

*Centothecoideae, Chloridoideae, Arundinoideae u Danthonioideae* может означать, что период существования общего предка РАССАD был очень продолжительным.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант ) и Программы «Динамика генофондов».

### Литература

Ванюшин Б.Ф. Энзиматическое метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия. 2005. Т. 70. № 5. С. 598–611.

Красильников Е.М., Родионов А.В. Филогенетические отношения рода *Quillaja* с другими таксонами порядков *Rosales* и *Fabales* по результатам сравнительного исследования ядерных ITS и районов *trnL-trnF* и *psbA-trnH* генома хлоропластов // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Часть 3. Петрозаводск, 2008. С. 42-45.

Ней М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев: КВІЦ. 2004. 418 с.

Носов Н.Н., Родионов А.В. Молекулярно-филогенетическое изучение взаимоотношений между некоторыми представителями рода *Poa* L. (*Poaceae*) по результатам сравнения последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 И ITS2 ядерных генов 45S Р-РНК // Ботан. Журн. 2008. Т. 93. №12

Родионов А.В., Тюпа Н.Б., Ким Е.С. и др. Геномная конституция автотетраплоидного овса *Avena macrostachya*, выявленная путем сравнительного анализа последовательностей ITS1 и ITS2: к вопросу об эволюции кариотипов овсов и овсюгов на ранних этапах дивергенции видов рода *Avena* // Генетика. 2005. Т. 41. N. 5. С. 646-656.

Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя// Биохимия. 2007. Т.72. № 12. С. 1690 – 1699.

Grebenstein B., Roser M., Sauer W., Hemleben V. Molecular phylogenetic relationships in *Aveneae* (*Poaceae*) species and other grasses as inferred from ITS1 and ITS2 rDNA sequences // Plant Syst. Evol. 1998. Vol. 213. P. 233--250.

## СИВОЛАП Ю.М,

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН

Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога , 3, e-mail: genome2006@mail.ru

### МІКРОЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМУ І СЕЛЕКЦІЯ РОСЛИН.

Селекція є могутнім фактором підвищення врожайності сільськогосподарських рослин. Рівень і ефективність селекції залежить від розвитку біологічних наук і, перш за все, генетики - науки про спадковість і її мінливість. Уявлення про мінливість і еволюцію живої природи формувалось впродовж всієї історії розвитку природознавства. Відомі роботи Емпедокла, Арістотеля, Ламарка, але засновником еволюційної теорії в біології вважається Ч. Дарвін. З часу виходу в світ чудової книги «Походження видів шляхом природного відбору» дискусії з питань еволюції набули систематичного характеру і продовжуються у наш час. Розвиток генетики дозволив поглибити розуміння процесів мінливості і доповнити еволюційні уявлення формуванням синтетичної теорії еволюції.

Мікроеволюція, сукупність еволюційних процесів, що протікають в межах окремих або суміжних популяцій виду, що приводять до зміни генетичної структури цих популяцій, виникнення відмінностей між організмами і утворення нового виду. Вважається, що мікроеволюція пов'язана з розповсюдженням на внутрішньовидовому рівні в популяції малих змін в частотах алелів серед декількох поколінь.

Традиційна селекція переважно базується на внутрішньовидовій мінливості, тому пізнання особливостей варіабельності ДНК виду має теоретичне і практичне значення.

**Розмір геному.** Інтеграційним показником видової мінливості є вміст ДНК в ядрі клітки. Кількість ДНК в хромосомах ядер кліток різних видів рослин варіює 1000 кратно. Вважається, що вміст ДНК в ядрі характеризує вид. В той же час, роботами М.Беннета (1,2), Е.Бойко і др (3) були показані істотні достовірні внутрішньовидові міжсорткові відмінності змісту ДНК в ядрі, які за даними останніх авторів складала для *Zea mays* 7-9%, *Secale cereale* 5-15%, *Triticum aestivum* 2-21%. Виявилось, що геном не є статичним місцем зберігання і реалізації генетичної інформації, а його структура достатньо високо динамічна навіть в межах виду

Внутрішньовидова мінливість геному отримала пояснення після робіт Р.Бріттена по кінетиці реасоціації ДНК, що дозволила виявити окремі фракції генома. В результаті аналізу вторинної структури ДНК геном еукаріот представлений у вигляді трьох фракцій, що розрізняються по кількості копій і функціям виконуваним в генетичній системі клітки. Встановлено, що фракції генома дивергували і еволюціонували з різною швидкістю. Найбільш консервативною виявилася фракція унікальної або малокопійної ДНК, до складу якої входять структурні гени. Найбільш мінливою і специфічною є фракція високих повторів, що містить мікросателіти. Оскільки основний об'єм мінливості генома доводиться на ДНК, що повторюється, Р.Бріттен запропонував розміром генома рахувати вміст ДНК в унікальній фракції. У подальшому цей підхід одержав назву «кінетичний розмір генома». Дослідження розміру генома в 70-х роках минулого століття доповнились аналізом фракцій генома і окремих генів.

Представляє безперечний інтерес виявити зв'язок між мікроеволюцією на геномному рівні і розвитком теорії і практики селекції рослин.

**Унікальна (малокопійна) ДНК.** Мінливість структурних генів може відбуватися за рахунок мутацій, дуплікацій, рекомбінацій, дрейфу генів і ін. Види сільськогосподарських рослин представлені численними сортами, що розрізняються за багатьма агрономічними показниками. Багато економічно важливих ознак є полігенними, що складаються з окремих структурних генів. Аналіз внутрішньовидової мінливості, мікроеволюції, важливий для розуміння селекційного процесу. Селекція рослин, що базується на мінливості і добору оперує багатьма генами. В даній роботі розглянемо ряд генів, аналіз яких сприяє поліпшенню рослин в Україні.

У ПБЦ досліджені гени, що кодуєть важливі агрономічні ознаки рослин. Так, І.А.Балашовою (4) досліджені гени, **контролюючі тип і темп розвитку *Vrn (5L) - Vrn A1, Vrn B1, VrnD1***. У *Vrn A1*- виявлено три алельні варіанти: **a, b, c**. Поліморфізм детектований в промоторній зоні гена (інсерції). Генотипи моногенно домінують по *Vrn B1* - дворучки. У рецесивного і домінують алелів транскрибуєма зона відрізняється однією нуклеотидною заміною. Передбачається наявність гена *Vrn 4* (можливо алельна форма *Vrn B1*) і гена *Vrn 5* - відомий тільки один носій даного гена, лінія Chinese Spring/Hope 7B.

Група генів *Vrn-2 (Vrn-A2, VrnD2)* ортологічні генам *Vrn-1*. Локалізовані в хромосомах 4-групи. Мутації в цих генах приводять до зменшення яровізаційної чутливості.

**Гени темпу розвитку *PpdA1, PpdB1, Ppd D1***. Генотипи, носії *PpdA1* по фенотипічному прояву ознаки слабо відрізняються від генотипів, рецесивних по *ppd*. ДНК-аналіз за даними локусами не виявив поліморфізму у генотипів, контрастних по алельному стану *PpdA1*. *PpdB1* значно менше поширений ніж *PpdD1a*. Висловлене припущення, що для даного гена можливий множинний алелізм. Виходячи з наявних даних, алель 222 п.н. детектується у ярих *PpdB1*-генотипов, алель 212 п.н. - у озимих *PpdB1*-генотипов, алелі 206, 208 п.н. у носіїв рецесивних алелів *ppd*. Для *Ppd D1* поліморфізм не встановлений, але за даними аналізу поліморфізму ДНК, можна припустити наявність декількох алельних форм даного гена.

Допускається, що *Vrd* гени алельні рецесивним генам *vrn* (Майстренко О.І). *Vrd 1* імовірно локалізується в 4А хромосомі. ДНК-маркер до *Vrd1* (нуль- алель 280-) детектує у лінії Capelle-Desprez/4А Безоста 1 (носії домінантного *Vrd1*). *Vrd 2* локалізується в 5D хромосомі. Як маркер розглядається WMS 292 (5D ), який розташований у області локалізації гена *VrnD1* (4 сМ). WMS 292 пропонувався як маркер до *VrnD1* (Snare at al.). Хромосомна локалізація *Vrd 3* чітко не встановлена. Виявлено два QTL (*Eps* гени), що впливають на скоростиглість *per se* і локалізовані в прицентромерних районах *2B, 5DL, 3A,4B, 4D,6B, 6D*. Мікросателітні локуси *Xgwm 512(2AS)* і *Xgwm 429 (2DS)* маркують відповідно, 10.4 % - 8.9% мінливості аналізуємої ознаки. Отримані маркери пропонується для добору скоростиглих генотипів на ранніх етапах селекційної роботи.

Проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм ДНК ярих та озимих генотипів ячменю з праймером *NS-1*, дизайн якого розроблено за даними секвенування фрагменту кДНК, гомологічного ділянці промотору гену *Hva1* холодного стресу, експресія якого індукується білком *Cbf2*. У озимих генотипів ячменю детектується амплікон 480 п. н., відсутній у ярих сортів. Припущено, що ген *Hva1* присутній у ярих та озимих генотипів в альтернативному алельному стані. Поліморфний продукт 480 п. н. може розглядатись як потенційний ДНК-маркер до гена *Hva1*. Детектовано за допомогою ПЛР з праймерами *Cbf2ASA/Cbf2S4A*, дизайн яких розроблено за сіквенсом фрагменту гену *Cbf2* ячменю, поліморфізм між ярими та озимими сортами ячменю і пшениці.

На пивоварні якості ячменю впливає низка ферментів, серед яких найважливішим є  **$\beta$ -амілаза**. Ендоспермальна  $\beta$ -амілаза кодується геном  $\beta$ --*amy1*, який локалізований на довгому плечі хромосоми 4Н. Використання певної ділянки послідовності цього гена як маркера, дозволяє ідентифікувати три різних алеля  $\beta$ -амілази. Алельний склад сортів ячменю досліджений О. Стратула.(5). Алель (516 п.н.) пов'язаний з хорошими солодовими властивостями і характерний для пивоварних сортів. Алель (643 п.н.) пов'язаний з ознакою низької активності  $\beta$ -амілази і означає, що сорт бідний солодовими властивостями. Специфічна ділянка гена  $\beta$ --*amy1*, використована як якісний маркер при ПЛР і може забезпечити цінний механізм відбору сортів, придатних для подальшого використання в селекційних програмах на пивоваренність.

Крохмаль - основний запасний вуглевод зерна пшениці. Ключовим ферментом синтезу амілози в гранулах крохмалю є фермент ***GBSS1 (granule-bound starch synthase =ADP glucose starch glycosyl transferase, EC2.4 1.21=GBSS1)***, який називають *Wx* протеїном. *Wx* протеїни кодуються генами з відповідною назвою *Wx*. Дані гени ідентифіковані і локалізовані у пшениці Nakamura et al [1993] *Wx-A1 (7AS)*, *Wx-B1 (4AL)*, *Wx-D1(7DS)*. Локуси *Wx* протеїнів мають функціональні алелі, що кодують синтез певного *Wx* протеїну, і не функціональні (нуль) алелі, блокуючі даний синтез. *Wx-A1* локус має чотири функціональних алеля і один - нуль алель. Мутація даного локуса виражається в делеції в послідовності 23 п.н. в екзоні 1 з подальшою інверсією фрагмента 4 п.н. *Wx-B1* має п'ять активних і один неактивний алель. *Wx-D1* представлений чотирьма активними і одним нуль алелем. У останнього делетований фрагмент ДНК на 3 кінці. розміром 588 п.н. Зерно *Wx* пшениці (з нульовим вмістом амілози в крохмалі) має значно більший відсоток зруйнованих крохмальних гранул при помелі, на відміну від зерна звичайної пшениці. Створення сортів пшениці з блокованим синтезом амілози має велике значення для отримання біоетанолу, харчових загусників, замороженого тесту і ін. У Південному біотехнологічному центрі І.В.Петровою (6) впроваджена технологія детекції і контролю *Wx-генів* в генотипах озимої м'якої пшениці за допомогою ПЛР-аналізу. Дана технологія використана в генетико-селекційних дослідженнях при селекції форм м'якої пшениці з низьким або нульовим змістом амілози.

С.В.Чеботар встановлена алельна характеристика пуринодолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* для 22 сортів м'якої пшениці. 21 сорт має алелі *Pina-D1a*; *Pinb-D1b*, що характерні для сортів твердозерної хлібопекарської пшениці. Цим же автором виявлений алельний стан генів короткостебловості *Rht8*, *Rht-B1* і *Rht-D1*, оцінені ефекти алелів гена *Rht8* на агрономічні ознаки для низки українських сортів м'якої пшениці. Встановлено, що сорти м'якої пшениці СГІ часто містять комплекс або, так звану, піраміду генів карликовості - *Rht8c*, *Rht-B1b*, *Rht-D1b*.

Серед проміжних за частотою повторюваності ДНК особу увагу привертають рибосомні гени. Рибосомні цистрони були виділені і піддані аналізу раніше багатьох інших генів вищих організмів. Продукти цих генів складають більшість клітинної РНК і були першими типами РНК, які вдалося виділити в кількості достатньому для аналізу. У різних видів рослин кількість рибосомних генів варіює від 570 у *Arabidopsis thaliana* до десятків тисяч у *Triticum aestivum*.

Хромосоми *1B* і *6B* м'якої пшениці містять до 90% генів рРНК. У ячменю варіанти повторюваних одиниць рДНК знаходяться в двох незв'язаних локусах на 6 і 7 хромосомах. Район ядерцевого організатора, який містить гени 18S і 26S рРНК у кукурудзи знаходиться на короткому плечі шостої хромосоми, а у жита - на першій хромосомі. Рибосомним генам властиві два типу мінливості: 1. Варіювання довжини і структури повторюваних елементів 2. Мінливість кількості копій. В межах генотипу (сорти або лінії) кількість генів рРНК генетично контролюється. В той же час, кількість рибосомних генів може змінюватися залежно від рівня метаболічної активності тканини. Розроблена методика прогнозу рівня гомеостатичності сортів ячменю за показниками мінливості рДНК. (7)

До некодуєчої ДНК, варабельність яких уявляє значний інтерес для селекції є ретротранспозони. У кукурудзи ретротранспозони складають 60% геномної ДНК Ретротранспозони не тільки відповідні за мутації в геномах рослин, але і за значне збільшення розміру багатьох геномів рослин. Завдяки впливу ретротранспозонів на гени, структуру і розмір генома вони представляють прекрасний генетичний інструмент для аналізу генома, створення карт зчеплення, дослідження філогенії і вивчення біорізноманітності. У ПБЦ розроблені високоефективні системи **IRAP**, **REMAP** використання ретротранспозонів для визначення генетичної спорідненості і диференціації сортів ячменю.(8).

Гіперваріабельні послідовності мікросателітів зустрічаються в геномах рослин досить часто, в кожному відрізьку в 6 -7 к.о. і складаються з блоків коротких тандемних повторів, основний мотив яких має довжину 2-6 п.н. Швидкості спонтанної мутації мікросателітних локусів складає близько  $10^{-2}$  -  $10^{-4}$  на локус за покоління. Дивергенція по мікросателітним локусам пов'язана з дрейфом і мутаціями. (9) Згідно з останніми даними, SSR трапляються в геномах рослин в кожній послідовності в 6-7 к.о.

Враховуючи високу варіабельність і генотипоспецифічність мікросателітів в ПБЦ розроблена високоефективна система диференціації, ідентифікації і реєстрації за молекулярно-генетичними формулами сортів важливіших сільськогосподарських культур.(10). Генотипування здійснюється за алельним складом мікросателітних локусів. Створений і поповнюється інформаційний банк даних сортів сільськогосподарських культур, що реєстровані в Україні.

За допомогою мікросателітів промарковані гени стійкості соняшника до вовчка (11), кукурудзи до фузаріїв (12), визначені нові гени стійкості пшениці до твердої сажки, що передані від егілопсів та ін. Молекулярно-генетичне дослідження мікроеволюційних процесів стало базою для розробки сучасних біотехнологій поліпшення рослин, зокрема, за допомогою молекулярних маркерів.

#### Література

1. *Bennet M.D., Gustafson J.p., Smith J.B.* Variation in nuclear DNA in the genus *Secale*.// *Chromosoma*, 1977., vol.61, p.149-176.

2. *Bennett V.D.* Plant genome values: How much do we know? //Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 March 3; 95(5): 2011–2016.
3. *Бойко Е.В., Бадаев Н.С., Фактор В.М., Сиволап Ю.М., Зеленин А.В., Бродский В.Я.* Сравнительное определение количества ДНК в ядрах клеток сельскохозяйственных злаков. // Цитология. 1985. том XXVII, №5. с. 611-614.
4. *Балашова И.А, Календарь Р.Н., Файт В.И, Сиволап Ю.М.* Создание ДНК – маркеров к локусу Vrn – D1 мягкой пшеницы.// «Биотехнология» 2002 , №2, С.30-36
5. *Сиволап Ю.М., Стратула О.Р.* Аллельные характеристики гена  $\beta$ -амилазы сортов ячменя Украины. // Цитология і генетика Т. 40 №4 2007. С 20-23
6. *Сиволап Ю.М, Чеботарь С.В, И.В. Петрова И.В., А.И. Рыбалка. А.И.* Идентификация Wx генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика т. 42 №6 2007 с. 11-18
7. *Сиволап Ю.М. Бойко О.В.* Спосіб визначення гомеостатичності форм ярового ячменю .. Авторське свідоцтво « 1684846 від 22 березня 1991г.)
8. *Брик А.Ф, Календарь Р.Н, Стратула О.Р. Сиволап Ю.М.* IRAP-REMAR-анализ сортов ячменя одесской селекции//. Цитология и генетика, Т.40, №3, 2006 . С. 24-33
9. *Ward R.D. Grewe P.* Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries // Rev. Fish Biol. And Fisheries/ 1994. V.13. P.375-380.
10. *Сиволап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвінська М.С., Кожухова Н.Е.* та ін. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum*), ячменю (*Hordeum vulgare*), кукурудзи (*Zea mays*), соняшника (*Helianthus annuus*) за допомогою аналізу мікросателітних маркерів.// Методичні рекомендації.. Одеса, 2004., 14 С.
11. *Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Толмачев В.В., Ведмедева К.В., Сиволап Ю.М.* Маркирование гена устойчивости к заразихе Or 3 у подсолнечника. //Цитология и генетика, Т.39, №5, 2005., С.9-13
12. *Кожухова Н.Е., Вареник Б.Ф., Сиволап Ю.М,* Ідентифікація локусів геному кукурудзи, що детермінують стійкість до фузаріозної гнилі / //Факторы экспериментальной эволюции организмов 2006 ., С. 113-118

#### **СТЕЛЬМАХ А.Ф., ФАЙТ В.І.**

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: fayt@paso.net*

### **НОВИЙ “ОБЕРТ СПРАЛІ” В СЕЛЕКЦІЇ ОЗИМИХ ПШЕНИЦЬ УКРАЇНИ НА АДАПТИВНІСТЬ**

Головними напрямками в селекції будь-якої сільськогосподарської культури є рівень продуктивності, якість продукції та показники адаптивності, в першу чергу пов'язані зі стійкістю до абіотичних стресів. Для більшості виробничих зон нашої країни озимі зернові культури мають суттєві переваги перед ярими за потенціалом продуктивності через значно триваліший загальний вегетаційний період і можливість більш ефективно використовувати запаси зимової вологи та уникати жаро-посушливого стресу при наливі зерна. У цілому, занесені до Держреєстру вітчизняні сорти конкурентноздатні перед іноземними як за продуктивністю, так і особливо за якістю та загальною пристосованістю. У той же час сучасні сорти, маючи суттєві переваги перед сортами 50-60-х років минулого сторіччя за потенціалом продуктивності та якості,