

ГЕНОМ РОСЛИН І «МОЛЕКУЛЯРНА СЕЛЕКЦІЯ»

Ю.М. Сиволап

Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН

Висвітлена динаміка розробки технології визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських рослин за допомогою ПЛР-аналізу. Визначені системи ПЛР-маркерів, які дозволяють вирішувати ряд проблем генетики і селекції рослин. Проведено розподіл молекулярних маркерів на групи, виділено найбільш поширені.

Молекулярні маркери, RAPD, ISSR, IRAP, REMAP, SSR, молекулярно-генетичний поліморфізм, ДНК-технології

Прогрес в селекції рослин залежить від рівня дослідження геному, організації і мінливості ДНК. Наприкінці ХХ століття створені ДНК-технології поліпшення рослин, які суттєво змінили сучасне рослинництво. Швидкими темпами зростає площа генно-модифікованих сортів рослин, а класична селекція суттєво модернізована за рахунок використання молекулярних маркерів. У Південному біотехнологічному центрі УААН розроблені технології використання ДНК-маркерів, які впроваджені в генетико-селекційних дослідженнях.

Дослідження генома рослин почалися з формування самого поняття в 20-х роках минулого століття професором ботаніки Гамбурського університету Хансом Вінклером. Особливе значення вивчення генома набуло після відкриття молекулярного носія генетичної інформації і побудови подвійної спіралі ДНК. У 1944 році Евері, Макледод і МакКарті показали, що діючим початком в генетичній трансформації пневмококів є ДНК. Проте було потрібно майже 10 років напружених досліджень, щоб показати, яким чином в молекулі ДНК кодується генетична інформація. Для встановлення матеріального носія спадкової інформації необхідно було об'єднати арсенал біохімії, біофізики і генетики. Уотсон і Крик в 1953 році запропонували модель двоспіральної структури ДНК, яка блискуче показала, як функціонує генетична система на молекулярному рівні і як працює ген у клітині, здійснюючи синтез білка.

1953 рік можна назвати початком епохи молекулярної генетики, хоча сам термін уживався і раніше. До 1953 року геном досліджувався за допомогою традиційних генетичних і цитогенетичних методів. Після 1953 року прогрес у вивченні генома багато в чому залежить від аналізу організації ДНК.

Успіхи в дослідженні геному в останні десятиріччя сприяли створенню ДНК-технологій поліпшення рослин [1]. ДНК-технології складаються з двох напрямів: 1) генно-модифіковані, або біотехнологічні сорти рослин, отримані з використанням методів генної інженерії; 2) молекулярні маркери, що склали основу так званих MAS (marker assisted selection) – добір з використанням маркерів, або MAB (marker assisted breeding) – селекція з використанням молекулярних маркерів. Крім того, молекулярні маркери широко використовуються в дослідженні систематики видів і розподілу згідно генетичних взаємовідносин генотипів рослин, маркування агрономічно важливих ознак, прогнозу гетерозису та ін.

За 12 років комерційного використання біотехнологічних рослин їх загальна площа досягла в 2007 році 114,3 мільйона гектарів. У 2007 році генно-модифіковані рослини вирощували 11 індустриальних і 12 країн, що розвиваються, всього 23 країни. З 1996 до 2007 року площа під генно-модифікованими (ГМ) культурами збільшилася в 67 разів. Основними біотехнологічними культурами є соя, кукурудза, бавовник і ріпак, які займають 29 % світових посівів цих культур. В 2006 році серед ГМ рослин соя – 62%, кукурудза – 22%, бавовник – 11%, ріпак – 5%. ГМ соя займає 59% всієї площі сої в світі, бавовник – 27%, кукурудза – 13%, ріпак – 18%. Офіційної інформації щодо розповсюдження генно-модифікованих сортів рослин в Україні немає, але за неофіційними даними значна частина посівів сої і продуктів харчування з цієї культури містять генні конструкції.

Ставлення до генно-модифікованих рослин в світі неоднозначне, в основному, на наш погляд, через можливість великих фінансових збитків хімічними концернами, що випускають інсектициди та інші засоби захисту рослин і через неготовність деяких країн конкурувати на світовому ринку з сортами і продукцією генно-інженерних компаній, де лідирують США. Для захисту аграрного ринку країни Об'єднаної Європи оголосили мораторій на вирощування рослин з генними конструкціями і споживання їх продуктів, чим на декілька років стримали розповсюдження ГМ рослин і продуктів у Європі. Але вже у 2007 році 8 країн ОЄ вирощували трансгенну кукурудзу на площі 100 000 гектарів.

Використання молекулярних маркерів не мало таких проблем, як

генно-модифіковані рослини. По-перше, на цей час широко почали використовуватися біохімічні білкові маркери, які визначили основні напрями застосування в генетиці і селекції рослин [2]. Досить часто білкові маркери відносять до молекулярних, так як білки є молекулами. Білкові і ДНК-маркери мають спільні риси, але їх відрізняє те, що ДНК-маркери, або геномні, дозволяють безпосередньо отримати інформацію про особливості генотипу, в той час як в більшості випадків при використанні білкових маркерів необхідно застосовувати методи генетичного аналізу. Білкові і ДНК-маркери доповнюють арсенал методів аналізу геному рослин. Найбільше поширення ДНК-технології отримали після впровадження ПЛР-аналізу, який дозволив широко досліджувати молекулярно-генетичний поліморфізм. Особливістю ПЛР-аналізу є : можливість роботи з невеликою наважкою зразків, незалежність від стадії розвитку рослин, охоплення практично всього геному, можливість створення необмеженої кількості маркерів, можливість роботи з будь-якою тканиною рослини, автоматизація процесу множення ДНК, можливість аналізу великої кількості зразків одночасно, швидкість одержання результатів, наявність комп'ютерних програм обробки даних.

Генетичні маркери для ПЛР аналізу повинні відповідати наступним вимогам: бути високополіморфними і мати високий рівень генетичної гетерозиготності; послідовності мішені повинні легко і специфічно ампліфікуватися; методи для детекції алельних варіантів мають бути нескладними і надійними; необхідні популяційні дані з частот генотипів для оцінки дискримінаційної сили маркерів та ймовірності помилкового збігу; маркерні системи повинні незалежно успадковуватися для того, щоб частоти, отримані від однієї маркерної системи, могли бути помножені на отримані від інших маркерних систем, підвищуючи в такий спосіб дискримінаційну силу маркерів. Незалежне успадкування відбувається, коли маркери знаходяться на різних хромосомах чи у рівнозначному зчепленні на одній хромосомі.

З 1992 року Південним біотехнологічним центром УААН вперше в СНД розпочато розробку технології визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських рослин за допомогою ПЛР-аналізу [3]. За цей час визначені системи ПЛР-маркерів, які дозволяють вирішувати ряд проблем генетики і селекції рослин. Молекулярні маркери розділені на дві групи - кодомінантні, монолокусні, поліалельні і доміантні, полілокусні, біалельні. Найбільш поширеними кодомінантними маркерами є мікросателіти, які використовуються в SSRP-аналізі. Кодомінантні маркери використовуються для ідентифікації і ресстрації сортів, визначення генетичної чистоти і ти-

повості ліній, сортів, гібридів, лабораторної апробації посівів, маркування простих і кількісних ознак та ін. Полілокусні системи (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP) дозволяють дослідити в порівняльному аналізі значну кількість локусів, що представляють усі фракції генома. Завдяки таким особливостям домінантні полілокусні системи молекулярних маркерів знайшли застосування у визначенні генетичних дистанцій і розподілу сортів за рівнем генетичної спорідненості, відновленні родоводу, визначенні ідентичності зразків, маркуванні агрономічних ознак та ін.

Моно- і полілокусні маркерні системи доповнюють одне одного в вирішенні проблем селекційного поліпшення рослин.

В селекційному процесі значне місце відводиться характеристиці вихідного матеріалу. Колекційні розсадники досить часто містять отримані різними шляхами і з різних джерел зразки, які потребують поглибленого вивчення. В практиці вітчизняної селекції відомі випадки, коли лінії кукурудзи американського походження розповсюджувались під назвою ВІР 44, ВІР 38, ВІР 40, ВІР 43 та інші. Близькі генотипи одного походження мали різні назви (Білоцерковська 198 і Миронівська 264). Для розподілу сортів в залежності від генетичного споріднення вперше були застосовані довільні RAPD-маркери і кластерний розподіл згідно програми UPGMA. Побудовані за даними ПЛР-аналізу дендрограми надають інформацію про генетичні взаємовідносини між дослідженими зразками і це дає можливість виключити із селекційних програм близькоспоріднені або ідентичні форми. Система кластерного розподілу NJ-Tree (метод найближчих сусідів) надає дані про можливе походження генотипів.

RAPD-маркери являють всі фракції генома і дозволяють отримати інформацію про мінливість не окремих ділянок, а більшої частини генома, що важливо для визначення генетичних взаємовідносин у порівняльному аналізі. Окремим ділянкам генома характерний різний темп дивергенції і еволюції. Тому для порівняння видів чи сортів набуває важливості інтеграційна картина мінливості генетичного матеріалу. В той же час ця зручна система, яка не потребує даних про послідовність нуклеотидів матричної ДНК, не завжди дозволяє отримати відтворені між різними лабораторіями дані. Це заважає співставленню даних, отриманих в різних умовах. Наступною розроблена система ISSR-аналізу з більш строгим критерієм реакції, яка дозволяла отримати дані, що могли бути відтворені в умовах різних лабораторій. Прогрес у дослідженні організації генома дозволив розробити принципово нові полілокусні маркери, що базуються на мінливій частині ретротранспозонів. У багатьох видів рослин ретротранспозони

складають більше 50% генома, відносяться до повторюваної фракції і дослідження їх перспективні для генетико селекційної роботи. На основі ділянки LTR-ретротранспозонів створені IRAP-маркери, які стали значним прогресом у визначенні молекулярно-генетичного поліморфізму.

Найбільш ефективною на сьогоднішній день полілокусною системою ПЛР-аналізу є REMAP, де використовуються мікросателіти і ретротранспозони (табл. 1). В результаті REMAP-аналізу сорти ячменю поділені на ярі і озимі, шестирядні і дворядні [4].

Таблиця 1.

Порівняльна характеристика IRAP REMAP ПЛР-аналізу ячменю

Назва методу	Кількість (пар) праймерів	Кількість ПЛР-локусів	Кількість поліморфних ПЛР-локусів	Рівень поліморфізму (%)
IRAP	9	143	84	58,7
REMAP	9	156	105	67,4

За допомогою полілокусних маркерів у ПБЦ І.А. Балашовою [5] здійснено маркування генетичних систем – *Vrn*, *Ppd*, *Vrd*, *Eps* (*per se*), які контролюють чутливість до яровизації, фотоперіоду, тривалості яровизаційного споживання та скоростиглість м'якої пшениці. А.С. Солоденко проаналізовано поліморфізм довільно ампліфікованої ДНК 35 видів та підвидів роду *Helianthus* [6]. Порівняльний аналіз спектрів ампліфікації дозволив визначити генетичні дистанції між різними *Helianthus sp.* Отримана схема, що відбиває генетичні зв'язки між дикорослими *Helianthus sp.* та представниками культурного *Helianthus annuus*. Розподіл видів у цілому відповідає морфологічному поділенню даного роду на секції. Представники *Helianthus annuus* (інбредні лінії соняшнику) сформували окремий кластер в межах групи видів секції *Helianthus*. Також, відзначено, що селекційні лінії відрізняються одна від іншої більше, ніж представники різних підвидів *Helianthus praecox* – *H. praecox rungonii* та *H. praecox hirtus*. Найбільш близькі до *Helianthus annuus* види – *H. laetiflorus*, *H. salicifolius*, *H. bolandery*, *H. petiolaris*, *H. tuberosus* – можливо розглядати як вірогідних донорів господарсько цінних ознак для культурного соняшнику. Однією із задач цього дослідження було встановлення систематичного положення видів, що не надані у морфологічній класифікації Schilling (1981) та класифікації за ДНК-маркерами. Базуючись на даних аналізу поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК, *H. macrophyllus*, *H. scaberimus*, *H.*

multiflorus та *H. trachelifolius* можливо віднести до серії *Corona-Solis* (секція *Divaricati*). Молекулярно-генетичні методи, зокрема, аналіз генетичних дистанцій, що розраховані на підставі даних поліморфізму ДНК, показали свою корисність при характеристиці селекційного матеріалу. Так, використання ПЛР з 11-ма одиничними праймерами дозволило класифікувати 30 інбредних ліній соняшнику селекції Селекційно-генетичного інституту (м. Одеса) згідно ступеню генетичної віддаленості. Визначене чітке розподілення ліній на групи материнських та батьківських форм. Угрупування ліній відповідало інформації про їх педігрі. Отримані дані свідчать про придатність ПЛР-аналізу для дослідження генетичної варіабельності генотипів соняшнику та можливості використання таких даних в селекційних програмах. Розподіл за рівнем генетичної спорідненості здійснений ПБЦ для сортів пшениці, ячменю, сорго, ліній кукурудзи.

Мікросателітні, або SSR-маркери використовуються для визначення генетичної одноманітності сорту, типовості ліній, ідентифікації сорту. Визначення сорту за вимогами UPOV здійснюється за морфологічними ознаками згідно DUS-тесту. В США і ряді інших країн, як допоміжний, впроваджений метод ідентифікації з застосуванням молекулярних і білкових маркерів. На прояв фенотипових морфологічних ознак можуть впливати умови вирощування, що ускладнює диференціацію і ідентифікацію сортів, особливо за умов їх близької спорідненості. Необхідні два-три роки польових спостережень для морфологічної ідентифікації сорту. Білкові маркери не завжди диференціюють генотипи (сорта, лінії) через обмеженість представництва генів, що їх кодують. Найбільш ефективним підходом для ідентифікації генотипів є ПЛР-аналіз з використанням мікросателітів. Мікросателітні локуси відносяться до кодомінантних тандемних варіабельних за кількістю повторів послідовностей нуклеотидів ДНК. Вони монолокусні і поліалельні, що дозволяє розробити систему ідентифікації генотипів за алельним станом. Аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму шляхом визначення алельного стану мікросателітних локусів є основою диференціації і реєстрації сортів. У Південному біотехнологічному центрі УААН розроблена методологія реєстрації сортів, ліній і гібридів важливіших видів сільськогосподарських рослин за ДНК-типунням. ПБЦ спільно з Держслужбою з охорони прав на сорти рослин України видано науково-методичний посібник з ідентифікації і реєстрації сортів за ДНК-типунням [7].

Першим етапом є добір мікросателітних локусів, що поліморфні для даної культури. Для диференціації і ідентифікації сортів більшості культур необхідно мати панель з 12-15 високо варіабельних мікросате-

літних локусів. Локуси кодуються буквами латинського алфавіту, де нижній індекс являє молекулярну масу алелю. На основі ДНК-типуювання за 12-15 локусами складається генетична формула, яка є унікальною для даного генотипу. Генетичні формули наглядно ілюструють особливості генетичної структури сортів. За ДНК-типуюванням можливо ідентифікувати сорт у будь-якій фазі розвитку при використанні різної тканини: насіння, листа, коріння, стебла. Розроблені генетичні формули для сортів пшениці, ячменю, сорго, ліній і гібридів кукурудзи і соняшнику. На відміну від DUS-тесту, за ДНК-типуюванням можливо ідентифікувати не тільки лінії, а й гібриди. При ДНК-типуюванні простого гібрида і однієї лінії, можливо встановити генетичну формулу іншої лінії. При наявності банку даних ДНК-типуювання значно спрощується встановлення новизни сорту. Термін визначення новизни сорту скорочується з двох трьох років польових досліджень до двох місяців лабораторної роботи. Ідентифікація і реєстрація сортів за ДНК-типуюванням набуває актуальності в умовах вступу України до СОТ, де одними з умов реєстрації сортів є їх одноманітність. Більшість сортів пшениці української селекції за даними ПЛР-аналізу не є одноманітними, а представлені декількома генотипами. Стратегія сортів популяцій характерна для періоду колишнього СРСР, коли ареал розповсюдження деяких сортів сягав мільйонів гектарів і один і той самий сорт вирощувався в різних еколого-географічних зонах. Світова практика показала, що максимальний урожай і контрольовану якість зерна можливо отримати від одноманітних сортів - ліній, які вирощуються на невеликих площах. В Україні вже створюються такі сорти. Сорт Українка одеська з формулою

A₁₂₂B₁₂₀C₁₄₇D₁₉₃E₁₀₇F₁₉₂G₂₁₆H₁₁₇I₁₃₁J₁₆₃K₁₉₂M₂₀₄N₁₄₀O₁₇₈

відповідає вимогам UPOV щодо одноманітності.

Економічна криза в Україні привела до того, що декілька селекційних центрів стали практичними монополістами в розповсюдженні сортів, і ми повертаємось до ситуації колишнього СРСР, коли окремі сорти займали мільйони гектарів, а середній урожай у два-три рази менший, ніж в країнах Європи, де лінійні сорти займають відносно невеликий ареал і максимально реалізують генетичний потенціал урожайності. Сорти ячменю не такі гетерогенні, як сорти пшениці, і за даними ПЛР-аналізу більшість з них може бути зареєстрована в країнах ОЄ.

За молекулярними маркерами встановлюється не тільки однама-

нітність сорту, а й алейний стан окремих агрономічно важливих генів. Так, в ПБЦ О. Стратула розроблена технологія визначення алейного стану гена β -amy1, який пов'язаний з пивоварними якостями ячменю [8]. І. Петровою запроваджений аналіз алейного стану гена Wx в популяції пшениці, який дозволяє до колосіння і до утворення зерна визначити генотип і сприяє добору тільки необхідних за алейним станом рослин для гібридизації [9]. Це значно скорочує термін і масштаби селекційної роботи.

Сучасною біотехнологією створені нові методи поліпшення рослин, які здатні підвищити ефективність традиційної селекції. Необхідні спільні селекційно-біотехнологічні програми та їх фінансування.

Бібліографічний список

1. *Сиволап Ю.М.* Геном растений и его улучшение . – К.: Урожай, 1994. – 192 с.
2. *Созинов А.А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука. 1985. – 272 с.
3. *Сиволап Ю.М., Вербицкая Т.Г., Кожухова Н.Е.* и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научно-методическое руководство). К.: Аграрна наука, 1998. – 160 с.
4. *Брик А.Ф., Календар О.Н., Стратула О.Р., Сиволап Ю.М.* IRAP-REMAP-анализ сортов ячменя одесской селекции. //Цитология и генетика. - Т.40. – №3. – 2006. – С. 24-33
5. *Балашова И.А., Файт В.И., Сиволап Ю.М.* Маркирование генов отвечающих за скорость развития озимой мягкой пшеницы. //Материалы Международной научной конференции “Молекулярная генетика, геномика и биотехнология”. 24-26 ноября 2004 г. Минск, Беларусь.- 2004. – С. 30
- 6.*Сиволап Ю.М., Солоденко А.Э., Бурлов В.В.* RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника.// Генетика. –1998. – Т.34. – N 2. – С. 266-271
7. *Сиволап Ю.М., Волкодав В..В, Бальвинська М.С., Кожухова Н.Е.* та ін. Ідентифікація і реєстрація генотипів пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшнику за допомогою аналізу мікросателітних локусів (Методичні рекомендації). – Одеса, 2004. – 14 с.
8. *Стратула О.Р., Сиволап Ю.М.* Аллельные характеристики гена β -амилазы сортов ячменя Украины // Цитология и генетика. – Т. 40. – № 4. – 2007. – С. 20 -26
9. *Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М.* Идентификация Wx –генотипов среди сортов озимой пшеницы // Цитология и генетика. – Т.41. –№ 88. – 2007. – С. 11-17.

Описана динамика разработки технологии определения молекулярно-генетического полиморфизма сельскохозяйственных растений с помощью ПЦР-анализа. Определены системы ПЦР-маркеров, которые позволяют решать ряд проблем генетики и селекции растений. Произведено разделение молекулярных маркеров на группы, выделены наиболее распространенные.

Elaboration of the technology for estimation of molecular-genetical polymorphism of agricultural plants by means of PCR-analysis is described. Systems of PCR-markers which permit to solve some problems in relation of plant genetics and breeding are determined. Molecular marker`s grouping is made and the most wigely spread markers are identified.