

УДК 575.11.113:854.78

А. Є. СОЛОДЕНКО, к.б.н., пров. н. сп.
Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,
вул. Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
e-mail: genome2006@mail.ru

МІКРОСАТЕЛІТНІ МАРКЕРИ В ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ СОНЯШНИКА

Встановлені алельні характеристики 28 гібридів, наведених в Реєстрах сортів рослин України 2006–2008 рр., та 13 інбредних ліній соняшника за 11 мікросателітними локусами. Виявлено незначний рівень генетичного різноманіття досліджених інбредних ліній соняшника української селекції: в середньому 3 алеля на мікросателітний локус, індекс поліморфності дорівнює 0,48. З двадцяти восьми досліджених гібридів для двадцяти чотирьох виявлені унікальні сполучення алелів.

Ключові слова: соняшник, генетичне різноманіття, мікросателітні маркери.

Ефективність генетико-селекційних досліджень значно підвищується при використанні молекулярних маркерів, які створюються внаслідок аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму. Результати попередніх досліджень показали можливість виявлення молекулярно-генетичного поліморфізму генотипів соняшника української селекції за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з праймерами до мікросателітних послідовностей (SSR – simple sequence repeats) [1]. Мікросателітні маркери використовуються для характеристики ліній та гібридів соняшника української селекції [2]. Аналіз мікросателітів дозволяє отримувати стабільні кодомінантні маркери за умов використання будь-якої частини рослини та на будь-якій стадії її розвитку. SSR-локуси є високополіморфними в геномі соняшника, тому набір алелів за кількома такими локусами може розглядатися як унікальна характеристика генотипу. ДНК-типуння ліній і гібридів соняшника за 15 мікросателітними локусами запропоновано для ідентифікації та паспортизації генотипів соняшника [3; 4]. Щорічно в Україні реєструються нові гібриди соняшника, які створені в різних селекційних центрах, у тому числі й зарубіжних. Необхідним є створення банку даних за молекулярно-генетичними характеристиками генотипів, що реєструються, на основі використання уніфікованої ефективної маркерної системи ідентифікації та паспортизації генотипів.

Мета даної роботи: оцінити ефективність використання мікросателітних маркерів для виявлення генетичного різноманіття ліній та гібридів соняшника сучасної селекції.

Матеріали та методи досліджень

Як матеріал для досліджень, використано 13 інбредних ліній (Оранж, Одол1, Од391, Од973, Од1318, Од1295, материнські та батьківські

форми гібридів Сівер, Ковчег, Ной, Етюд, Дарій) та 28 гібридів, занесених до Реєстрів сортів рослин України 2006–2008 рр.: Одор, Олівер, Сапфір (селекції Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, СГІ-НЦНС, Одеса); Карат, Сівер, Ясон, Всесвіт, Дарій, Етюд, Ковчег, Ной, Оскіл, Псьол (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, ІР, Харків); Оберіг, Славутич (Незалежна аграрна індустрія, Запоріжжя); Лакомка, Мастер, Роднік, Флагман (Агро-Інтер, Київ); Онікс, Час (НАУ, Суми); Златибор, Сержан (Нові Сад, Югославія); Іберіко, Латіно (Лімагрейн, Франція); ПР64Г (Піонер Холдінг, Австрія); Тайфун (ДНУ, Росія); КВС Гелія (КВС, Німеччина). Виділення рослинної ДНК, ПЛР-аналіз із використанням праймерів, фланкуючих мікросателітні послідовності, електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації, оцінку індексу поліморфності (PIC) та документування результатів проводили згідно з [2].

Результати досліджень та їх обговорення

Проведено генотипування 28 гібридів, занесених до Реєстрів сортів рослин України 2006–2008 рр., та 13 інбредних ліній за мікросателітними локусами *ORS 409*, *ORS 509*, *ORS 78*, *ORS 1024*, *ORS 3*, *Ha 1796*, *ORS 546*, *ORS 595*, *ORS 599*, *ORS 4*, *Ha 1608*, які за результатами попередніх досліджень [2; 3] запропоновані для ДНК-паспортизації та реєстрації генотипів цієї культури. За ПЛР-аналізом загальної вибірки генотипів для локусу *ORS 3* встановлено наявність двох алелів, для локусів *ORS 409*, *ORS 4*, *ORS 546* – трьох алелів, для локусів *Ha 1796* – п'яти алелів, для локусу *ORS 599*, *ORS 509* – шести алелів, для локусу *ORS 78* – семи алелів, для локусу *ORS 1024* – восьми алелів (таблиці 1, 2). За локусом *Ha 1608* усі досліджені генотипи виявилися гетерозиготними (алелі 157 та 160 п.н.). За локусом *ORS 595* виявлено один алель – 134 п.н. (усі генотипи гомозиготні).

Досліджені гібриди, які наведені в Реєстрах сортів рослин України 2006–2008 рр., створені в селекційних центрах України, Росії, Югославії, Франції, Австрії, Німеччини. За локусами *ORS 599* (алелі 199 п.н., 203 п.н., 210 п.н.), *ORS 509* (алелі 179 п.н., 198 п.н.), *ORS 78* (алелі 159 п.н., 167 п.н.) в генотипах гібридів виявлені алелі (у табл. 1 виділені жирним шрифтом), які не характерні для проаналізованих інбредних ліній, що є батьківськими формами гібридів української селекції. Відмічені унікальні алелі (у табл. 1 виділені жирним шрифтом) за локусами: *ORS 1024* (у гібридів Час та Сержан), *Ha 1796* (у гібридів Час та Латіно), *ORS 409* (у гібрида КВС Гелія). За локусом *ORS 4* унікальне сполучення алелів – 157 п.н., 169 п.н. – виявлено у гібрида Одор (селекція СГІ-НЦНС), усі інші гібриди, незалежно від походження, мали гомозиготний генотип з алелем 172 п.н. З проаналізованої вибірки югославський гібрид Сержан є таким, що найбільш відрізняється від інших.

Досліджені інбредні лінії (табл. 2) створені селекціонерами двох основних центрів селекції соняшника в Україні: Селекційно-генетичного інституту (Одеса) та Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (Харків).

За алелями трьох локусів – *ORS 4*, *ORS 509*, *ORS 3* – лінії селекції СГІ-НЦНС відрізняються від усіх інших досліджених генотипів. Унікальні алелі (у табл. 2 виділені жирним шрифтом) виявлені за локусом *Ha 1796* (алель 247 п.н.) у лінії Одеська 391 і за локусом *ORS 599* (алель 193 п.н.) у лінії Одеська 1318 та Одеська 1295. У цілому, лінії СГІ-НЦНС є більш генетично різноманітними, ніж лінії ІР. П'ять ліній, які використовуються

Таблиця 1

Алельні характеристики гібридів соняшника за мікросателітними локусами

Гібрид	Довжина алелів мікросателітних локусів, п. н.									
	ORS 3	ORS 409	ORS 509	ORS 78	ORS 1024	ORS 546	ORS 599	ORS 4	Ha 1796	
Час	226-226	127-127	192-192	174-174	249-249	161-166	199-203	172-172	188-188	
Онїкс	226-226	127-127	192-192	165-174	244-244	166-169	199-203	172-172	175-175	
Славутич	226-226	127-127	172-192	171-174	244-244	161-166	199-203	172-172	175-175	
Оберіг	226-226	127-127	192-192	165-178	232-236	166-169	199-203	172-172	175-175	
Сапфір	226-226	127-127	192-192	174-174	244-244	161-166	199-203	172-172	175-175	
Олівер	226-226	127-127	198-198	167-167	232-232	161-166	199-210	172-172	175-175	
Одор	226-226	125-125	198-198	174-174	238-238	166-166	179-179	157-169	175-175	
Караг	226-226	127-127	179-198	171-174	242-244	166-169	199-210	172-172	256-256	
Ясон	226-226	127-127	192-192	165-171	236-236	161-166	199-210	172-172	175-175	
Весвіт	226-226	127-127	192-192	165-171	236-236	166-169	199-210	172-172	175-175	
Оскіл	226-226	127-127	192-192	159-171	232-232	161-166	203-210	172-172	175-175	
Псьол	226-226	127-127	192-192	167-167	232-232	161-166	199-203	172-172	175-175	
Дарій	226-226	127-127	172-192	174-174	240-240	161-166	179-190	172-172	175-175	
Етюд	226-226	127-127	192-192	169-178	240-244	166-169	179-190	172-172	17 5-175	
Сівер	226-226	127-127	192-192	169-178	240-244	166-169	179-190	172-172	175-175	
Ковчег	226-226	127-127	192-192	169-174	240-244	166-169	179-190	172-172	175-175	
Ной	226-226	127-127	192-192	169-174	240-244	166-169	179-190	172-172	175-175	
Роднік	226-226	125-125	192-192	171-171	232-232	166-169	199-203	172-172	175-175	
Лакомка	226-226	127-127	192-192	174-174	238-238	161-169	203-210	172-172	175-175	
Мастер	226-226	127-127	192-192	174-174	242-242	166-169	199-203	172-172	175-175	
Флагман	226-226	127-127	198-198	174-174	238-238	166-169	199-210	172-172	175-175	
Тайфун	226-226	127-127	172-179	171-178	236-236	169-169	203-210	172-172	175-175	
КВС Гелія	226-226	131-131	192-198	174-174	244-244	166-169	199-210	172-172	256-256	
ПР64Г	226-226	127-127	192-192	174-174	238-238	161-166	199-210	172-172	256-256	
Іберіка	226-226	127-127	192-192	165-165	236-236	166-166	203-210	172-172	175-175	
Лагіно	226-226	127-127	192-192	165-171	244-244	166-169	199-210	172-172	256-262	
Сержан	226-226	125-125	179-179	159-159	229-229	166-169	199-203	172-172	256-256	
Златибор	226-226	127-127	192-192	171-174	240-240	166-169	199-203	172-172	175-175	

Таблиця 2

Алельні характеристики інбредних ліній соняшника за мікросателітними локусами

Лінія	Довжина алелів мікросателітних локусів, п.н.									
	ORS 3	ORS 409	ORS 509	ORS 78	ORS 1024	ORS 546	ORS 599	ORS 4	Ha 1796	
Оранж	223-223	125-125	195-195	171-171	238-238	166-166	179-179	157-169	256-256	
Одол1	223-223	125-125	195-195	174-174	238-238	166-166	179-179	157-169	175-175	
Од391	223-223	125-125	187-187	174-174	232-232	166-166	179-179	157-169	247-247	
Од973	223-223	125-125	187-187	171-171	236-236	166-166	179-179	157-169	175-175	
Од1318	223-223	127-127	187-187	165-165	238-238	169-169	193-193	157-169	256-256	
Од1295	223-223	127-127	187-187	165-165	238-238	166-166	193-193	157-169	256-256	
м Сівер	226-226	127-127	192-192	178-178	240-240	166-166	179-179	172-172	175-175	
м Ковчег	226-226	127-127	192-192	174-174	240-240	166-166	179-179	172-172	175-175	
м Ной	226-226	127-127	192-192	174-174	240-240	166-166	179-179	172-172	175-175	
м Егюд	226-226	127-127	192-192	178-178	240-240	166-166	179-179	172-172	175-175	
м Дарій	226-226	127-127	192-192	174-174	240-240	166-166	179-179	172-172	175-175	
б Егюд, Сівер, Ковчег, Ной	226-226	127-127	192-192	169-169	244-244	169-169	190-190	172-172	175-175	
б Дарій	226-226	127-127	172-172	174-174	240-240	161-161	190-190	172-172	175-175	

Примітка: м – материнська форма гібрида; б – батьківська форма гібрида (гібридів)

в IP як материнські форми для створення гібридів, відрізняються одна від іншої за алелями лише одного локусу (*ORS 78*). У двох досліджених батьківських форм харківських гібридів виявлені алелі (у табл. 2 виділені жирним шрифтом), які ідентифікують ці генотипи в проаналізованій вибірці ліній: алелі 161 п.н. (локус *ORS 546*) та 172 п.н. (локус *ORS 509*) для батьківської форми гібрида Дарій, алелі 169 п.н. (локус *ORS 78*) та 244 п.н. (локус *ORS 1024*) для батьківської форми гібридів Етюд, Ной, Ковчег, Сівер.

Лінії селекції СГІ-НЦНС виявилися гетерозиготними за локусами *ORS 4* та *Ha 1608*. Імовірні причини гетерозиготності: особливості селекції чи насінництва цих ліній, а також можливість дуплікації зазначених локусів та фланкуючих їх послідовностей у геномі, що було показано для деяких генотипів сояшника [5]. Припущення щодо дуплікації в геномі послідовності, яка вміщує локус *Ha 1608*, може бути підтверджено тим фактом, що ті самі два алелі виявлені в генотипів сояшника найрізноманітнішого походження – лінії селекції СГІ-НЦНС та IP, гібриди десяти селекційних установ з шести європейських країн.

Отримані дані свідчать про незначний рівень генетичного різноманіття досліджених інбредних ліній сояшника: у середньому виявлено 3 алеля на мікросателітний локус, індекс поліморфності дорівнює 0,48. Для порівняння, на вибірці з двадцяти елітних інбредних ліній, які є батьківськими формами високопродуктивних українських гібридів сояшника селекції кінця 90-х років, інформаційні показники досліджених мікросателітних локусів значно вищі: 5,5 алеля в локусі, PIC=0,72 (табл. 3). Виявлене звуження генетичного різноманіття генотипів сояшника, які використовуються для створення сучасних українських гібридів, можливо пояснити такими причинами: 1) отримання нових батьківських ліній завдяки близько спорідненим схрещуванням; 2) недостатнє залучання до селекційного процесу генотипів-представників дикорослого сояшника.

Таблиця 3

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

Локус	Кількість алелів		Індекс поліморфності	
	лінії селекції 90-х років*	досліджені інбредні лінії	лінії селекції 90-х років*	досліджені інбредні лінії
<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
середнє	5,5	3	0,72	0,48

Примітка: * – згідно з нашими попередніми дослідженнями [2]

З двадцяти восьми досліджених гібридів для двадцяти чотирьох отриманих унікальних сполучень алелів. Гібриди селекції IP Етюд та Сівер, а також Ковчег та Ной не відрізняються за алелями 11 проаналізованих мікросателітних локусів. Перелічені гібриди мають у своєму родоводі одну й ту саму батьківську лінію. Різниця між парами зазначених гібридів виявлена лише за локусом *ORS 78*. Враховуючи отримані дані, можливо запропонувати виключення локусів *ORS 3*, *ORS 595* та *Ha 1608* з обов'язкового набору для проведення ДНК-типуювання при реєстрації гібридів соняшника без втрати ідентифікаційної спроможності. Взагалі, ефективність розробленої раніше маркерної системи для виявлення генетичного різноманіття ліній та гібридів соняшника сучасної селекції треба визнати недостатньою. Причина цього полягає, на наш погляд, не в недоліках окремих маркерів, а в особливостях сучасної селекції соняшника. Необхідним є продовження роботи з пошуку мікросателітних локусів з високими показниками інформаційної цінності.

Висновки

За допомогою поліалельних монолокусних мікросателітних маркерів оцінено генетичне різноманіття гібридів соняшника української та зарубіжної селекції, які зареєстровані та дозволені до поширення в Україні останніми п'ятьма роками. Виявлено звуження генетичного різноманіття генотипів соняшника, які використовуються для створення сучасних українських гібридів. Запропоновано виключення трьох мікросателітних локусів з маркерної системи для проведення ідентифікації та реєстрації гібридів, а також пошук нових високополіморфних мікросателітних локусів для доповнення цієї системи.

Література

1. Солоденко А., Саналатий А., Сиволап Ю. Идентификация генотипов подсолнечника с помощью микросателлитных маркеров // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 15–19.
2. Саналатий А., Солоденко А., Сиволап Ю. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью SSRP-маркеров // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 4. – С. 37–43.
3. Методичні рекомендації. 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. – О.: ТОВ «Зовнішрекламсервіс», 2004. – 14 с.
4. Спосіб ідентифікації генотипів соняшника. Деклараційний патент на винахід № 2003109739. Заявник – Південний біотехнологічний центр. Автори – Сиволап Ю. М., Солоденко А. Є., Трояновська А. В. – Отримано 16.08.2004. – Бюл. № 8.
5. Paniego N., Eschaide M., Munoz M., Fernandez L., Torales S., Faccoi P., Fuxan I., Carrera M., Zandomeny R., Suarez E. and Hopp H. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Genome. – 2002. – N 45. – P. 34–43.

А. Е. Солоденко

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины,
ул. Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина,
e-mail: genome2006@mail.ru

**МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА**

Резюме

Определены аллельные характеристики 28 гибридов, приведенных в Реестрах сортов растений Украины 2006–2008 гг., и 13 инбредных линий подсолнечника по 11 микросателлитным локусам. Показан незначительный уровень генетического разнообразия исследованных инбредных линий подсолнечника украинской селекции: в среднем выявлено 3 аллеля в локусе, индекс полиморфности 0,48. Из 28 исследованных гибридов для 24 получены уникальные сочетания аллелей.

Ключевые слова: подсолнечник, генетическое разнообразие, микросателлитные маркеры.

A. Solodenko

South Plant Biotechnology Center NAAS of Ukraine,
Ovidiopolskaya st., 3, Odesa, Ukraine, e-mail: genome2006@mail.ru

**SSR-MARKERS USED IN SUNFLOWER LINES AND HYBRIDS GENETIC
DIVERSITY INVESTIGATION**

Summary

Allelic characteristics of 11 microsatellite loci of 28 hybrids and 13 inbred lines of sunflower were determined. Low level of genetic diversity of investigated Ukrainian breeding lines were obtained: 3 alleles in locus and PIC 0,48. The unique alleles composition was obtained for 24 hybrids from 28 studied hybrids.

Key words: sunflower, genetic diversity, microsatellite markers.