

правильно определить теоретические частоты фенотипических классов расщепления, что скажется на выводе о количестве расщепляющихся генов.

Гібридологічний аналіз за участю інтрогресивних ліній рослин має супроводжуватися цитологічним контролем стабільності інтрогресивних ліній та вивченням картини поведінки хромосом у М1 МКП рослин F₁. В іншому разі не можна правильно визначити теоретичні частоти фенотипних класів розщеплення і це відіб'ється на висновку про кількість генів, що расщеплюються.

The hybridological analysis involving the plant introgressive lines must be accompanied by the cytological control of the introgressive lines as to their stability and study of chromosome behavior in M1 of PMC in the F₁ hybrids. In a different way, the theoretical frequencies of the phenotype classes under segregation could not be determined correctly. It will affect on the conclusion about gene number.

ШЕРЕПІТКО Д.В., ЗЛАЦЬКА А.В.

Український інститут експертизи сортів рослин,

Україна, 03041 Київ, вул. Генерала Родимцева 15, e-mail: supervirusok@gmail.com;

zlatska@hotmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ СОРТІВ СОЇ (*Glycine max (L.) Merril*), ПРИДАТНИХ ДО ПОШИРЕННЯ В УКРАЇНІ, ЗА SSR-МАРКЕРАМИ ЗЧЕПЛЕНИМИ З ЛОКУСОМ *Rsv4*, ЩО ЗУМОВЛЮЄ СТІЙКІСТЬ ДО ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ

Серед бобових культур соя займає виняткову позицію завдяки різноманітним напрямкам її використання. Вони зумовлені в першу чергу особливістю хімічного складу насіння: разом з високим вмістом білка – від 30 до 45%, соя містить від 16,5 до 24% олії, тому з позицій енергетичної цінності соєву рослину можна назвати унікальним створінням природи. Внаслідок сприятливого поєднання таких цінних ознак соя широко застосовується як харчова, кормова і технічна рослина. Крім того, ця культура є одним з кращих попередників у сівозмінах, зважаючи на її здатність до симбіотичної азотфіксації [1]. Проте врожай та якість соєвих бобів можуть суттєво знижуватися з причин ураження посівів сої вірусними хворобами, реальну шкодочинність яких оцінити досить складно [2]. Двадцять сім вірусів з 67 відомих, що здатні репродукуватися в рослинах сої, на сьогодні вважаються потенційно небезпечними або проблемними для світової системи соєвого виробництва. Зміни в популяціях комах-переносників протягом останніх років призводять до зростання поширеності вірусів сої у світі. Слід відмітити також проблему змішаних вірусних інфекцій на сої, яка останнім часом постає найбільш гостро [3]. Не зважаючи на значні досягнення сучасної молекулярної біології та генетики в галузі вивчення механізмів взаємодії вірусу та рослини, все ще виникає набагато більше запитань ніж отриманих відповідей [4].

Вірус мозаїки сої (ВМС; рід *Potivirus*; родина *Potiviridae*) є збудником хвороби сої, яка є однією з основних та найбільш шкодочинних вірусних інфекцій цієї культури, що зустрічається в більшості регіонів світу. ВМС може спричинити значні втрати врожаю, що в деяких випадках сягають близько 90%, хоча в середньому втрати врожаю від ВМС досягають 40%, якщо рослини інфікуються перед або в період квіткоутворення. Ураження на пізніх фазах розвитку має обмежений вплив на врожай і якість зерна. Особливого значення ВМС надає його здатність до передачі з насінням, яка коливається в межах від 0 до 68%. Крім того помічено, що при ураженні ВМС зростає сприйнятливість до іншого патогенна – гриба *Phomopsis sojae* [3,5,6]. Інтенсивно досліджувалася патогенна мінливість серед ізолятів ВМС. Класифіковано різноманітні групи штамів ВМС в різних регіонах світу, проте філогенетичний взаємозв'язок між ними не встановлено. Зокрема відомо 17 штамів (SC1–

SC17) в Китаї та 5 штамів (А-Е) в Японії [7]. Є повідомлення про появу в Кореї нових ізолятів ВМС здатних долати всі відомі гени стійкості [8]. В США на основі класифікації 98 ізолятів ВМС було сформовано сім штамових груп (G1-G7), що базувалася на різній реакції визначених генотипів сої [9]. Серед світової колекції сортів сої було виявлено такі, що проявляли стійкість до ВМС. Генетичні дослідження показали, що в більшості випадків стійкість контролюється одиночним домінантним геном. На сьогодні відомо три окремі локуси *Rsv1*, *Rsv3* та *Rsv4*, що контролюють стійкість до ВМС [10]. В локусі *Rsv1*, картованому в молекулярній групі зчеплення (МГЦ) F, ідентифіковано дев'ять алелів, які забезпечують стійкість до штамів вірусу з першої (G1) по шосту (G6) групи [11]. Три алелі з локусу *Rsv3*, що знаходиться в МГЦ В2, підтримують стійкість до штамів G5- G7 [10]. *Rsv4* визначає стійкість до всіх семи штамів ВМС на ранніх стадіях розвитку рослини, проте на пізніх проявляє (затриману) сприйнятливість. Ймовірний механізм дії гену *Rsv4* пов'язують з обмеженням руху вірусу по рослині. Локус *Rsv4* картований в молекулярній групі зчеплення D1b та фланкований багатьма близько зчепленими молекулярними маркерами (SSR, ESTs) (рис.1), які можуть виступати цінним інструментом для молекулярної селекції направленої на конструювання стійких до ВМС генотипів [12].

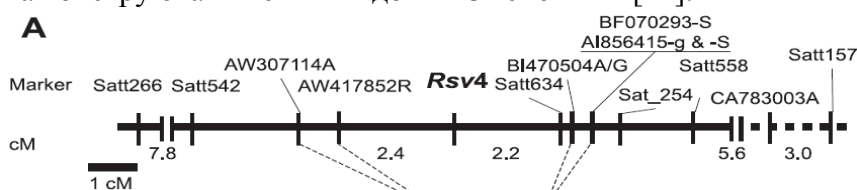


Рис. 1. Фрагмент генетичної карти D1b групи зчеплення

Використання природної генетичної стійкості є найбільш ефективним та економічно вигідним шляхом контролювання вірусних хвороб рослин. Одним із селекційних підходів направлених на досягнення множинної (ефективної) та довготривалої стійкості є поєднання різних генів стійкості в одному цільовому генотипі. Проте провести комплексні добори рослин з множинними генами стійкості на основі лише фенотипної реакції є складною задачею для селекціонера, зважаючи на епістатичний тип взаємодії між цими генами. Саме тому для ідентифікації та добору генів стійкості широко застосовуються методи молекулярно-генетичного маркування [10]. Зокрема SSR-маркери мають високу точність і відтворюваність, та характеризуються кодомінантним типом успадкування, що робить їх ідеальним інструментом для селекції. Метою нашої роботи було дослідити поліморфізм сортів сої, придатної до поширення в Україні за SSR маркерами, близько зчепленими з геном стійкості до ВМС (*Rsv4*), з метою встановлення можливості подальшого їх використання в селекційному процесі.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження виступали 20 сортів сої, занесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні та два зразки дикої сої PI 468399C та PI 339732 (*Glycine soja*). Рослини сої без видимих симптомів оцінювали як стійкі, а з проявом системного ураження як вразливі. В якості контролю використовували марковані сорти сої іноземної селекції: вразливий – Essex (*rsv*) та стійкі – V94-5152 (*Rsv4*), Columbia (*Rsv3Rsv4*). Інфікування ВМС (штами вірусу відібрано в Україні, але не ідентифіковані) проводили методом інокуляції листкової пластинки свіжим соком уражених рослин. Екстракцію ДНК проводили з семиденних проростків сої СТАВ методом [13]. Полімеразну ланцюгову реакцію SSR-маркерів проводили згідно стандартної методики [14] з температурою обпалення 50⁰С та 55⁰С для Satt542 та Satt634 відповідно. Розділення продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі та в 10% неденатуруючому ПААГ з подальшою візуалізацією за допомогою бромистого етидію.

Результати та обговорення

За результатами вивчення стійкості до ВМС двадцять досліджених нами сортів було поділено на дві групи: 11 стійких сортів та 9 вразливих (Табл.1). Оскільки лише один ген *Rsv4* забезпечує стійкість до усіх штамів ВМС, а також відомо, що локус *Rsv4* фланкований двома SSR-маркерами: з однієї сторони Satt542 на відстані 4,7cM, а з іншої-Satt634 на

відстані 2,2 сМ [12], нами було вирішено перевірити ефективність застосування цих двох маркерів для прогнозування стійкості до ВМС у сої. При дослідженні стійких сортів з геном *Rsv4* було виявлено, що для них характерна наявність алелів 122п.н. і 130п.н. мікросателіту Satt634, та 225п.н. і 210п.н. мікросателіту Satt542, а для вразливих маркерних сортів – 139п.н. маркеру Satt634 та 205п.н. маркеру Satt542 (Рис.2). При чому дика вразлива соя мала такий же алель, що і культурна за маркером Satt634, а за Satt542 – алель характерний для стійкої культурної форми. Стійка дика форма мала інший алель, лише за локусом, маркованим Satt542. Тобто алель 210п.н. Satt542 вже на цьому етапі дослідження, показав, що він нездатний повністю диференціювати вразливі та стійкі генотипи.

Таблиця 1. Результати аналізу досліджених сортів сої за алельним складом мікросателітних локусів Satt634 та Satt542

Сорт	Країна походження	Стійкість до ВМС	Розмір алеля SSR-маркера, п.н.			
			Satt634		Satt542	
Вінничанка	Україна	R*	-	122	-	210
Галина	Сербія	R	139	122m*	205	-
Горлиця	Україна	R	-	122	-	210
Ки-Він	Україна	R	139	-	205	-
Колбі	Канада	R	139	-	205	-
Подільська 1	Україна	R	-	122	205	-
Срібна	Україна	R	139	-	-	210
Сула	Сербія	R	139	-	205	-
Смуглянка	Україна	R	-	122	205	-
Ірина	Сербія	R	-	122	205	-
Антошка	Україна	R	139	122m	205	-
Ентерпрайз	Канада	S*	139	122	-	210
Таврія	Сербія	S	-	122	205	-
Фарватер	Україна	S	-	122	-	210
Особлива	Україна	S	139	122m	-	210
Полтава	Україна	S	-	122	-	210
Предатор	Сербія	S	139	-	205	-
Антарес	Україна	S	139	-	205	-
Луна	Сербія	S	-	122	-	210
Поєма	Сербія	S	-	122	-	210
Essex	США	S	139	-	205	-
V94-5152	США	R	130	-	-	210
Columbia	Корея	R	-	122	-	225
PI 468399C	<i>Glycine soja</i> , Китай	R	-	122	190	-
PI 339732	<i>Glycine soja</i> , Корея	S	139	-	-	210

R* - стійкий; S* - сприйнятливий; m* - мажорний амплікон

При аналізі алельного складу досліджених нами сортів, придатних до поширення в Україні, було виявлено два алелі Satt634 окремо чи в комплексі 139п.н. і 122п.н. та два Satt542 - 205п.н. і 210п.н. (Рис.2). Два алелі Satt634 були пропорційно представлені між вразливими та стійкими сортами у співвідношенні приблизно 50%:50%. Це свідчить про те, що цей маркер не може бути діагностичним в цій популяції сортів. Натомість частота алелю 205п.н. Satt542 серед стійких сортів складала 73%, хоча для сортів, маркованих геном *Rsv4*, цей алель був не властивим, натомість алель 210п.н., виявлений у стійкого маркованого сорту, зустрічався з частотою 67% серед вразливих досліджених нами сортів. Тобто результати виявилися протилежні очікуванім.

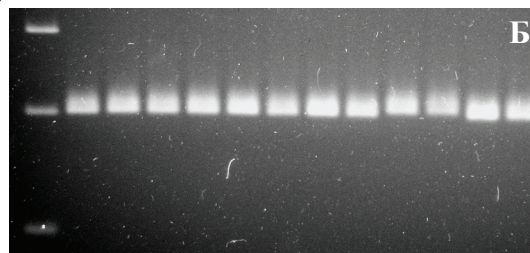
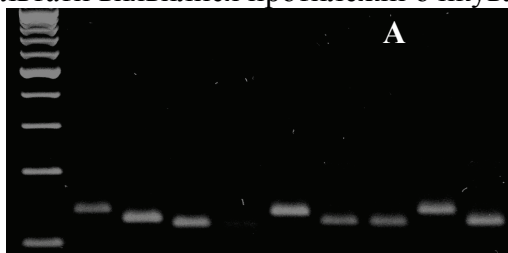


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації по локусам: **Satt 634(A)**; 1- маркер 100п.н.; 2- Essex; 3- V94-5152; 4- Columbia; 6-Ки-Він; 7-Горлиця; 8-Вінничанка; 9- Колбі; 10- Фарватер; **Satt 542(Б)**; 1- маркер 100п.н.; 2,3-Колбі; 4,5-Ки-Він; 6,7-Подільська 1; 8,9-Ірина; 10,11-Срібна; 12,13- Essex

Висновки. Оскільки більш тісно зчеплений з геном *Rsv4* маркер Satt634 не виявився ефективним при аналізі досліджених нами сортів, можна зробити припущення, що вони не є носіями цього гену. Ймовірно, що їх стійкість зумовлена іншими генами *Rsv1* і *Rsv3*, що знаходяться в інших групах зчеплення, але остаточно це припущення може підтвердити тест на алелізм або застосування алель-специфічного маркера гену *Rsv4*, який на сьогодні ще не створений. З іншого боку, встановлені нами діагностичні властивості маркеру Satt542, що виявилися цілком протилежні очікуванім, може свідчити про те, що в локусі, який фланкує ген *Rsv4* у предкових форм певних досліджених нами сортів, відбулася рекомбінація, що дещо змінила картину зчеплення цього локусу, але це вже предмет дослідження іншого напрямку молекулярних досліджень - асоціативного маркування.

Література

1. *Леценко А.К., Сичкарь В.И., Михайлов В.Г., Марьюшкин В.Ф.* Ботаническая и биологическая характеристика культурной сои и ее диких сородичей. Соя-Киев: Наукова думка. - 1987. - С.17-32.
2. *Московець С.М. Краєв В.Г., Порембська Н.Б., Білик Л.Г.* Віруси і вірусні хвороби бобових культур на Україні. -К.: Наукова думка. - 1971. -1 36с.
3. *Tolin S.A., Lacy G.H.* Viral, Bacterial, and Phytoplasmal Diseases of Soybean. Soybean: Improv., Production, and Uses. 3rd ed. - ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.-2004.-P. 765–819.
4. *Бойко А.Л., Шеренітко Д.В., Шеренітко В.В.* Генотипні відмінності за вірусостійкістю сої // Вісник аграрної науки. - 2005. - 12.- С.46-49.
5. *Hill J.H.* Soybean Mosaic Virus. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (eds) Compendium of soybean diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. - 1999. - P.70–71.
6. *Ross J.P.* Effect of single and double infection of soybean mosaic and bean pod mottle viruses on soybean yield and seed characters // Plant Dis. Rep. - 1968. - 52.-P. 344-348.
7. *Guo D.Q., Zhi H.J., Wang Y.W., Gai J.Y., Zhou X.A., Yang C.L.* Identification and distribution of strains of soybean mosaic virus in middle and northern of Huang Huai Region of China // Soybean Sci. -2005.- 27.-P.64–68.
8. *Choi B.K., Koo J.M., Ahn H.J., et al.* Emergence of Rsv-resistance breaking soybean mosaic virus isolates from Korean soybean cultivars // Virus Res. – 2005. - 112. - P.42–51.
9. *Cho EK, Goodman RM.* Strains of soybean mosaic virus: classification based on virulence in resistant soybean cultivars // Phytopathology - 1979. - 69. - P. 467–470.
10. *Shi A, Chen P, Li D, Zheng C, Zhang B, Hou A.* Pyramiding multiple genes for resistance to soybean mosaic virus in soybean using molecular markers // Mol. Breed. -2008.-23.-P.113-124.
11. *Chen P, Choi C.W.* Characterization of genetic interaction between soybean and soybean mosaic virus. In: Rao GP (ed) Molecular diagnosis of plant viruses.- Studium Press, Houston, TX. - 2007. - P. 389–422.
12. *Hwang T.Y., Yu S., Yang K., Kim H.M., Jeong S.C.* Application of comparative genomics in developing molecular markers tightly linked to the virus resistance gene *Rsv4* in soybean // Genome - 2006. - 49. - P.380–388.
13. *Keim P., Olson T.C., Shoemaker R.C.* A rapid protocol for isolating soybean DNA // Soybean Genet. Newsl.-1988-15-P.150–152.
14. *Cregan P.B., Quigley C.V.* Simple sequence repeat DNA marker analysis. In *Caetano-Anollos G. and Gresshoff P.M.* (ed.) DNA markers: Protocols, applications, and overviews. J. Wiley & Sons, New York. - 1997. - P. 173–185.

Вивчено поліморфізм 20 сортів сої, придатних до поширення в Україні, за SSR – маркерами Satt542 та Satt 634, що зчеплені з геном стійкості до вірусу мозаїки сої *Rsv4*. Виявлено діагностичні властивості у маркеру Satt542, але для визначення природи стійкості цих сортів необхідні подальші дослідження.

Изучен полиморфизм 20 сортов сои, допущенных к возделыванию в Украине, по SSR – маркерам Satt542 и Satt 634, сцепленными с геном устойчивости к вирусу мозаики сои *Rsv4*. Установлены диагностические свойства у маркера Satt542, но для определения природы устойчивости этих сортов необходимы дальнейшие исследования.

Polymorphism of 20 soybean varieties realized in Ukraine was studied by utilization of SSR markers Satt542 and Satt 634 linked with gene of resistance to soybean mosaic virus *Rsv4*. Diagnostic properties were identified for marker Satt542, however in order to reveal the nature of resistance of those varieties further investigations will be required.

ЯКИМЧУК Р. А.

Уманський державний педагогічний університет ім. Павла Тичини,
Україна, 20300, Умань, вул. Садова 2, e-mail: peoplenature@rambler.ru

ВПЛИВ НИЗЬКИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ НА МІНЛИВІСТЬ ВИДИМИХ ОЗНАК В ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Природний мутаційний процес, який відіграє важливу роль в еволюції [1], є також джерелом різної патології. В результаті господарчої діяльності людини величезні території України виявилися під впливом пошкоджуючих антропогенних факторів: забруднення промисловими відходами, отрутохімікатами, добривами, радіоактивними викидами та ін. [4]. Серед них особливо небезпечним є збільшення техногенного радіаційного забруднення оточуючого середовища і радіаційного навантаження на біосферу, що викликає підвищений інтерес учених до біологічних ефектів пролонгованої дії низькоінтенсивного випромінювання [2, 3]. Проблема правильної оцінки радіобіологічних наслідків низькодозового опромінення пов'язана в першу чергу з розумінням механізмів дії малих доз радіації, тих безпосередніх і віддалених ефектів, які вони викликають [5].

З метою вивчення ефективності впливу низьких доз радіації на мінливість організмів, в досліді насіння озимої пшениці сортів Донецька 48 та Альбатрос одеський опромінено γ -променями в дозах 0,5, 1, 5, 10 і 25 Гр. Рослини першого покоління (M_1) вирощено в суцільних посівах на ділянках по 10 м². Для вивчення змінених ознак у M_2 , з кожного варіанту M_1 відібрано не менш ніж по 500 колосів, насіння з яких висіяне окремими сім'ями. Сім'єю вважали покоління з одного колоса. Вивчення мінливості озимої пшениці здійснювали протягом всіх фаз росту і розвитку рослин.

Із збільшенням дози опромінення озимої пшениці в діапазоні 0,5-25 Гр, спостерігається поступове зростання частоти виникнення змінених ознак (табл. 1). Дія мінімальної дози, що представлена в досліді 0,5 Гр, у порівнянні з контролем, викликає статистично достовірне підвищення кількості змінених форм. Помічено, що частота їх появи у сортів Альбатрос одеський та Донецька 48 перевищує контроль у 2,9 та 7,4 рази. Подальше підвищення доз опромінення від 1 до 5 Гр не викликає стрімкого зростання кількості змінених сімей. Проте поява їх з частотою 5,53±1,02 і 7,24±1,16% у сорту Альбатрос одеський та 4,31±0,92 і 4,04±0,89% у сорту Донецька 48 суттєво перевищує контроль, що складає 1,37±0,51 і 0,41±0,29%, відповідно. Виявлено, що збільшення дози у 10-20 разів від мінімальної викликає достовірне зростання кількості змінених сімей у сорту Альбатрос одеський, частота яких – 7,24±1,16-11,51±1,42%. Такі ж підвищення дози опромінення насіння не спричиняють суттєвого зростання частоти видимих змін рослин сорту Донецька 48, що свідчить про його вищу генетичну стабільність.

Доза 25 Гр виявилася значно ефективнішою за здатності індукувати видимі зміни в поколінні M_2 рослин озимої пшениці. Її дія на повітряно сухе насіння досліджуваних сортів викликає суттєво більшу кількість змінених сімей у порівнянні як з контролем, так і з дією більшості нижчих доз. Так, частота їх виникнення у сортів Альбатрос одеський і Донецька 48