

УДК 577.2:631

Ю.М. СИВОЛАП

Южный биотехнологический центр НААН Украины, Одесса

E-mail: genome2006@mail.ru

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И СЕЛЕКЦИЯ

*Достижения современной биотехнологии позволяют существенно модернизировать традиционную селекцию растений. Использование молекулярных маркеров значительно сокращает объемы селекционного материала и способствует отбору генотипов с желаемыми генами в гомозиготном состоянии. Разработаны системы маркирования агрономически важных простых и количественных признаков при помощи моно- и полилокусных систем. В ЮБЦ НААН созданы и апробированы маркеры типа и темпа развития, аллелей генов запасных белков, Wx-генов, генов короткостебельности и др. Большое значение для систематизации источников зародышевой плазмы и защиты прав селекционеров имеет разработанная в ЮБЦ технология использования ДНК-типирования для идентификации и регистрации сортов.*

### Введение

Вторая «зеленая революция», основанная на широком применении современной биотехнологии, оказала заметное влияние на агропромышленный комплекс и привела к более эффективному использованию возобновляемых ресурсов и энергии. Возник термин «биоэкономика», которая базируется на применении научных достижений в биологии.

В мире происходит тотальная биотехнологизация. Движущими силами этого процесса являются потребность в энергии и сырье, а также необходимость решать экологические проблемы, с которыми сегодня сталкивается цивилизация. Возможности бурного развития такого направления экономики в последнее время появились благодаря впечатляющему развитию

биологических наук. По данным и прогнозам экспертов Евросоюза, в 2010 г. объем секторов экономики, где ключевыми являются биотехнологии, достиг примерно 2 трлн евро. Многие страны разработали национальные программы развития биоэкономики. В Китае, в частности, принята программа, в которой ставится задача довести объем национальной биоэкономики в 2015 г. до 200 млрд долларов, а к 2020 г. — до 500 млрд долларов, и стать одним из основных мировых лидеров в этом направлении.

Впечатляющие успехи генной инженерии в фармакологической индустрии и растениеводстве, а также резонансно неоднозначное отношение ряда стран к генетически модифицированным растениям оставили в тени успешно развивающуюся биотехнологию, связанную с использованием ДНКовых или молекулярных маркеров.

Сцепленное наследование признаков и генетическую рекомбинацию между ними обнаружил Томас Морган, что явилось основой хромосомной теории наследственности, отмеченной Нобелевской премией. Развитие теории и выявление групп сцепления привело к созданию понятия о генетических маркерах, одной из сфер применения которых стала селекция растений.

Традиционный селекционный процесс затратен по материальным ресурсам и времени: на создание сорта уходит 12–15 лет и более. Не все сорта являются результатом научных программ, а выдающиеся генотипы, родоначальники сортов, часто выявлены среди множест-

ва анализируемых в селекционном процессе рекомбинантов. В век интернета, нанотехнологий и биотехнологии, ускорения научного прогресса во многих областях деятельности человека такие темпы и объемы селекции растений не соответствуют уровню науки XXI века [1]. В практике селекции нашли применение достижения генетики, статистики, физиологии, биохимии, однако селекционный процесс во многом остается эмпирическим. Пропасть между «искусством селекции и генетикой», о которой писал Н.И. Вавилов, может быть существенно уменьшена за счет современных биотехнологий, которые определили пути модернизации селекции и повышению в ней доли научного компонента. Благодаря прогрессу в исследовании молекулярной организации и изменчивости генома разработаны маркерные технологии, способствующие значительному повышению эффективности и ускорению процесса создания новых сортов. С помощью молекулярных маркеров в расщепляющейся популяции выявляются генотипы, несущие гены устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам, необходимого качества продукции и других агрономически важных признаков, а остальные растения могут быть выбракованы.

Благодаря маркерному раннему выявлению необходимого сочетания в одном генотипе генов или их аллелей уменьшаются сроки создания сортов. Обнаружение желательного генотипа до цветения растения позволяет вовлечь его в скрещивание, не дожидаясь полного созревания или проведения последующего гибридологического анализа, что сокращает каждый цикл селекционного процесса на один год. Экономический эффект от применения молекулярных маркеров в растениеводстве по прогнозу Andreas Binder (Базельский университет), высказанному на International Biosafety Workshop в Киеве, может составить около 15 млрд долларов в год. Затраты на проведение анализов ДНК нескольких тысяч растений на начальных этапах селекции перекрываются выгодой от уменьшения масштабов и сокращения сроков селекции. Составной частью экономии является бюджет (1–2 млн гривен в год) селекционного подразделения за 5–7 лет, на которые укорачивается период создания сорта.

Генетический маркер может быть короткой последовательностью ДНК, фланкирующей пару оснований (однонуклеотидный полиморфизм, SNP), небольшим фрагментом (SSR) или протяженным участком, как в случае минисателлитов. Генетические маркеры должны быть легко идентифицированы, связаны с конкретным локусом и полиморфными.

Наибольшее распространение маркерные технологии в растениеводстве Украины получили после внедрения ПЦР-анализа [2], который позволил в селекционных масштабах исследовать молекулярно-генетический полиморфизм. Примечательной особенностью ПЦР-анализа является возможность работы с небольшим количеством образцов, независимость от стадии развития растений, охват практически всего генома, возможность создания неограниченного количества маркеров и работы с любой тканью растения, автоматизация процесса умножения ДНК, одновременный анализ большого количества образцов, скорость получения результатов, наличие компьютерных программ обработки данных.

Молекулярные маркеры можно подразделить на две основные группы – кодоминантные, монолокусные, полиаллельные и доминантные, полилокусные, биаллельные. Наиболее распространенными кодоминантными маркерами являются микросателлиты, используемые в SSRP-анализе. Кодоминантные маркеры рекомендуются для идентификации и регистрации сортов, определения генетической чистоты и типичности линий, сортов, гибридов, лабораторной апробации посевов, маркировки простых и количественных признаков и др. В селекционном процессе кодоминантные маркеры позволяют в  $F_2$  выявить растения с доминантной гомозиготой по нужному гену и элиминировать генотипы с гетерозиготой и рецессивной гомозиготой (рис. 1), т.е. приблизительно 75 % расщепляющейся популяции.

При отборе по нескольким маркерным генам выбраковке подлежат 90–94 % растений и в третьем поколении анализируются генетически детерминированные генотипы. Таким образом, с третьего поколения селекционный материал сокращается на 75–94 %, что приводит к значительной экономии и позволяет задействовать большее количество комбинаций скрещивания.

Особенностью полилокусных систем (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP) является возможность одновременного анализа большого количества локусов, представляющих различные фракции генома. Участки генома, представленные разными генами (или последовательностями нуклеотидов), дивергировали и эволюционировали с различной скоростью, поэтому для фило- и феногенетических оценок важно иметь интегрированное представление об изменчивости генома, которое складывается из данных о вариабельности многих локусов. Доминантные полилокусные системы молекулярных маркеров нашли применение в установлении филогенетических взаимоотношений, распределения сортов по уровню генетического родства, восстановлении родословной сортов, определении идентичности образцов, маркировании агрономических признаков и др. Моно- и полилокусные маркерные системы дополняют друг друга в решении проблем селекционного улучшения растений.

Определились направления использования маркеров, генерируемых в результате ПЦР. В генетике это исследование филогенетических взаимоотношений между дикими видами, донорами агрономически ценных признаков, и культурными растениями, нахождение сцепления между признаками и продуктами амплификации, а также картирование признаков [3], в селекции — распределение селекционного материала в зависимости от уровня генетической удаленности, контроль агрономически важных генов в селекционном процессе, подбор родительских форм для создания высокогетерозисных гибридов, создание линий с повышенной продуктивностью путем объединения генотипов с небольшими генетическими дистанциями, отбор на ранних этапах селекции растений с желательным сочетанием генов. Сформировалась так называемая маркерная селекция — MAB (marker assisted breeding), а также маркерный отбор — MAS (marker assisted selection) [4]. В семеноводстве это дифференциация, идентификация и регистрация сортов, линий, гибридов, установление типичности, определение уровня гибридности, лабораторная апробация на соответствие посева сортовому документу. Большое значение приобретает ДНК-идентификация и

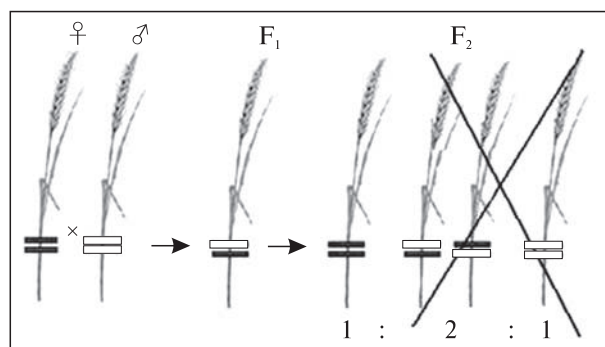


Рис. 1. Негативный отбор по одному маркеру в  $F_2$  с помощью геномного маркера

паспортизация при регистрации сортов и для защиты авторских прав селекционеров [5].

### Создание маркера

Выбор маркерной системы зависит от задачи исследования, наличия лабораторного оборудования и информации о последовательности нуклеотидов соответствующего района генома. Для создания маркера необходим определенный генетически детерминированный материал. Им могут служить близко изогенные линии (NIL), рекомбинантные инбредные линии (RIL) или расщепляющаяся популяция.

Полилокусные системы обладают преимуществом большего охвата генома, но из-за доминантной природы во втором поколении невозможно дифференцировать генотипы с доминантной гомозиготой и гетерозиготой. В этом случае требуется анализ растений следующего поколения. Выявление растений доминантной гомозиготы в  $F_2$  возможно при использовании кодоминантных монолокусных маркеров типа микросателлитов (рис. 2).

Важным условием целенаправленного использования генетического маркера является его локализация на хромосоме, т.е. создание генетической карты сцепления, представляющей собой одномерные схемы и отражающей порядок взаимного расположения генетических маркеров на индивидуальных хромосомах. Полученные при этом значения расстояний между ними могут не соответствовать реальным физическим расстояниям. Это связано с тем, что эффективность рекомбинации между хроматидами на отдельных участках хромосом может различаться. Она подавлена в гетеро-

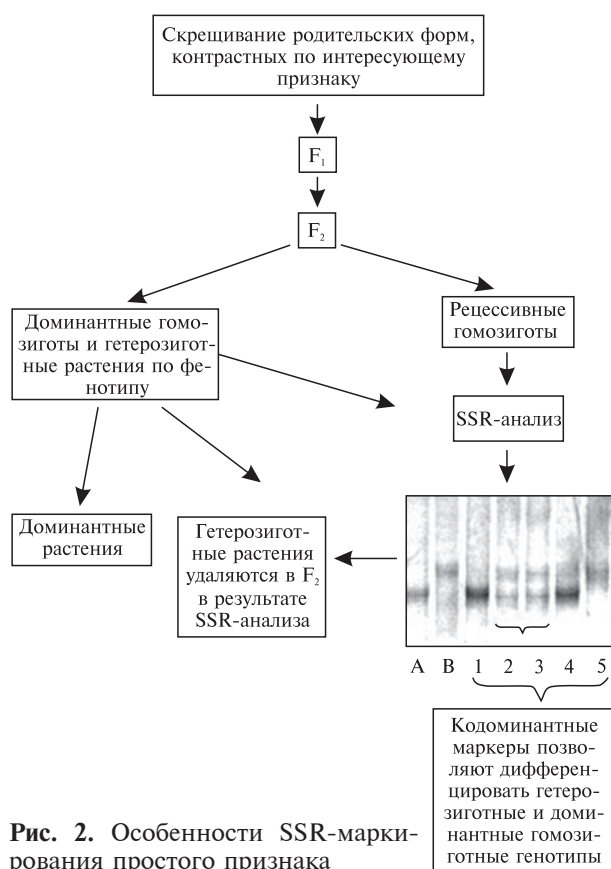


Рис. 2. Особенности SSR-маркирования простого признака

хроматиновых участках, в то время как в хромосомах встречаются «горячие точки» рекомбинации.

Наиболее распространенным методом построения генетических карт является определение частоты рекомбинации по двух- или трехфакторным анализирующим скрещиваниям. Генетические карты позволяют локализовать сложные генетические маркеры (например, ассоциированные с устойчивостью к заболеваниям) на первых этапах исследования и дают возможность их дальнейшего изучения.

Обязательным условием является выбор генетически различных родителей, у которых детектирован полиморфизм. При отсутствии полиморфизма сегрегационный анализ и картирование невозможны. Если необходима информация о положении на карте определенного признака (например, устойчивость или восприимчивость к патогену), родители должны быть полиморфными по этому признаку. Наблюдаемая частота рекомбинации (т.е. появ-

ления новых, отличных от родительских комбинаций аллелей) численно равна проценту рекомбинантного потомства, образуемого в скрещивании.

Линейное расположение сцепленных локусов образует так называемую группу сцепления – все группы сцепления представляют собой генетическую карту. При постепенном добавлении маркеров в карту количество групп сцепления в итоге совпадает с числом хромосом.

В настоящее время сконструированы карты для важнейших видов культурных растений – пшеницы, ячменя, риса, подсолнечника, кукурузы и др.

Большинство агрономически ценных признаков являются количественными, их генетический контроль – полигенный, а фенотипическое проявление непрерывно, что значительно усложняет селекционный процесс. Исследование генетики количественных признаков получило заметное развитие в конце 80-х годов прошлого века в связи с применением ДНК-технологий и использованием молекулярных маркеров. С построением молекулярных карт большой плотности и геномного картирования стало доступным маркирование генов, влияющих на количественные признаки. Известно три основных типа локусов, контролирующих изменения количественных признаков. В проявлении количественных признаков участвуют олигогены, полигены и гены-модификаторы. Локусы количественных признаков, представляющие главные гены (олигогены), оказывают плейотропное влияние на другие признаки [6]. Различие в аллелях полигенов оказывает небольшой эффект на признак [7]. Экспрессия главных генов может быть модифицирована генами-модификаторами [8]. Аллели с большим эффектом способствуют выявлению локусов как главных генов, в то время как сегрегация аллелей с небольшим эффектом показывает количественное различие [9].

Гены, которые вносят небольшой вклад в изменчивость количественного признака, называют множественными факторами, или полигенами [10]. Если группа их находится в одной хромосоме, то они ведут себя как один ген. При кроссинговере в хромосоме они могут отделяться и проявлять себя как самостоятельные модификаторы количественного признака.

Исследования показали, что между главными генами и полигенами существуют переходные формы т.е. любые изменения генетической структуры сказываются на значении количественного признака [11].

В Украине первые работы по молекулярно-генетическому маркированию QTL растений выполнены в Южном биотехнологическом центре [12, 13] в результате взаимодействия между молекулярной биологией и генетикой количественных признаков растений. Появилась возможность с помощью маркерного генетического анализа устанавливать место и влияние генов, контролирующих количественные признаки. QTL, которые имеют большой эффект и которыми объясняется большая часть варьирования, могут быть анализированы генетически как главные гены. К статистическому анализу вариации добавились прямые исследования QTL и возможность работать непосредственно с ними, анализируя маркерные локусы.

Использование маркеров значительно повышает эффективность менделевского подхода к генетическому анализу популяции, в частности, выявлению вклада отдельных хромосом, их участков и локусов, что определяет общий спектр изменчивости признака [14]. Работы, направленные на изучение генетической природы количественных признаков, можно условно разделить на три направления: 1) проверка информативности маркерных систем: различные схемы селекционного опыта, взаимодействие генотип – среда и, как следствие, разработка математических методов для повышения такой информативности [15–17]; 2) картирование и маркирование непосредственно количественных признаков (показатели продуктивности, устойчивости к болезням, стрессам и т.п.), изучение действия генов [18–20]; 3) использование разработанных карт и молекулярных маркеров для отбора хозяйственно ценных генотипов, повышения их устойчивости, продуктивности, адаптивности, контроль за трансгрессией генетического материала [21, 22]. В гетерозисной селекции при создании линий проводится отбор ценных генотипов с оптимальным сочетанием маркерных аллелей и удаление генотипов с неблагоприятными для развития признака сочетаниями.

При ПЦР-маркировании локусов количественных признаков на основе анализа расщепляющейся популяции подбираются праймеры, детектирующие полиморфизм у родителей, которые являются контрастными по изучаемым признакам. В  $F_2$  и последующих поколениях происходит анализ сцепления и выявление маркеров локусов, определяющих развитие этих признаков. После проверки надежности связи ДНК-маркеров с локусами количественных признаков они могут быть использованы для отбора.

**Маркерная селекция**

Маркерный отбор основан на идентификации генотипов с помощью ДНК-маркеров, тесно сцепленных с интересующим признаком, и дальнейшем использовании этих растений для скрещивания в селекционных программах. Близкое сцепление означает, что маркеры фланкируют целевой ген(ы) с удалением не более 5 сМ при нулевой рекомбинации.

### Маркерная селекция

Применение ДНК-маркеров агрономически ценных признаков минимизирует затраты на полевые анализы. Вместо отбора по фенотипическому проявлению признака отбирают по ДНК-маркеру. Если отбор в расщепляющейся популяции проводится по нескольким маркированным генам, то выявится около 6 % растений, содержащих сочетание анализируемых генов в доминантном гомозиготном состоянии, и остальная часть популяции будет выбракована.

MAS применяется как для моногенных, или качественных, так и олигогенных, полигенных (QTL), признаков, а также может быть использована для пирамидирования главных генов признака [23, 24] при получении сортов с улучшенными свойствами.

Пирамидирование (рис. 3) используется для комбинирования в одном генотипе агрономически важных генов (устойчивость к специфическим патогенам, короткостебельность, гены запасных белков и др.), его трудно осуществить традиционными методами.

Расширение масштабов использования MAS-технологии является важным резервом повышения эффективности селекции. Причинами медленного внедрения MAS в селекцию является отсутствие ресурсов (оборудования, реактивов), недостаточная интеграция молеку-



Рис. 3. Схема пирамидирования

лярной генетики в практическую селекцию и отдаление процессов создания маркера и генетического картирования от практической селекции, проблемы надежности маркеров QTL, отсутствие взаимопонимания между молекулярными биологами и селекционерами.

Для широкого внедрения MAS-технологий необходимо создание комплексных селекционно-биотехнологических программ, предусматривающих скрининг больших популяций. С методической стороны перспективна технология использования микрочипов. Первым шагом на этом пути является конверсия традиционных молекулярных маркеров в «неэлектрофоретический» формат. В случае SSR-маркеров необходимо перевести полиморфную полосу-фрагмент амплифицированного участка с охарактеризованной последовательностью — в SCAR-маркер, позволяющий за короткий срок скринировать большое количество образцов.

Серьезной проблемой является эффективность затрат на создание и использование маркеров. Стоимость ПЦР-анализа одного образца пшеницы или ячменя по одному маркеру колеблется от 0,5 до 5 долларов США [25].

Если маркеры простых признаков достаточно надежны, то QTL могут зависеть от генетической среды (генофона) и условий выращивания. В этой связи маркер может быть эффективен для определенной популяции.

В ЮБЦ созданы и апробированы маркеры ряда агрономически ценных генов: типа и темпа развития пшеницы [26–29], качества запасных белков [30], аллелей β-амилазы [31], *Wx*-генотипов [32], короткостебельности [33], устойчивости к болезням [34–36] и др. С помощью маркерных систем уточнено проис-

хождение новой формы (вида) сорго соризо *Sorghum orizoidum* [37], генетической близости фенотипически сходных сортов пшеницы Белоцерковская 198 и Мироновская 264, линий кукурузы А344 и ВИР44 [38].

### ДНК-типирование, идентификация и регистрация сортов

В связи с интенсификацией селекции приобретает большое теоретическое и практическое значение каталогизация источников зародышевой плазмы. Дифференциация и идентификация сортов, линий, гибридов сельскохозяйственных растений является важным элементом селекции и семеноводства, а также актуальной в теоретическом и практическом плане задачей генетических исследований. Определение сорта растений необходимо как в селекционно-семеноводческой практике, так и при защите прав оригинатора сорта. Традиционно сорта растений характеризуются фенотипическими показателями. Международным союзом по защите новых сортов растений (Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV) предложен и используется в странах — членах этой организации DUS-тест (distinct, uniform, stable), который учитывает при описании сорта такие критерии, как отличимость, однородность, стабильность. В связи с перспективами, которые открыты молекулярной генетикой для определения генотипов, возникла возможность использования молекулярных маркеров для идентификации и регистрации сортов сельскохозяйственных культур. DUS-тест имеет ряд существенных недостатков, связанных с использованием фенотипических (морфологических) признаков, необходимостью изучения растений в течение нескольких вегетационных периодов и др. Для идентификации по фенотипическим признакам растений сорта необходимо их вырастить до полной спелости. Значительной проблемой является установление с помощью фенотипических тестов особенностей структуры сорта, а также генетического однообразия линий и типичности гибридов. Маркерные системы на основе ДНК-профилирования являются более эффективными, чем традиционные морфологические и белковые (изоферментные или иные) маркеры. Морфологические сравнения имеют такие

ограничения, как субъективность в анализе признака, влияние на признак условий выращивания или техники обработки, неспособность выявления различий между генотипами близкородственного происхождения, возможность тестирования только на стадии взрослых растений и др.

Преимуществами ДНК-маркеров является независимость последовательности ДНК организма от природных условий, наличие одной и той же ДНК в каждой клетке растения, что позволяет проводить исследования любой ткани, потенциальная возможность получения неограниченного количества информативных ДНК-маркеров и возможность анализа практически всего генома.

В генетическом плане сорт представляет собой генотип (или комбинацию генотипов), который по своим признакам отличается от других групп растений. Генотип характеризуется таким набором аллелей, который уникально дифференцирует организм или группу генетически однородных организмов от других.

В ЮБЦ НААН разработан метод идентификации генотипов растений по ДНК-типированию. Предложена молекулярно-генетическая формула сорта, где тестируемый переменный локус кодируется латинской буквой, а в нижнем индексе приводится молекулярная масса аллеля.

Формула состоит из двух частей. Одна — дифференцирующая, которая позволяет идентифицировать сорт, линию или гибрид. Во второй содержатся данные об аллельном состоянии агрономически важных генов. Формула дает представление о генетической структуре сорта, соответствии сорта требованиям UPOV по однообразию.

Определение сорта с помощью ДНК-технологии имеет несравненно большую производительность, возможность объективной оценки данных, тестирование на всех этапах онтогенеза и другие преимущества по сравнению с традиционными методами, основанными на фенотипическом анализе. Использование 12–15 SSR-локусов позволяет уникально дифференцировать и идентифицировать сорта ячменя, пшеницы, кукурузы, сои, сорго, хмеля и других культур.

Однородность тоже определяется в этой

системе маркеров. Если сорт состоит из нескольких генотипов, они отличаются аллельным составом. В этом случае сорт — комбинация генотипов, каждый из которых отличается по молекулярной массе аллелей, и сорт-популяция характеризуется локусами, имеющими несколько аллелей, для которых желательно определять частоту встречаемости каждого в сорте-популяции.

В DUS-тесте не предусмотрена регистрация гибридов. Система кодоминантных молекулярных маркеров в состоянии фиксировать генотип гибрида.

Для определения новизны сорта сопоставляется молекулярно-генетическая формула с имеющимися в информационной базе данными. ДНК-типирование может занять несколько недель (в зависимости от используемого оборудования и однородности сорта) вместо двух-трех лет полевых испытаний согласно DUS-тесту.

На основании результатов SSR-анализа сорта создается его генетический (молекулярно-генетический) паспорт, являющийся документом, который удостоверяет отличительные особенности профиля ДНК сорта, линии, гибрида. Профиль ДНК — специфическое распределение фрагментов ДНК продуктами амплификации в электрофоретическом геле либо пиков на денситограмме. Молекулярно-генетический паспорт отражает особенности структуры ДНК сорта, линии, гибрида, которые позволяют его идентифицировать.

#### Молекулярно-генетические формулы сортов пшеницы Фантазия и Одесская 267

##### Фантазия

A<sub>78,80</sub> B<sub>186,192</sub> C<sub>143,147</sub> D<sub>191</sub> E<sub>204</sub> F<sub>192</sub> G<sub>134,140</sub> H<sub>126</sub> I<sub>178</sub> J<sub>101,129</sub>  
 K<sub>143,163</sub> L<sub>192,01</sub> M<sub>133</sub> N<sub>216</sub> O<sub>168</sub> P<sub>368</sub> Q<sub>270</sub> R<sub>237</sub> S<sub>254</sub> T<sub>389</sub> U<sub>308</sub> V<sub>775</sub>  
 W<sub>450</sub> X<sub>250</sub> Y<sub>820</sub> Z<sub>208</sub>

##### Одесская 267

A<sub>78</sub> B<sub>190</sub> C<sub>141</sub> D<sub>191</sub> E<sub>204</sub> F<sub>192</sub> G<sub>142</sub> H<sub>134</sub> I<sub>178</sub> J<sub>101</sub> K<sub>137</sub> L<sub>301</sub> M<sub>133</sub> N<sub>216</sub>  
 O<sub>168</sub> P<sub>369</sub> Q<sub>264</sub> R<sub>0</sub> S<sub>0</sub> T<sub>309</sub> U<sub>308</sub> V<sub>775</sub> W<sub>450</sub> X<sub>250</sub> Y<sub>820</sub> Z<sub>208</sub>

Буквы А–N кодируют микросателлитные локусы: А — Xgwm3; В — Xgwm18; С — Xgwm155; D — Xgwm165; E — Xgwm190; F — Xgwm261; G — Xgwm325; H — Xgwm357; I — Xgwm408; J — Xgwm437; K — Xgwm577; L — Xgwm631; M — Xgwm680; N — Taglgap. Буквы О–Z ко-

дируют локусы агрономически важных генов. Аллельный состав запасных белков пшеницы глиадинов Gli-A1 – O, Gli-B – P, Gli-D – Q, генов короткостебельности Rht-B1 – R, Rht-D1 – S, вакци генов Wx-A1 – T, Wx-B1 – U, Wx-D1 – W, генов пуриноидинов Pina-D1 – X, Pinb-D1 – Y и генов типа развития Vrn-D1 – Z.

Как видно из приведенных формул, сорт Фантазия является гетерогенным, состоящим из нескольких генотипов. Сорт Одесская 267 представлен одним генотипом и по показателю однородности отвечает требованиям UPOV.

В ЮБЦ создается информационная база молекулярно-генетических данных сортов, линий, гибридов важнейших сельскохозяйственных культур. В 2004 г. изданы методические рекомендации «Идентификация и регистрация генотипов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), ячменя (*Hordeum vulgare* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при помощи микросателлитных локусов» [39], которая утверждена техническим советом Института экспертизы сортов Госслужбы по охране прав на сорта.

Преимущества ДНК-технологии в идентификации сортов сельскохозяйственных культур:

1) значительное сокращение сроков установления новизны, однородности, стабильности сортов или кандидатов в сорта (с 2–3 лет до нескольких недель);

2) молекулярно-генетический паспорт сорта – реальный инструмент защиты авторских прав селекционеров;

3) молекулярно-генетический анализ позволяет идентифицировать сорт сельскохозяйственных растений в любой стадии развития (зерно, лист, корень, стебель), что является значительным преимуществом перед DUS-тестом;

4) анализ данных ДНК-типирования сортов, представленных в виде генетических формул, позволит оценить особенности селекции в отдельные периоды.

Внедрение в практику ДНК-типирования и идентификации сортов сельскохозяйственных растений, создание информационной базы сортов важнейших видов сельскохозяйственных растений является серьезной государственной проблемой. Решение ее позволит сократить расходы на определение новизны сорта и его регистрацию.

Yu.M. Sivolap

Южный биотехнологический центр

НААН Украины, Одесса

E-mail: genome2006@mail.ru

#### MOLECULAR MARKERS AND BREEDING

The achievements of modern biotechnology can significantly improve traditional plant breeding. The use of molecular co-dominant markers significantly reduces the amount of breeding material and facilitates selection of genotypes with desirable genes in a homozygous state. The systems of molecular marking of agronomically important simple and quantitative traits with the help of monolocus- and multiloci markers have been developed. The number of markers of type and rate of development, storage protein genes, Wx-gene, short stem genes, and others have been created and validated in SPBC NAAS. Developed in the SPBC technology of DNA-typing for the varieties identification and registration is of great importance for systematization of germplasm sources and protection of breeders rights.

Ю.М. Сиволап

#### МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ТА СЕЛЕКЦІЯ

Досягнення сучасної біотехнології дозволяють істотно модернізувати традиційну селекцію рослин. Використання молекулярних кодомінантних маркерів значно скорочує обсяги селекційного матеріалу і сприяє відбору генотипів з бажаними генами в гомозиготному стані. Розроблено системи маркування агрономічно важливих простих та кількісних ознак за допомогою моно- і полілокусних систем. У ПБЦ НААН України створено та апробовано маркери типу і темпу розвитку, алелів генів запасних білків, Wx-генів, генів короткостебловості та ін. Велике значення для систематизації джерел зародкової плазми і захисту прав селекціонерів має розроблена в ПБЦ технологія використання ДНК-типуння для ідентифікації та реєстрації сортів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sivolap Yu. Microevolution and development theory and practice of plant improvement //Molecular Phylogenetics : 2<sup>nd</sup> Inter. Conf. – Moscow, 2010. – P. 69.
2. Сиволап Ю.М., Вербицкая Т.Г., Кожухова Н.Э. и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : Науч. метод. руководство. – Киев : Аграр. наука, 1998. – 156 с.
3. Сиволап Ю.М. Геном рослин в генетико-селекційних дослідженнях // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : Зб. наук. пр. – Київ : Логос, 2007. – Том 1. – С. 168–172.



4. Ruane J., Sonnino A. Marker-assisted selection as a tool for genetic improvement of crops, livestock, forestry and fish in developing countries: an overview of the issues // Marker-assisted selection/FAO. – Rome, 2007. – P. 3–15.
5. Сиволап Ю.М. ДНК-типирование, идентификация и регистрация сортов сельскохозяйственных сортов в Украине // Геном рослин : 36. наук. статей VI Міжнарод. конф. – Одеса, 2010. – С. 54.
6. Barton N. Pleiotropic models of quantitative variation // Genetics. – 1990. – **124**. – P. 773–782.
7. Mather K. Variation and selection of polygenic characters // J. Genet. – 1941. – **41**. – P. 159–193.
8. Mukai T., Cockerham C. Spontaneous mutation rates at enzyme loci in *Drosophila melanogaster* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1977. – **74**. – P. 2514–2517.
9. Robertson D.S. A possible technique for isolating genomic DNA for quantitative traits in plants // J. Theor. Biol. – 1985. – **117**. – P. 1–10.
10. Mather K. The genetical theory of continuous variation // Hered. Suhl. – 1949. – **5**. – P. 1020–1035.
11. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. – Минск : Высшейш. шк., 1974. – С. 192–193.
12. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Нецветаев В.П., Чапля А.Е. Маркерный анализ некоторых QTL ячменя с помощью RAPD и изоферментов // Цитология и генетика. – 1997. – **31**, № 4. – С. 39–45.
13. Доменюк В.П., Белоусов А.А., Сиволап Ю.М. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // Цитология и генетика. – 2002. – **36**, № 6. – С. 9–15.
14. Beaumont V., Rocherford T. Comparison of RAPD and RFLP markers for mapping  $F_2$  generation in maize // Theor. Appl. Genet. – 1996. – **93**. – P. 606–612.
15. Jannink J.-L., Jansen R. Mapping epistatic quantitative trait loci with one – dimensional genome searches // Genetics. – 2001. – **157**. – P. 445–454.
16. Аксенович Т.И., Свищева Г.Р., Аульченко Ю.С. Картирование генов, детерминирующих количественные признаки животных : Метод разложения дисперсий // Генетика. – 2000. – **36**, № 7. – С. 986–993.
17. Hayes P.M., Liu B.H., Knapp S.J., Chen F. Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germplasm // Theor. Appl. Genet. – 1993. – **87**. – P. 392–401.
18. Sene M., Thevenot C., Hoffmann D., Benetrix F., Causse M., Prioul L. QTLs for grain dry milling properties, composition and vitreousness in maize recombinant inbred lines // Theor. Appl. Genet. – 2001. – **102**. – P. 591–599.
19. Austin D., Lee M., Veldboom L., Hallauer A. Genetic mapping in maize with hybrid progeny across testers and generations: grain yield and grain moisture // Crop Sci. – 2000. – **40**. – P. 30–39.
20. Duple C.M., Melchiger A.E., Kuntze L., Stork A., Lubberstedt T. Molecular mapping and gene action of Scm1 and Scm2, two major QTL contribution to SCMV resistance in maize // Plant Breed. – 2000. – **119**, № 4. – P. 299–303.
21. Ajmone Marsan P., Monfredini G., Ludwig W., Melchinger A., Pagnotto G., Motto M. RFLP mapping of QTL for grain yield and agronomic traits // Maize Genetics Cooperation Newsletter. – 1994. – № 68. – P. 13–14.
22. Ribaut J., Jiang C., Gonzales-de-Leon D., Edmeades G., Hoisington D. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize // Theor. Appl. Genet. – 1997. – **94**. – P. 887–896.
23. Lubberstedt T., Melchinger A., Schon C., Utz H., Klein D. QTL mapping in testcrosses of European flint lines of maize. 2. Comparison of different testers for forage quality traits // Crop Sci. – 1997. – **37**. – P. 1913–1922.
24. Wang X.Y., Chen P.D., Zhang S.Z. Pyramiding and marker-assisted selection for powdery mildew resistance genes in common wheat // Acta Genet. Sin. – 2001. – **28**, № 7. – P. 640–646.
25. Wang J., Chapman S.C., Bonnett D.G., Rebetzke G.J., Crouch J. Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection // Crop Sci. – 2007. – **47**. – P. 582–588.
26. Van Sanford D., Anderson J., Costa J. et al. Discovery and deployment of molecular markers linked to Fusarium head blight resistance : An integrated system for wheat and barley // Crop. Sci. – 2001. – **41**. – P. 638–644.
27. Balashova I.A., Sivolap Yu.M., Fait V.I., Stelmakh A.F. Application of the RAPD-method for creation of DNA-markers to *Vrn* genes // Cytology and Genetics. – 2001. – **35**, № 2. – P. 49–53.
28. Балашова И.А., Файт В.И., Сиволап Ю.М. Маркирование гена *Ppd-D1a* методом ISSR-ПЦР // Вісн. Одес. нац. ун-ту. – 2002. – **7**, вип. 1. – С. 100–104.
29. Сиволап Ю.М., Балашова І.А., Завіша Є.К. Спосіб оцінки рослин озимої м'якої пшениці з *Vrd 1* генотипом. Деклараційний патент на корисну модель. № 13466, 2006.
30. Завіша Є.К., Файт В.І., Балашова І.А., Сиволап Ю.М. Маркування генів скоростиглості *per se* озимої м'якої пшениць // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : 36. наук. пр. – К., 2007. – Т. 1. – С. 33–37.
31. Polishchuk A.M., Chebotar S.V., Blagodarova E.M., Kozub N.A., Sozinov I.A., Sivolap Yu.M. Analysis

- of common wheat varieties and near isogenic lines by PCR with allele specific primers for *Gli-1* and *Glu-3* loci // *Cytology and Genetics*. – 2010. – **44**, № 6. – P. 22–33.
32. *Stratula O.R., Sivolap Yu.M.* Allelic characteristics of  $\beta$ -amylase gene of the Ukrainian barley varieties // *Cytology and Genetics*. – 2007. – **41**, № 4. – P. 20–25.
33. *Petrova I.V., Chebotar S.V., Rybalka A.I., Sivolap Yu.M.* Identification of *Wx* genotypes in the winter wheat varieties // *Cytology and Genetics*. – 2007. – **41**, № 6. – P. 11–17.
34. *Chebotar S.V., Börner A., Sivolap Yu.M.* Analysis of the dwarfing genes in the genotypes of bread wheat cultivars of Ukraine // *Cytology and Genetics*. – 2006. – **40**, № 4. – P. 12–23.
35. *Kozhukhova N.E., Sivolap Yu.M., Varenik B.F., Sokolov V.M.* Marking of the loci encoding maize resistance to *Fusarium* // *Cytology and Genetics*. – 2007. – **41**, № 2. – P. 37–41.
36. *Галаєв О.В., Бабаянц Л.Т., Сиволап Ю.М.* Ідентифікація і мікросателітне маркування гена стійкості до твердої сажки, інтрогредованого з *Aegilops cylindrica* в генах м'якої пшениці : Зб. наук. пр. СГІ-НЦНС. – 2009. – Вип. 13 (53). – С. 30–36.
37. *Солоденко А.Е., Трояновська А.В., Сиволап Ю.М.* Спосіб детекції генотипів соняшника, стійких до вовчка. Патент на корисну модель № 56691. 25. 01.2011.
38. *Shevchuk A.Yu., Kozhukhova N.E., Sivolap Yu.M.* Molecular analysis of the genotypes of sorghum cultivated in Ukraine // *Cytology and Genetics*. – 2009. – **43**, № 2. – P. 47–53.
39. *Сиволап Ю.М., Галаєв А.В., Нестерець В.Г.* Дифференциация и идентификация сортов пшеницы и тритикале при помощи ДНК-типирования // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів*. – 2004. – **2**, № 1. – С. 3–15.
40. *Сиволап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвінська М.С., Кожухова Н.Е., Солоденко А.Є., Чеботар С.В.* 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 : *Метод. рекомендації*. – Одеса, 2004. – 14 с.

Поступила 09.11.11