - 0,035 М алюміній-лактата. Концентруючий гель містив 5% акриламід та 0,5% метиленбісакріламід, а розділяючий 7% і 0,34% відповідно.

Гістохімічне забарвлення гелів проводили за Шоу і Прасад з модифікаціями (Shaw, Prasad, 1970).

ДНК виділяли з 6-10 зрілих насінин екстрагуючим буфером, як описано (Plaschke et al., 1995). Концентрацію ДНК визначали з використанням калібрувальної кривої, створеної на основі смуг з відомим вмістом ДНК (програма "Quantity One").

Ампліфікацію проводили в 30 мкл буферної суміші, що містила 50 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl (рН 9,0), 0,01% тритон Х-100, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мкМ відповідного праймеру, 0,2 мМ кожного dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 30 нг ДНК і 1,5 од. *Tag*-полімерази. В пробірці на реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінерального масла. У роботі було використано 12 праймерів, з яких P36, P37, P38, P46, P53 розроблені авторами роботи (Сиволап и др., 1998), а праймери OPT-08, OPW-04, OPW-06, OPW-09, OPW-10, OPW-15 фірмою Operon Technologies, USA.

Умови ампліфікації були такими: перша денатурація 94 °С – 5 хв; 94 °С – 1 хв; відпал - 36 °С – 1 хв; елонгація - 72 °С – 2 хв – 45 циклів; фінальна елонгація 72 °С – 7 хв. За даних умов результати ампліфікації відтворювалися. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 2%-ному агарозному гелі. Як буфер гелю і електродний буфер використовували Трис-ацетатний розчин, що містив 0,04 М Трис з додаванням 0,002М EDTA.

Зображення одержували за допомогою системи Gel-Doc 1000/2000 (Bio Rad, USA).

Аналіз треків здійснювали за допомогою програмного пакета "Quntity One". Як маркери для визначення розмірів ампліфікованих фрагментів використовували 1 kb ladder.

Статистична обробка даних. Ймовірність відповідності очікуваних і отриманих даних при вивченні генетичного контролю окремих ферментів визначали за допомогою критерію χ^2 .

Оцінку зчеплення між ознаками визначали за допомогою методу максимальної правдоподібності (Allard, 1956) з використанням програми MAPMAKER 3,0 (Lander et al., 1987). Групи зчеплення формували за допомогою команди "Group" при LOD_{min}=3,0 і r_{max} = 0,316. Локуси вважалися зчепленими при LOD>3,0 і при рекомбінації, що не перевищувала значення 0,316.

Як одну з характеристик генетичного різноманіття використовували генетичну відстань за Nei, Li (Nei, Li, 1979). Кластеризацію проводили незваженим парно груповим методом (UPGMA) (Sneath et al., 1973) з використанням програми TREES (Календарь, 1994).

Вихідні дані з урожаю насіння, висоти рослин і вмісту олії у насінні гібридів F₁ були отримані співробітниками відділу селекції соняшнику Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва у період 1994-1996 рр і надані нам.

Кореляційний аналіз проводили за Доспеховим (Доспехов, 1985). Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету прикладних програм "ОСГЕ" складеного співробітниками відділу генетики Інституту рослинництва ім.В.Я.Юр'єва Літуном П.П., Белкіним О.О. та Белянським О.І.

Істинний гетерозис оцінювали як відношення різниці показника гібриду і кращої батьківської лінії до показника кращої батьківської лінії.

Рівень гібридності визначали як відношення кількості гібридного насіння до загальної кількості проаналізованого насіння.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Міжлінійний поліморфізм ізоферментів. У результаті аналізу колекції 46 інбредних

ліній соняшнику харківської селекції за 10 ізоферментними системами було виявлено від 2 до 3 алельних варіантів на ген. За генами анодної естерази (*Est1*, *Est2*, *Est3*), катодної естерази (*cEst5*), анодної кислої фосфатази (*Acp1*), лейцинамінопептидази (*Lap1*, *Lap2*) виявлено 3 алози, позначені нами як S – “повільний”, F – “швидкий” і vF – “дуже швидкий”. Решта локусів, такі як *Est4*, *6-Pgd1*, *Idh2*, *cAcp1*, *Me1*, *Me2* були представлені двома алозимами – “швидким” F і “повільним” – S.

За генами, що контролюють синтез НАД-залежної малатдегідрогенази і аспартатамінотрансферази, були виявлені “нуль”-алелі, що синтезують неактивні субодиниці ферменту.

Частотний розподіл алельних варіантів у вивченій виборці ліній було представлено нерівномірно. З 33 ідентифікованих алелів були виявлені рідкісні алельні варіанти за такими генами: *Est1* – vF, *Est2* – vF, *Est3* – vF, *Got1* – 0, *Lap1* – S, *Lap1* – vF, *Lap2* – S, *Lap* – vF, *Me1* – S, *Acp1* – F, *Acp1* – vF. Разом з тим, у вивченій виборці були представлені алелі, що мають досить високу частоту. Наприклад, алелі *Got1* – N, *Me1* – F, *Acp1* – S.

Отримані дані показали нерівномірний розподіл алозимів. Це може свідчити про те, що алельні варіанти мають різну адаптивну і селекційну цінність.

Генетичний контроль анодної естерази. У вихідних батьківських лініях було виявлено чотири поліморфні зони анодної естерази. У гібридів F₂ було виявлено три типи зимограм. Перша і третя групи були ідентичні вихідним батьківським формам. Друга група була представлена електрофоретичними спектрами, що поєднували одночасно компоненти обох батьків. Розщеплення за кожною із зон відповідало 1:2:1, що свідчить про моногібридний кодомінантний тип спадкування (табл.1). Додаткових зон активності ферменту у даних гібридних комбінаціях не виявлено, що підтверджує мономірну структуру ферменту. Виявлені зони активності ферменту контролюються, очевидно, чотирма генами, позначеними нами як *Est1*, *Est2*, *Est3* і *Est4*.

Генетичний контроль катодної естерази. Вихідні інбредні лінії були представлені однією поліморфною зоною катодної естерази. Три типи зимограм було виявлено при аналізі гібридів F₂. Співвідношення фенотипічних класів в F₂ відповідало розщепленню 1:2:1, що також свідчить про моногібридний кодомінантний тип спадкування (табл.1). Ген катодної естерази ми позначили як *cEst5*.

Генетичний контроль катодної кислої фосфатази. Інбредні лінії, взяті в аналіз, мали дві зони активності катодної кислої фосфатази. У результаті гібридологічного аналізу було виявлено, що перша зона активності ферменту розщеплюється у співвідношенні близькому до 1:2:1, тобто компоненти цієї зони контролюються алелями одного гена, позначеного нами *cAcp1* (табл.1). На зимограмах відповідних гетерозиготам був виявлений додатковий компонент. Це стало підставою для припущення про димерну структуру катодної кислої фосфатази. Компоненти, виявлені у другій зоні активності ферменту в обох батьківських ліній не відрізнялися за електрофоретичною рухомістю. Характер спадкування за даною зоною ферментативної активності визначити не вдалося.

Генетичний контроль НАД-залежної малатдегідрогенази. Вихідні інбредні лінії були представлені трьома зонами активності НАД-залежної малатдегідрогенази. У лінії Sx2552 у першій і третій зонах активності ферменту були виявлені “нуль”-алелі, що контролюють утворення неактивних молекул малатдегідрогенази. Лінія X790 була представлена активними субодиницями. Кожна зона ферментативної активності мала три компоненти. Випадків рекомбінації між ізоферментами не спостерігалось. Чисельне співвідношення фенотипічних класів для першої зони ферментативної

активності наближалось до 9:7 (табл.1). Ізоферменти, що виявляються у цій зоні, ймовірно, контролюються двома незалежно спадкованими генами.

Співвідношення класів за наявністю ізоферментів у третій зоні активності ферменту склало 3:1 (табл.1). Гени НАД-залежної малатдегідрогенази ми позначили як *Mdh1/Mdh2, Mdh3*.

Генетичний контроль листкової анодної і катодної естерази. У ліній Сх2552 і Х982 було виявлено одна і дві зони активності анодної і катодної естерази відповідно.

У результаті аналізу було виявлено, що кожна з ферментативних зон розщеплюється у співвідношенні близькому до 1:2:1, що дозволяє зробити висновок про кодомінантний тип спадкування (табл.1).

У першій зоні активності анодної і катодної естерази додаткових компонентів не виявлено, що свідчить про мономерну структуру ферменту. Виняток склала друга зона ферментативної активності. На відміну від першого гену (*cEst5*), у гетерозигот за другим геном (*cEst6*) виявлені додаткові компоненти. Напевно, вони являють собою міжжалельні взаємодії продуктів одного гена. Це дає підстави для припущення про димерну природу ферменту.

Ізоферментний спектр анодної і катодної естерази насіння і листків соняшнику.

При вивченні інбредних ліній соняшнику Сх2552 і Х982 було виявлено відмінність в експресії генів анодної і катодної естерази в тканинах насіння і листка. У насінні виявлена активність генів *Est1, Est2, Est3, Est4*. Активність генів *Est1, Est3 і Est4* у листках не виявлена, а спостерігається експресія генів *Est2*. Ген катодної естерази *cEst5* активний як в насінні, так і у тканинах листка. У листках експресується ген *cEst6* і зовсім не виявляються ізоферменти, що контролюються цим геном в зрілому сухому насінні соняшнику.

Групи зчеплення ізоферментних локусів. Тест на зчеплення показав, що група генів *Est1, Est2, Est3* спадкується як єдиний блок. Випадків рекомбінації між цими локусами не виявлено. Такий самий тип спадкування був виявлений у жита (Wehling et al., 1984). Аналіз на зчеплення виявив незалежне спадкування гена *Est4* відносно генів *Est1, Est2, Est3*. Ген *cEst5*, що спадкується незалежно відносно гена *Est4*, знаходиться в одній групі зчеплення з генами *Est1, Est2, Est3*. Рекомбінація в схрещуваннях 1-3 склала 0,5; 11,2 і 6,7% відповідно.

Аналіз розщеплення показав, що гени *Mdh1/Mdh2* та *Mdh3* сегрегують незалежно один від одного. При оцінці зчеплення генів *Mdh1/Mdh2* та *Mdh3* з генами естерази *Est1, Est2, Est3, cEst5* виявлено наявність зчеплення гена *Mdh3*. Рекомбінація між геном *Mdh3* і генами *Est1,*

Est2, Est3 Табл.1. Розщеплення по ферментним локусам у гібридів F₂.

Локуси	Сх2552xХ982 c ²		Р	Сх2552xХ854 c ²		Р	Сх2552xХ790	c ²
	Р			Р				
Анодна естераза								
<i>Est1</i>	28:44:25	1,00	0,70-0,50	13:15:5	4,14	0,20-0,10	22:57:28	
	1,11	0,70-0,50						
<i>Est2</i>	28:44:25	1,00	0,70-0,50	13:15:5	4,14	0,20-0,10	22:57:28	
	1,11	0,70-0,50						
<i>Est3</i>	28:44:25	1,00	0,70-0,50	13:15:5	4,14	0,20-0,10	22:57:28	
	1,11	0,70-0,50						
<i>Est4</i>	32:49:16	5,27	0,10-0,05	8:15:10	0,50	0,70-0,50	23:54:31	
	1,18	0,70-0,50						
Катодна естераза								
<i>cEst5</i>	26:41:30	2,63	0,30-0,20	12:16:5	2,99	0,30-0,20	29:45:24	
	1,15	0,70-0,50						

Катодна кисла фосфатаза									
<i>cAcp1</i>	30:44:23	1,83	0,50-0,30	8:16:9	0,07	0,98-0,95	17:48:18	2,04	
0,50-0,30									
НАД-залежна малатдегідрогеназа									
<i>Mdh1/ Mdh2</i>	-	-	-	-	-	62:46	0,05	0,90-0,80	
<i>Mdh3</i>	-	-	-	-	-	75:33	1,77	0,20-0,10	
Листова анодна естераза									
<i>Est2</i>	49:74:37	2,69	0,30-0,20	-	-	-	-	-	
Листова катодна естераза									
<i>cEst5</i>	35:77:42	0,62	0,70-0,50	-	-	-	-	-	
<i>cEst6</i>	35:59:40	2,50	0,30-0,20	-	-	-	-	-	

склала 25,6%, а для генів *Mdh3* і *cEst5* – 28,0%. Гени *Mdh1/Mdh2* спадкуються незалежно відносно усіх виявлених генів.

За допомогою тесту на зчеплення виявлено, що ген *Est4* зчеплений з геном *cAcp1*.

Рекомбінація склала 9,8% (схрещування 1); 1,5% (схрещування 2) і 10,9% (схрещування 3).

Ймовірне розташування ізоферментних генів представлено на рис.1. Результати оцінки зчеплення між ферментними локусами у гібридних комбінаціях F₂ наведені в табл.2.

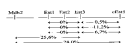


Рис.1. Схематичне розташування генів у групі зчеплення.

При аналізі на зчеплення між генами листової анодної й катодної естерази було показано, що ген *Est2* зчеплений з геном *cEst5* з рекомбінацією 5,6% (LOD=44,84). Не виявлено зчеплення гена *cEst6* з генами *Est2* і *cEst5*.

Табл.2. Дані з оцінки зчеплення між локусами в трьох комбінаціях схрещування F₂.

Пара генів	Сх2552х982		Сх2552хX854		Сх2552хX790		LOD
	% рекомбінації	LOD	% рекомбінації	LOD	% рекомбінації	LOD	
<i>Est1-Est2</i>	0,0	45,76	0,0	15,35	0,0	47,26	
<i>Est1-Est2</i>	0,0	45,76	0,0	15,35	0,0	47,26	
<i>Est2-Est3</i>	0,0	45,76	0,0	15,35	0,0	47,26	
<i>Est1/Est2/Est3-cEst5</i>	0,5	43,34	11,2	6,34	6,7	26,46	
<i>Est4-cAcp1</i>	9,8	20,52	1,5	13,10	10,9	14,82	
<i>Est1/Est2/Est3-Mdh3</i>	-	-	-	-	25,6	4,48	
<i>cEst5-Mdh3</i>	-	-	-	-	28,0	3,69	

Примітка: решта генів спадкується незалежно (LOD<3,0)

Використання біохімічних маркерів у генетико-селекційних дослідженнях

Біохімічна ідентифікація інбредних ліній соняшнику. У вивченій вибірці ліній було ідентифіковано 33 алельні варіанти за ферментними генами. При аналізі даної вибірки виявлено 4 пари ліній, що мають однакові генотипи за всіма ферментними локусами. Це лінії X780 і X840, X790 і X764, X1007 і X660, X830 і X659. Виявлена схожість цих ліній може бути зумовлена насамперед особливостями їх добору або наявністю спільного предка. Наприклад, лінії X790 і X764 у своїх родовідних мають лінію X711, що в свою чергу, створена шляхом добору з югославського зразка Os5. Лінії іншої пари – X1007 і X660 мають різне походження, але ідентичні генотипи. Напевно, це пов'язано з особливостями добору в конкретній агроекологічній зоні. Для розрізнення ідентичних

ліній необхідне залучення додаткових маркерів. Інші 38 ліній мали унікальний набір алелів за вивченими генами.

Отримані дані можна використовувати для контролю чистоти на всіх етапах насінництва, паспортизації ліній, а також визначення рівня гібридності у гібридів соняшнику.

Можливості використання ізоферментів для прогнозування ефекту гетерозису.

Одним з підходів до прогнозування гетерозису є оцінка генетичного різноманіття вихідного матеріалу за молекулярно-генетичними маркерами, зокрема, за ізоферментними.

Генетичне різноманіття інбредних ліній соняшнику змінювалося від 0,078 до 0,615.

Найбільшою генетичною віддаленістю від інших характеризувалася лінія X2552.

У результаті кореляційного аналізу між генетичними дистанціями і урожаєм насіння, висотою рослин і вмістом олії у гібридів F₁ була виявлена позитивна залежність. У табл.3 наведені результати кореляційного аналізу.

Табл.3. Коефіцієнти кореляції між генетичними відстанями і господарсько-цінними ознаками, 1994-1996 гг.

Ознака	Рік вивчення		
	1994	1995	1996
Урожай насіння	0,53	0,45	0,40
Вміст олії в насінні	0,70	0,14	0,18
Висота рослин	0,37	0,32	0,29

Коефіцієнти кореляції істотні на 5% рівні при $k_{крит.і0,195}$

У більшості випадків зростання генетичної відстані між лініями призводило до збільшення урожайності, висоти гібридів F₁ і відповідно рівня гетерозису. Так, найбільш урожайні й високорослі гібриди отримані з використанням лінії X2552. Інтервал дистанцій між лінією X2552 й іншими лініями змінювався в межах 0,348-0,615. Урожайність гібридів, отриманих з використанням цієї лінії, варіювала від 30,1 до 36,1 ц/га. Максимальний рівень вияву гетерозису від схрещування X2552 з іншими лініями склав 107,3%. У середньому урожайність склала 33,6 ц/га, а гетерозис – 82,6%. Середня висота гібридів з використанням цієї лінії склала 147,3 см, а гетерозис 34,7% (табл.4).

Табл.4. Середня урожайність гібридів F₁ в 1996-1997 рр. в залежності від генетичної відстані між батьківськими лініями

№ п/п	Генетичні відстані	Кількість гібридів	Середня урожайність, ц/га
1	0,078-0,180	24	30,4
2	0,194-0,288	35	32,3
3	0,307-0,531	72	31,7
4*	0,348-0,615	24	33,6

НІР_{0,5} 1,17

*Гібриди, які були створені за участю лінії X2552

Необхідно відзначити, що подібна закономірність спостерігалася не завжди. Були виявлені гібридні комбінації, в яких показник ознаки, що вивчалася, високий, а генетична відстань між вихідними батьківськими лініями невелика, і навпаки. Наприклад, урожайність гібридної комбінації X1008xX1007 при D=0,159 склала 33,9 ц/га.

Коефіцієнт кореляції між генетичними відстанями батьківських ліній і вмістом олії у насінні значно змінювався за роками (табл.3). Рівень гетерозису за три роки досліджень не перевищив 8%. Кліматичні умови випробування сильно впливали на залежність між двома параметрами.

Отримані результати збігаються з даними інших авторів, одержаними при вивченні генетичного різноманіття вихідного матеріалу соняшнику, що мав інше походження (Сиволап и др., 1998; Hunt et al., 1992). Позитивна залежність виявлена не лише для соняшнику, а й таких культур як кукурудза (Heidrich-Sobrino et al., 1975; Smith et al., 1990; Вербицкая и др., 1998), рис (Peng et al., 1988; Xiao et al., 1996; Liu et al., 1998).

Визначення рівня гібридності простих гібридів. В табл. 5 наведені результати по оцінці рівня гібридності у простих гібридів соняшнику. Найбільший рівень гібридності був виявлений для гібриду Ной (94%); а найменший для гібриду Світоч (63%). Наведені дані свідчать про низький рівень гібридності, крім гібриду Ной. Насамперед, це може бути пов'язано з порушеннями агротехнічних прийомів під час розмноження інбредних ліній та створення гібридів (недотримання просторової ізоляції, несвоєчасне проведення сортових прополок). В роботі (Попереля, 2000) також було відзначено низький рівень гібридності насіння соняшнику за допомогою геліантініну.

Табл.5. Гібридність насіння F₁ простих гібридів соняшнику

Гібрид	Комбінація схрещування	Ізоферментна система	Гібридність, %
Харківський 49	Sx908 x X711	Анодна естераза	73
Харківський 58	Sx508 x X711	Анодна естераза	75
Світоч	Sx1006 x X711	6-фосфоглюконат- дегідрогеназа, малатдегідрогеназа	63
Кий	Sx908 x X762	Анодна естераза	78
Погляд	Sx2111 x X711	Малатдегідрогеназа	86
Ной	Sx1002 x X720	Катодна естераза	94

Класифікація колекції інбредних ліній соняшнику за допомогою біохімічних маркерів.

Систематизація колекції може забезпечити роботу з вихідним матеріалом, а також окреслити шляхи її поповнення. Анодна естераза, катодна естераза, катодна кисла фосфатаза і НАД-залежна малатдегідрогеназа були проаналізовані для встановлення генетичних зв'язків між 79 інбредними лініями, що мають комерційне значення. У результаті кластеризації лінії було поділено на 4 кластери – “А”, “В”, “С”, “D”. Генетичні відстані між лініями соняшнику склали від 0,000 до 0,760 для окремих пар ліній.

Перший кластер (“А”) був представлений переважно батьківськими лініями – відновниками фертильності. В цей кластер увійшли лінії, що мали у своїх родовідних зразки, інтродуковані з Югославії та США. Це зразки Os3, Os5, NS4 (Югославія), SF100, C208, RW637 (США). Слід підкреслити, що більшість відновників фертильності створена з югославських зразків. Наприклад, лінію X711 створено шляхом добору із зразка Os5. До цього кластера також увійшли два стерильні аналоги – X4353 і X1010, які походять від сорту-популяції Харківський 50 і зразка ВІР – W501.

До кластера “В” увійшли як батьківські форми, так і материнські лінії. Матеріалом для їх створення служили міжвидові гібриди від схрещування *H. annuus* з *H. tuberosus*, а також сорти популяції Чернянка 66, Харківський 50, Харківський 100.

Лінії, які походять від зразка з США SF100, сорту Чернянка 66 і міжвидових гібридів, були об'єднані в кластери “С” та “D”.

Лінії X2552 і X1012 не увійшли до жодного з кластерів. Вони створені шляхом добору з сорту Чернянка 66 і Харківський 100, відповідно. Лінія X2552 характеризувалась

найбільшою генетичною віддаленістю від решти ліній.

У цілому можна зробити висновки, що отримана класифікація колекції інбредних ліній у більшості випадків відповідає інформації про родовідні вивчених ліній (Кириченко, 1996).

Молекулярно-генетичний поліморфізм RAPD-локусів і генетичні зв'язки між інбредними лініями

Аналіз внутрішньовидової мінливості методом ПЛР з довільними праймерами. За допомогою RAPD-аналізу було виявлено поліморфізм між 30 лініями соняшнику. Найбільший рівень поліморфізму виявлений з використанням праймера OPW-06 (83%); а найменший одержано з використанням праймера OPW-04 (62%). Середній рівень поліморфізму склав 72,6% (табл.6). При використанні різних праймерів ампліфікувалося від 14 до 23 варіантів фрагментів ДНК. Всього був ідентифікований 221 локус, з яких 161 виявився поліморфним.

Табл.6. Рівень поліморфізму, який виявляється з використанням довільних праймерів

Праймер	Послідовність нуклеотидів 5'-3'	Процент поліморфізму
P36	CCGAATTCGC	67
P37	CTGACCAGCC	70
P38	GATACGTTGTC	68
P46	GGTTGGGGAG	78
P53	GTCTAAGTCG	72
OPT-08	AACGGCGACA	75
OPW-04	CAGAAGCGGA	62
OPW-06	AGGCCCCGATG	83
OPW-09	GTGACCGAGT	78
OPW-10	TCGCATCCCT	77
OPW-15	ACACCGGAAC	68
OPX-01	CTGGGCACGA	73

Кожна лінія соняшнику відрізнялася від інших не лише кількістю фрагментів та їх довжиною, а й ступенем виразності, що ймовірно, може забезпечувати додатковий поліморфізм (Hunt et al., 1992).

Деякі фрагменти були унікальними, присутніми лише в одному генотипі. Так, лише у ліній X945 і X1012 при ампліфікації з праймером OPW-04 виявляються фрагменти довжиною ~600 і 1200 п.н. відповідно. У лінії X908 при використанні праймера P38 вдалося ідентифікувати унікальний фрагмент розміром ~ 900 п.н.

Схожі результати отримано при аналізі самозапилених ліній соняшнику селекції СГІ. Був показаний високий рівень поліморфізму, що виявлявся за допомогою RAPD-аналізу. У середньому він склав 64% (Сиволап и др., 1998).

Рис.2. Дендрограма генетичних зв'язків між лініями, отримана на підставі даних RAPD-аналізу (А) та ізоферментного аналізу (Б).

Таким чином, в результаті наших досліджень було виявлено високий рівень поліморфізму серед інбредних ліній.

Порівняння RAPD та ізоферментного аналізу для визначення генетичних зв'язків між інбредними лініями. На рис. 2 представлені дендрограми, що відображають генетичні зв'язки інбредних ліній соняшнику, побудовані на підставі даних RAPD (А) та ізоферментного аналізу (Б).

У результаті кластеризації лінії в обох випадках об'єдналися в три групи (рис.2). Аналіз топології одержаних дендрограм продемонстрував істотну різницю між ними, оскільки виділені кластери на двох дендрограмах представлені різними лініями. Коефіцієнт кореляції між генетичними відстанями, одержаний за даними RAPD-аналізу та ізоферментного аналізу, склав 0,07 ($P < 0,05$). Характерною особливістю дендрограми, отриманої на підставі RAPD-аналізу, є те, що більшість материнських і батьківських ліній були зосереджені в різних кластерах.

Аналогічна робота була виконана Пізаро із співавторами (Pizarro et al., 2000). Автори цієї роботи також відзначають відмінність в отриманих дендрограмах. Коефіцієнт кореляції склав 0,22.

Таким чином, більш прийнятним для структурування вихідного матеріалу є RAPD-аналіз порівняно з ізоферментним аналізом, через те, що вдалось чітко розподілити лінії на групи материнських та батьківських форм.

ВИСНОВКИ

1. Компонентний склад анодної естерази контролюється генами: *Est1*, *Est2*, *Est3*, *Est4*; катодної естерази – *cEst5*, *cEst6*; катодної кислій фосфатази – *cAcp1* і НАД-залежної малатдегідрогенази – *Mdh1/Mdh2* и *Mdh3*.
2. Ідентифіковано дві групи зчеплення між локусами, що контролюють синтез ферментів у соняшнику: *Mdh3-Est1-Est2-Est3-cEst5* і *Est4-cAcp1*. Гени *Mdh1/Mdh2* спадкуються незалежно від цих двох груп зчеплення. Ген листової катодної естерази – *cEst6* спадкується незалежно відносно генів *Est2* і *cEst5*.
3. У насінні експресуються гени *Est1*, *Est2*, *Est3*, *Est4*, *cEst5*, а в тканинах листа – *Est2*, *cEst5*, *cEst6*.
4. За 10 ізоферментними системами виявлено поліморфізм. Ідентифіковано від 2 до 3 алелів на ген, які характеризуються різною частотою. Виявлені рідкісні алельні варіанти, що зустрічаються в одиничних лініях.
5. Ідентифіковано 46 інбредних ліній соняшнику колекції Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва. 38 із 46 інбредних ліній різнилися одна від одної за одним із 16 проаналізованих ізоферментних локусів, які контролюють синтез 10 ізоферментних систем.
6. Встановлена кореляція між генетичними відстанями і господарсько-цінними ознаками. Оцінка генетичного різноманіття інбредних ліній за ізоферментами може служити критерієм прогнозування ефекту гетерозиса тільки по врожайності.
7. Встановлено рівень гібридності 6 простих гібридів соняшнику за допомогою електрофорезу ізоферментів.
8. Класифікована колекція ліній соняшнику за ступенем генетичної спорідненості з використанням 4 ізоферментних систем: анодної і катодної естерази, катодної кислій фосфатази та НАД-залежної малатдегідрогенази.
9. Середній рівень поліморфізму ДНК, встановлений за допомогою RAPD-методу склав 72,6%.
10. Більш прийнятним для диференціації інбредних ліній є RAPD-аналіз у порівнянні з ізоферментним аналізом.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kirichenko V.V., Sharopova N.R., Popov V.N., Maklyak E.N. Potential use polymorphism of isoenzymes in selective-genetical programs for sunflower (*Helianthus annuus L.*) // *Helia*. - 1999. – Vol.22. - №30 – P.149-154.
2. Попов В.М., Кириченко В.В., Панченко І.А. Визначення рівня гібридності насіння соняшнику в промисловому насінництві // *Селекція і насінництво*. – 1999. – Вип.82. –

C.134-138.

3. Kirichenko V.V., Popov V.N. Genetics of isoenzymes and analyses of isoenzymes linkage and morphological loci in sunflower (*Helianthus annuus L.*) // *Helia*. – 2000. – Vol.23. - №33. – P.65-76. 3.
4. Попов В.Н. Классификация коллекции линий подсолнечника Института растениеводства им. В.Я.Юрьева с помощью биохимических маркеров // *Вестник харьковского университета*. – 2000. - №456. – С.80-83.
5. Попов В.Н. Использование RAPD-анализа для изучения полиморфизма линий подсолнечника (*H. annuus L.*) // *Вестник харьковского университета*. – 2001. - №506. – С.241-243.
6. Попов В.Н., Кириченко В.В. Оценка генетического разнообразия и взаимоотношений между линиями подсолнечника с использованием изоферментов и RAPD-маркеров // *Труды по фундаментальной и прикладной генетике*. – 2001. – С.223-232.
7. Кириченко В.В., Шаропова Н.Р., Макляк Е.Н., Попов В.Н. Возможность использования генетического разнообразия исходного материала по изоферментам для прогнозирования эффекта гетерозиса у подсолнечника // *Тези доповідей міжнародної конференції “Наукові основи стабілізації виробництва продукції рослинництва”*. - Харків, Ін-т рослинництва ім.В.Я.Юр'єва. - 1999. - С. 156
8. Попов В.Н. Генетический контроль и сцепление локусов эстеразы, катодной кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы у подсолнечника // *Тези доповідей VII Конференції молодих вчених “Проблеми фізіології рослин і генетики на рубежі третього тисячоліття”*. – К.: Інститут фізіології рослин і генетики. – 2000. - С.106
9. Попов В.Н. Использование RAPD-анализа для изучения полиморфизма подсолнечника // *Сборник тезисов 5-ой Пущинской конференции молодых ученых “Биология - наука 21-го века”*. – Пущино: Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения. – 2001. - С.89.
10. Попов В.Н. Полиморфизм изоферментов у инбредных линий подсолнечника // *Сборник тезисов международной конференции молодых ученых “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений”*. – Харьков: Ин-т растениеводства им. В.Я.Юрьева. – 2001. – С. 55-56.
11. Popov V.N., Urbanovich O.Yu., Kirichenko V.V. Classification of sunflower inbred lines collection with molecular-genetic markers // *International conference “Genetics collections, isogenic and alloplasmic lines”*. – Novosibirsk: IC&G. - 2001. – P.206-209.

Попов В.М. Використання молекулярно-генетичних маркерів в генетико-селекційних дослідженнях соняшнику. – Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук із спеціальності 03.00.15. – генетика. – Інститут клітинної та генетичної інженерії НАНУ, Київ, 2001. В роботі наведені результати використання різних систем молекулярно-генетичних маркерів в теоретичних та прикладних дослідженнях соняшнику. Вивчено поліморфізм ізоферментних систем. Показано, що алельні варіанти ферментних локусів розподілені не рівномірно. Було ідентифіковано рідкі алельні варіанти. Вивчено генетичний контроль анодної естерази, катодної естерази, катодної кислої фосфатази та НАД-залежної малатдегідрогенази, а також ідентифіковано дві групи зчеплення між ними. По генам анодної і катодної естерази показана різна експресія в тканинах сім'янки та листка. Ідентифіковані генотипи 46 інбредних ліній соняшника. У вивченій виборці ліній були зразки повністю ідентичні за компонентним складом ізоферментів. Виявлено позитивну залежність між генетичним різноманіттям батьківських форм за ізоферментами та урожаєм насіння, висотою рослин і вмістом масла в сім'янках гібридів

F₁. Виділено гібридні комбінації з високим рівнем прояву ознаки, а також гетерозису, батьківські форми яких мають велику генетичну відстань між собою. Встановлено рівень гібридності простих гібридів соняшнику за допомогою ферментних маркерів. З використанням 4 ізоферментних систем вдалось класифікувати колекцію вихідного матеріалу, який налічує 79 ліній. Вивчено внутривидовий поліморфізм за допомогою RAPD-аналізу. Зроблено порівняння RAPD- і ізоферментного аналізу у вивченні генетичних взаємовідносин між інбредними лініями.

Ключові слова: соняшник, *Helianthus annuus* L., генетика ізоферментів, ПЦР, RAPD, поліморфізм, кластерний аналіз.

Попов В.Н. Использование молекулярно-генетических маркеров в генетико-селекционных исследованиях подсолнечника. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15. – генетика. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ, Киев, 2001.

В работе представлены результаты по использованию различных систем молекулярно-генетических маркеров в теоретических и прикладных исследованиях подсолнечника. Изучен генетический контроль анодной эстеразы, катодной эстеразы, катодной кислой фосфатазы и НАД-зависимой малатдегидрогеназы. Показано, что анодная эстераза контролируется генами: *Est1*, *Est2*, *Est3* и *Est4*; катодная эстераза – *cEst5*, *cEst6*; катодная кислая фосфатаза – *cAcp1* и НАД-зависимая малатдегидрогеназа – *Mdh1/Mdh2*, *Mdh3*. Было идентифицировано две группы сцепления. Первая группа представлена следующими генами: *Mdh3-Est1-Est2-Est3-cEst5*, вторая – *Est4-cAcp1*. Гены *Mdh1/Mdh2* наследуются независимо по отношению к этим группам сцепления ферментных генов. По генам эстеразы, показана различная экспрессия в тканях семени и листа. В семенах экспрессируются следующие гены: *Est1*, *Est2*, *Est3*, *Est4* и *cEst5*, а в тканях листа *Est2*, *cEst5*, *cEst6*. В пределах изученной коллекции было отмечено неравномерное распределение аллельных вариантов ферментных локусов. Идентифицированы генотипы 46 инбредных линий подсолнечника. В изученной выборке линий были образцы полностью идентичные по компонентному составу изоферментов. Выявлена положительная зависимость между генетическим разнообразием исходных родительских форм по изоферментам и урожаем семян, высотой растений и содержанием масла в семенах гибридов F₁. Выделены гибридные комбинации с высоким уровнем проявления признака, а также гетерозиса, родительские формы которых имеют большое генетическое расстояние между собой. Установлен уровень гибридности простых гибридов подсолнечника. Было показано, что гибридность большинства гибридов низкая. С использованием 4 изоферментных систем удалось классифицировать коллекцию исходного материала, состоящего из 79 линий. Изучен внутривидовой полиморфизм с помощью RAPD-анализа. Средний уровень полиморфизма составил 72,6%. Были идентифицированы уникальные фрагменты, присутствующие у единичных линий. Проведено сравнение RAPD- и изоферментного анализа в изучении генетических взаимоотношений между инбредными линиями. Показано, что для дифференциации исходного материала более приемлемым является RAPD-анализ.

Ключевые слова: подсолнечник, *Helianthus annuus* L., генетика изоферментов, ПЦР, RAPD, полиморфизм, кластерный анализ.

Popov V.N. The use of molecular-genetic markers in genetic-selection studies of

sunflower. – Manuscript.

Thesis for a Candadate's degree in Biological Sciences on speciality 03.00.15. – Genetics. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU, Kiev, 2001.

In the dissertation the results on the use of different systems of molecular-genetic markers in theoretical and applied studies of sunflower are submitted. There has been studies a genetical control of anode esterase, cathodal esterase, cathodal acid phosphatase and NAD-dependable malatedehydrogenase as well as two groups of linkage between them have been identified. By the gene of esterase there has been shown a different expression in seed and leaf tissues. The genotypes of forty six inbred lines of sunflower have been identified. There were the samples fully identical as to the component composition of isoenzymes in the studied sampling of lines. It was a success to classify the original material collection consisting of seventy-nine lines by the use of four isoenzymic systems. A positive correlation has been revealed between genetic diversity of primary parental forms by isoenzymes and seed yield, plant height and oil content in seeds of F₁ hybrids. There have been determined hybrid combinations with a high level of trait's expression as well as heterosis, the parental lines of these have a great genetical distance between them. The intraspecific polymorphism has been studied by means of RAPD-analysis. The comparison of RAPD- and isoenzymic analyses while studying genetic intercorrelations among inbred lines has been made.

Key words: sunflower, *Helianthus annuus* L., genetics of isoenzymes, PCR, RAPD, polymorphism, cluster analysis.

м.Харків, ТОВ “Спайк”, вул. Сумська, буд. 11.
Тел. (0572) 14-29-61, 12-80-44.
Підписано до друку 14.03.2002р. Формат 60x90/16
Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 1
Обл.-вид. арк. 1. Тираж 100 екз. Зам. №536