

- (webservice issue). – W. 43–46.
4. Mahmood T., Ahmad I., Qureshi S., Aslam M. Estimation of yield losses due to powdery mildew in peas // *Pak. J. Bot.* – 1983. – Vol. 15. – P. 113–115.
  5. Pavan S., Schiavulli A., Appiano M., Marcotrigiano A.R., Cillo F., Visser R.G., Bai Y., Lotti C., Ricciardi L. Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a MLO homologous locus // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – Vol. 123, №8. – P. 1425–1431.
  6. Pavan S., Schiavulli A., Appiano M., Miacola C., Visser R.F., Bai Y., Lotti C., Ricciardi L. Identification of a complete set of functional markers for the selection of *er1* powdery mildew resistance in *Pisum sativum* L. // *Mol. Breed.* – 2013. – Vol. 31, №1. – P. 247–253.
  7. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.
  8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28, №10. – P. 2731–2739.
  9. Tiwari K., Penner G., Warkentin T. Inheritance of powdery mildew resistance in pea // *Can. J. Plant Sci.* – 1997. – Vol. 77, №3. – P. 307–310.
  10. Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35 (webservice issue). – W. 71–74.

**ZHUKOV V.A., SULIMA A.S., ZHERNAKOV A.I., SHTARK O.Y., BORISOV A.Y., TIKHONOVICH I.A.**

*All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS*

*Russia, 196608, Saint-Petersburg, Pushkin, Podbelsky ch., 3, e-mail: zhukoff01@yahoo.com*

#### **MOLECULAR MARKERS FOR BREEDING THE NEW PEA CULTIVARS RESISTANT TO POWDERY MILDEW**

**Aims.** Powdery mildew is economically important disease of pea (*Pisum sativum* L.) as it causes severe losses of yield worldwide. Environmental friendly approach to control powdery mildew, in contrast to chemical protection, is use of the resistant cultivars. Mutations in pea gene *PsMLO1* that confer resistance to powdery mildew can be used as molecular markers for breeding resistant cultivars. **Methods.** Mutant allelic variants of *PsMLO1* were sequenced in resistant pea cultivars and lines in order to detect SNPs and/or indels suitable for creation PCR-based molecular markers. **Results.** The system of 3 primers was designed that allows one-step PCR-based identification of natural mutant allele *PsMLO1* with transposon insertion in reading frame that presents in resistant pea cultivar Franklin. **Conclusions.** This molecular marker can be used for breeding resistant cultivars when taking cultivar Franklin (as well as related lines and cultivars) as donors of powdery mildew resistance trait.

**Key words:** *Pisum sativum* L., powdery mildew, molecular markers, resistance, breeding.

#### **ЗАДОРОЖНА О.А.**

*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН*

*Україна, 61060, Харків, Московський пр., 142, e-mail: olzador@ukr.net*

#### **ПОЛІМОРФІЗМ МАРКЕРНИХ ЛОКУСІВ, ЗЧЕПЛЕНИХ З QTL, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ ОЗНАКИ НАСІННЯ**

Однією з важливіших олійних культур в Україні є соняшник. Серед виробництва олійних культур його частка становить майже 70 %. Спостерігається тенденція до збільшення виробництва насіння соняшнику. У 2011 році врожай цієї культури становив 8,7 млн тон, що на 28 % перевищує показники 2005 року [1]. У світовому виробництві соняшник займає лише 9 % після сої, ріпаку та бавовни. Україна за цим показни-

ком займає одне з перших місць, чергуючись з Росією та Аргентиною. Україна є одним з лідерів світового експорту продуктів переробки. Так за даними 2012 року Міністерства сільського господарства США (USDA) доля України в світовій торгівлі соняшnikовою олією оцінюється на рівні 57 %, що підтверджує лідерство за експортом цього продукту. Для порівняння експорт олії з Росії становить 11 % світового продажу, з

Аргентини – 17 %.

Важливими завданнями в галузі селекції соняшнику є створення нових сортів і гібридів з високою продуктивністю, підвищеним вмістом олії в насінні, високою стійкістю до несприятливих біотичних та абіотичних чинників навколишнього середовища та інші [2].

Вміст олії в насінні є комплексною ознакою, яка залежить від генотипу та умов навколишнього середовища [3]. Відомі роботи по генетичному контролю кількісних ознак, зокрема вмісту олії та прослідковування їх успадкування в поколіннях F<sub>2</sub> та F<sub>3</sub>, визначенню генетичних відносин між вмістом олії та кількістю днів до цвітіння. Встановлено, що насіння пізньоквітучих форм має менший вміст олії ніж ранньоквітучих. На досліджених формах встановлено проміжне успадкування вмісту олії [2, 3]. За даними інших дослідників вміст олії має відносно високий рівень успадкування (0,6–0,7). Описано морфологічний маркер на низький вміст олії. Насіння з білим лушпинням має нижчий вміст олії, ніж насіння з не пігментованим [3].

Використовуються нові підходи до визначення вмісту олії в насінні та складу жирних кислот. Поряд з традиційним методом аналізу вмісту олії за допомогою ядерного магнітного резонансу та складу жирних кислот за допомогою методом газової хроматографії успішно використовується метод ближньої інфрачервоної спектроскопії (NIRS) [4].

У сучасній селекції соняшнику велика увага приділяється складу олії. В Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва створені форми з різним складом жирних кислот. Так створені форми з підвищеним вмістом пальмітинової (C 16:0) кислоти (до 40 %), стеаринової (C 18:0) (до 11 %), олеїнової (C 18:1) (до 95 %), зменшеним вмістом лінолевої (C 18:2) (до 0,7 %) та лінолевої кислоти (C 18:3). Сучасні лінії були створені на основі мутантних форм [2]. За даними вітчизняних дослідників створені батьківські форми з відповідним вмістом жирних кислот. При аналізі гібридів констатувався широкий розмах ефектів домінування для цих жирних кислот, що викликає певні труднощі при доборі вихідного матеріалу для схрещувань.

Дослідження генетичного контролю насичених жирних кислот досить обмежені. Відомо про генетичний контроль пальмітинової кислоти [5, 6, 7]. За вмістом пальмітинової кислоти спостерігається проміжне успадкування та значне варіювання за цим показником. Вважається, що генетичний контроль забезпечується генами,

розташовані в трьох локусах [6]. Спроби маркування показників насичених жирних кислот морфологічними маркерами, зокрема зчеплення з кольором лушпиння успішними не виявились [7]. Досліджено генетичний контроль високого вмісту стеаринової кислоти. При аналізі мутантної форми CAS-3 констатується материнський контроль цієї ознаки в одному випадку, монолокусний моногенний або дилокусний дигенний контроль з проміжним успадкуванням в залежності від підібраних батьківських форм [8]. При аналізі іншої мутантної форми CAS-14 високий вміст стеаринової кислоти контролювався одним рецесивним геном [9]. При схрещуванні ліній CAS-3 та CAS-14 встановлено, що алелі, які контролюють високий вміст стеаринової кислоти, лежать в різних локусах. Спостерігали трансгресію за низьким вмістом стеаринової кислоти.

Досить поширеним серед дослідників є аналіз вмісту та успадкування олеїнової кислоти. Досліджено успадкування вмісту олеїнової кислоти в лініях соняшнику. Встановлено вплив на цей показник року культивування та генотипу зразка [10].

Проведені спроби оцінки складу жирних кислот з урахуванням регіону культивування, дати посіву та року репродукції. Встановлено, що підвищена температура під час розвитку насіння призводить до підвищеного вмісту олеїнової кислоти [11, 12]. При більш низьких мінімальних нічних температурах доля олеїнової кислоти зменшувалась, а лінолевої збільшувалась. З даними авторів місце вирощування соняшнику для складу жирних кислот мають більш важливе значення, ніж дата посіву.

Застосовуються сучасні молекулярні і класичні генетичні методи для забезпечення ефективних підходів в створенні олеїнового соняшнику, у якого вміст олеїнової кислоти вищий за 75 % замість звичайних 25 %. Безумовно, мають перспективи роботи по створенню генетично модифікованого соняшнику. Відомі роботи про клонування фрагментів геному соняшнику, який несе мутації, що зумовлюють високий вміст олеїнової кислоти в насінні [13].

Відомо, що олія з генетично-модифікованого соняшнику має вищу стабільність проти окиснення під час збереження та глибокого зажарювання ніж звичайного соняшнику. В цих формах генетично-модифікованого соняшнику зменшувалась кількість лінолевої кислоти з 29 до 5 %, збільшувалась кількість олеїнової кислоти з 17 до 87 %. [14]. За допомогою RFLP-аналізу встановлено алель, який ко-

релював з високим вмістом олеїнової кислоти, що дало можливість використовувати цей мутантний алель ( $\Delta 12HOS$ ), як маркерний [15].

Досліджується якісний складу олії, в яких були спроби визначити локалізацію генів, що контролюють ці ознаки. Використовуючи AFLP та RELP маркери ці локуси були картовані на першій (LG1) та чотирнадцятій (LG14) хромосомах для стеаринової (C18:0) та олеїнової (C18:1) відповідно. Гени, що впливають на рівень стеаринової та олеїнової кислоти були ідентифіковані на восьмій хромосомі (LG8). Цей QTL демонстрував значну епістатичну взаємодію з локусом на LG14 та модифікував дію гену *O1*, що контролює вміст олеїнової кислоти [16].

### Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень було насіння ліній X114B (вміст стеаринової кислоти 10 %), X526B (вміст олеїнової кислоти 90 %), X720B (вміст лінолевої кислоти 67 %), X762B (вміст лінолевої кислоти 67 %). Загальна олійність для використаних зразків була відповідно 40 %, 49 %, 37 % та 37 %. Досліджувались також зразки соняшнику X711B, X714B, X782B, 8-X840B з олійністю відповідно 50 %, 51 %, 50 %, 48 % [18]. Визначення вмісту олії проводилось за допомогою методу ядерного магнітного резонансу. Склад жирних кислот вивчався за допомогою хроматографічного аналізу.

Для диференціації ліній використовували мікросателітні маркери. Мікросателітний аналіз проводився на основі генетичної карти зчеплен-

### Результати та обговорення

У проведених нами дослідженнях встановлено поліморфізм локусів, які тісно зчеплені з локусами кількісних ознак (QTL), що контролюють ознаки насіння. Поліморфізм цих локусів раніше не досліджувався [20]. Локуси ORS 371 (LG1), ORS1068 (LG2), цікаві як локуси, що маркують олійність та інші цінні ознаки насіння. Для локусу ORS 371 встановлені алелі 168, 226, 250, 256, 264, 390, 467.

Для локусу ORS1068 встановлені такі алелі: 306, 340, 367, 427, 504, 641. Найпоширенішими були алелі 306, 340, 367 (рис.).

Використані маркери доповнюють дані по

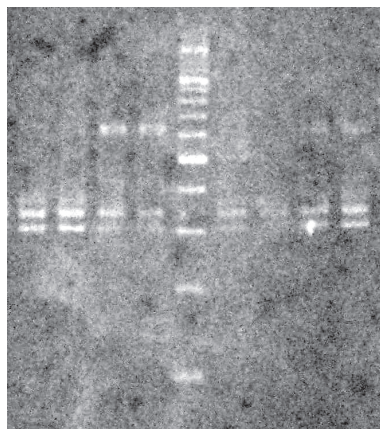
Відомі роботи по дослідженню вмісту олії в насінні соняшнику з використанням відповідних RELP маркерів, розташованих на 17 групах зчеплення [17]. У досліджених форм F1 спостерігали проміжне успадкування високого вмісту олії.

Таким чином, дані по маркуванню генів, що контролюють вміст олії досить обмежені.

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було визначити поліморфізм локусів, що контролюють ознаки насіння, дослідити можливість диференціювати за допомогою мікросателітних маркерів лінії соняшнику з відомим вмістом олії та різним складом жирних кислот.

ня за локусами кількісних ознак (QTL), які контролюють ознаки насіння та маркерних локусів ORS 371 (LG1), ORS1068 (LG2). Для молекулярно-генетичного аналізу екстракцію ДНК проводили з використанням СТАВ-методу [19]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за стандартною методикою в термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Продукти ампліфікації розподіляли у 2 % агарозному гелі в однократному TBE буфері. Маркером молекулярних мас був O'Range Ruler 100 bp DNA Ladder («Fermentas»). Візуалізацію проводили з використанням етідіум броміду за допомогою трансільюмінатора UVT-1 («Біоком», Росія). Результати аналізували за допомогою програми Gel Images-2 («Хелікон», Росія).

паспортизації даних зразків, але не дають можливість диференціювати ці лінії за вмістом олії. Слід, однак, зазначити, що більшість використаних ліній мали близький вміст олії. Використані лінії з різним складом жирних кислот в досліджених локусах в окремих випадках мають різний склад алелів. Так для високо олеїнової лінії X526B в локусі ORS1068 крім типових алелів 306, 340, та 641 відзначали алель 427, який не спостерігали у інших ліній. Для лінії X114B з високим вмістом стеаринової кислоти були характерні лише алелі 306 та 340, які також зустрічались у інших ліній.



1 2 3 4 M 5 6 7 8

Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації по локусу ORS1068 у 2 % агарозі

Примітки: 1,2 – X114B; 3,4 – X526B; M- маркер молекулярної маси 100 bp; 5,6 – X720B; 9,10 – X762B.

### Висновки

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про наявність поліморфізму в маркерних локусах, які зчеплені з QTL, що контролюють ознаки насіння. Одержана інформація доповнює дані по паспортизації

вивчених ліній соняшнику. Використані маркери не дозволили диференціювати лінії за вмістом олії. Виділена форма з високим вмістом олеїнової кислоти, яка має характерний алельний склад маркерного локусу.

### Література

1. Маслак О. Соняшникові прогнози // Агробізнес сьогодні. – 2012. – №20 (243) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [www.agro-business.com.ua](http://www.agro-business.com.ua)
2. Кириченко В.В. Селекція і семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). – Харків, 2005. – 385 с.
3. Leon A.J., Andrade F. H., Lee M. Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower // *Crop Sci.* – 2003. – Vol. 43. – P. 135–140.
4. Pérez-Vich B., Velasco L., Fernández-Martínez J. M. Determination of Seed Oil Content and Fatty Acid Composition in Sunflower Through the Analysis of Intact Seed, Husked Seeds, Meal and Oil by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy // *JAOCs.* – 1998. – Vol. 75. – P. 547–555.
5. Velasco L., Perez-Vich B., Fernandez-Martínez J.M. A new sunflower mutant with increased levels of palmitic acid in seed oil // *Helia.* – 2008. – Vol. 31, №48. – P. 55–60.
6. Perez-Vich, B., J. Fernandez, R. Garcés, and J.M. Fernandez-Martínez Inheritance of high palmitic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-5//*Theoretical and Applied Genetics.* – 1999. – Vol. 98. – P. 496–501.
7. Vick B., Jan C.C., Miller J. Inheritance of reduced saturated fatty acid content in sunflower oil // *Helia.* – 2002. – Vol. 25, №36. – P. 113–122.
8. Perez-Vich, B., Garcés R., Fernández-Martínez J.M. Genetic control of high stearic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-3 // *Theoretical and Applied Genetics.* – 1999. – Vol. 99. – P. 663–669.
9. Pérez-Vich B., Velasco L., Muñoz-Ruz J., Fernández-Martínez J.M. Inheritance of High Stearic Acid Content in the Sunflower Mutant CAS-14 // *Crop Science.* – 2006. – Vol. 46. – P. 22–29.
10. Vares D., Lacombe S., Griveau Y., Berville A., Kaan F. Inheritance of oleic acid content of F1 seed in a complete diallel cross between seven sunflower lines // *Helia.* – 2002. – Vol. 25. – №36. – P. 105–112.
11. Izquierdo N.G., Aguirrezábal L.A., Andrade F.H., Cantarero M.G. Modeling the response of fatty acid composition to temperature in a traditional sunflower hybrid // *Agron. J.* 2006. – Vol. 98. – P. 451–461.
12. Onemli F. Impact of climate changes and correlations on oil fatty acids in sunflower // *Pak. J. Agri. Sci.* – 2012. – Vol. 49, №4. – P. 455–458.
13. Lacombe S., Kaan F., Griveau Y., Berville A. The prevents high oleic mutation: methodological studies // *Helia.* – 2004. – Vol. 27, №40. – P. 41–54.
14. Smith S.A., King R.E., Min D.B. Oleic acid rich sunflower give trans-fat alternative study // *Food Chemistry.* – 2007. – Vol. 102, Is. 4. – P. 1208–1213.
15. Lacombe S., Bervillé A. A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus // *Molecular Breeding.* – 2001. – Vol. 8, №2. – P. 129–137.



16. Pérez-Vich B, Fernández-Martínez J.M, Grondona M., Knapp S.J., Berry S.T. Stearoyl-A. CP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – Vol. 104. – P. 338–349.
17. Leon F.J., Lee M., Rufener G.K. et al. Use of RELP Markers for Genetic Linkage Analysis of Oil Percentage in Sunflower Seed // *Crop Sci*. –1995. –Vol. 35. –P. 558–564.
18. Кириченко В.В., Аладьина З.К., Гуменюк А.Д. и др Каталог рабочей коллекции самоопыленных линий подсолнечника Института растениеводства им. В.Я. Юрьева. – Харьков, 1996. – 88 с.
19. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. – Одесса: Астропринт, 2011. – 336 с.
20. Саналатий А.В., Солоденко А.Е., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSR – анализа // *Цитология и генетика*. –2006. – Т. 40, №4. – С. 37–43.

#### ZADOROZHNA O.A.

*Plant production Institute n. a. V.Ya. Yuriev*

*Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky pr., 142, e-mail: olzador@ukr.net*

#### POLIMORPHISM OF MARKER LOCI, LINKED WITH QTL CONTROLLED SEED TRAITS

**Aims.** Marker assisted selection of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with different seed oil content and some fatty acids. **Methods.** SSR-analysis, oil content, fatty acids analysis of sunflower lines. **Results.** There is a polymorphism in marker loci, which tightly linked with QTL controlled oil content and other seed traits.

**Conclusions.** The polymorphism of loci ORS371 and ORS1068 is not enable for marker assisted selection of seed oil content. There is a high oleic acid content line with special marker allele.

**Key words:** *Helianthus annuus*, marker assisted selection, seed oil content, fatty acids.

#### ЗАХАРОВА В.А., ЗАХАРОВ М.В., ХИЛЬКО В.Т.

*Таврійський державний агротехнологічний університет*

*Україна, м. Мелітополь, e-mail: sachar.aleksej@mail.ru*

#### СЕЛЕКЦІЯ ЯБЛУНІ НА ПОЛІПЛОЇДНОМУ РІВНІ

Метод експериментальної поліплоїдії порівняно молодий і його стали широко застосовувати після відкриття фізичних і хімічних мутагенів. Підвищення продуктивності нерозривно пов'язане з успіхами селекційної роботи. Все більшого значення набуває селекція сортів, які поєднують високу продуктивність з хорошою якістю продукції і повинні стабільно зберігати свої позитивні ознаки у будь-яких умовах вирощування. У цьому зв'язку проблема створення цінного вихідного матеріалу є досить актуальною. Найважчий у розпорядженні селекціонерів-плодоводів генофонд не може повністю забезпечити вирішення поставлених завдань. Виникла необхідність розробити нові методи зміни спадковості, які давали б можливість у більшому масштабі індукувати мутаційну і рекомбінційну мінливість.

Виникнення нових поліплоїдних форм часто пов'язані з розширенням ареалу виду. Поліплоїдія веде до накопичення мутаційних змін, у тому числі в гомологічних хромосомах: зміни закономірностей розширення ознак, насамперед пов'язаних з ефектом дози,

множинним алелізмом і полігенною регуляцією, а так само до розширення діапазону оптимальної біохімічної діяльності і підвищенню екологічної пластичності [1, 2, 3, 4]. Для успішного вирішення проблеми створення нових цінних сортів на основі використання методу поліплоїдії необхідно створити колекцію тетраплоїдів, придатних в якості вихідних форм-донорів диплоїдних гамет [5]. Необхідно також:

- виявлення диплоїдних сортів здатних формувати нередуковані гамети [3, 5];
- цитоембріологічне вивчення поліплоїдних форм з метою оцінки придатності їх для використання в селекції на поліплоїдному рівні [5, 6].

Яблуня – головним чином є перехресно запильна культура, тому врожайність її багато в чому залежить від стану генеративної сфери до моменту запилення і запліднення.

У даний час питання, пов'язані з вивченням морфології мейозу при мікроспорогенезі і формуванні жіночого гамітофіта у диплоїдних сортів яблуні виду