

УДК 577.2:58.036.5:633.11

М. В. ГАЛАЄВА¹, асп.,
В. І. ФАЙТ², д.б.н., зав. відділом генетики,
С. В. ЧЕБОТАР¹, д.б.н., пров. наук. сп.,
О. В. ГАЛАЄВ¹, к.б.н., ст. наук. сп.,
Ю. М. СИВОЛАП¹, д.б.н., директор

¹Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
e-mail: mariagal1@rambler.ru

²Селекційно-генетичний інститут НААН України, відділ генетики,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
e-mail: faygen@ukr.net

МОРОЗОСТІЙКІСТЬ РЕКОМБІНАНТНО-ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ, ВІДМІННИХ ЗА АЛЕЛЬНИМ СКЛАДОМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ХРОМОСОМИ 5В

Досліджено морозостійкість і проаналізовано за мікросателітними локусами довгого плеча хромосоми 5В батьківські форми та рекомбінантно-інбредні лінії F₇ комбінації схрещування Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса. Вивчено зв'язок алельних відмінностей мікросателітних локусів з рівнем морозостійкості ліній. Виявлено, що 11 – 13,8% різниці за рівнем морозостійкості пов'язані з алельними відмінностями за локусом *Xcfd7-5BL*.

Ключові слова: озима пшениця, морозостійкість, мікросателітні локуси.

Озима м'яка пшениця – одна з найбільш розповсюджених злакових культур у світі. Стійкість озимих культур до дії морозу є необхідною передумовою одержання стабільних урожаїв даної культури. Підвищення морозостійкості – одне з головних завдань селекції у південних регіонах України [1, 2]. Морозостійкість озимої м'якої пшениці – складна кількісна ознака. Повідомлялось про зв'язок морозостійкості з тривалістю яровизації [3–6], фотоперіодичною чутливістю [7–9], висотою рослин [10], компонентним складом запасних білків [11], накопиченням цукрів [12], вмістом ліпідів [13] та ін. На рівень морозостійкості озимої м'якої пшениці впливають гени, що розташовані принаймні в 10 з 21 пари хромосом [14]. За допомогою моносомного аналізу та дослідження заміщених хромосомних ліній виявлені хромосоми, що несуть гени морозостійкості [15–18]. За даними Sutka et al. [14], головні гени морозостійкості локалізовані в хромосомах п'ятої гомеологічної групи. Зокрема, на довгих плечах згаданих хромосом картовано гени *Fr-A1* та *Fr-A2* (5A), *Fr-B1* (5B) та *Fr-D1* (5D) [19–22].

Залучення молекулярно-генетичних методів аналізу допомагає ефективно ідентифікувати та добирати генотипи з необхідними генами для подальшого використання в селекційних програмах [23]. Молекулярно-генетичні маркери генів морозостійкості *Fr-A1*, *Fr-A2* та *Fr-D1* отримані за допомогою досить трудомісткого ПДРФ-аналізу. ПЛР-аналіз сортів української селекції за мікросателітним локусом *Xgwt 639*, що за даними [21] близько

зчеплений з геном *Fr-B1*, не виявив поліморфізму між морозостійкими та чутливими до негативних температур генотипами [24]. Виникла потреба пошуку нових ПЛР-маркерів до генів морозостійкості сортів озимої м'якої пшениці, що вирощуються в Україні. Створення набору таких маркерів дозволить добирати рослини з необхідними генами морозостійкості на ранніх етапах селекції.

Метою даного дослідження було вивчення зв'язку аельних відмінностей мікросателітних локусів, що розташовані на 5В хромосомі, з рівнем морозостійкості рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень служили батьківські форми і 74 рекомбінантно-інбредні лінії F_7 комбінації схрещування Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса. Сорт Лузанівка одеська має добру морозостійкість, а друга батьківська форма Одеська червоноколоса характеризується низьким рівнем морозостійкості [25].

Оцінку морозостійкості рекомбінантно-інбредних ліній проводили методом проморожування рослин у паперових рулонах згідно з [26]. Проводили три досліді з проморожування протягом 2008–2009 років. У кожному досліді добирали по 75 зерен кожної лінії (по 25 зерен на кожну повторність). Двадцять п'ять зерен розкладали на змочену у воді смужку фільтрувального паперу розміром 29 x 8 см, відступаючи на 0,5 см від верхнього краю. Потім смужку згортали в рулон та розміщували рулони у спеціальних металевих ящиках з водою. Після появи сходів паростки вирощували протягом 5 діб при кімнатній температурі. П'ятидобові паростки розміщували в низькотемпературній камері КНТ-1 для проходження першої фази загартування при +2 °С і цілодобовому освітленні інтенсивністю 10 клк протягом 29 діб. Другу фазу загартування провадили без освітлення при температурі –6 °С протягом 3 діб. Потім поступово знижували температуру по 2 °С/год до температури проморожування. Проморожували рослини при –12 °С протягом 24 годин. Після проморожування температуру підвищували по 2 °С/год до повного відтавання паростків. Паростки обрізали на рівні 5–6 см від верхнього краю рулону й відрощували протягом 15 діб у лабораторних умовах з подальшим підрахунком живих та загиблих рослин. За критерій морозостійкості приймали процент живих рослин після проморожування. Морозостійкість підраховували для кожної лінії окремо та для популяції як середній рівень морозостійкості всіх ліній.

ДНК виділяли із зеленого листя та 3–5-денних паростків за допомогою СТАВ-буфера [27]. Мікросателітний аналіз ДНК батьківських сортів Лузанівка одеська, Одеська червоноколоса і 74 рекомбінантно-інбредних ліній F_7 провадили з використанням маркерів, локалізованих на довгих плечах 5В хромосоми *Xbarc88*, *Xbarc89*, *Xbarc4*, *Xcfa2070*, *Xbarc74* та *Xcfd7*. Продукти ампліфікації фракціонували електрофорезом у 2% агарозному гелі та 10% денатуруючому поліакриламідному гелі, що містив 8М сечовину. Молекулярну масу продуктів ампліфікації визначали згідно з маркерами рBlueScript DNA/MspI за допомогою комп'ютерної програми "Image Master 1D Elite". Документували отримані електрофореграми відеосистемою VDS.

Статистичну обробку отриманих результатів провадили за загальноприйнятими методиками [28].

Результати та їх обговорення

Рівень морозостійкості популяції рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса був досить високим. Середня морозостійкість популяції в першому досліді склала 72% , а морозостійкість окремих ліній варіювала від 3% до 97% (табл. 1). Морозостійкість популяції у другому досліді дорівнювала 78% , а діапазон варіювання цього показника в окремих ліній – від 2% до 100% . Морозостійкість у третьому досліді була вищою, ніж у двох попередніх – 87% , а морозостійкість окремих ліній змінювалася від 9% до 100% . Для кожної лінії підраховували середній рівень морозостійкості за три досліді. Середня морозостійкість популяції за три досліді склала 79% , а середня морозостійкість окремих ліній варіювала від 18% до 99% .

Мікросателітним аналізом 5В хромосоми батьківських сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса виявлено поліморфізм за локусами *Xbarc88-5BL*, *Xbarc4-5BL*, *Xbarc89-5BL*. На протилежність цьому сорти Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса були ідентичними за алелями локусів *Xbarc74-5BL* та *Xcfa2070-5BL*.

Таблиця 1

Основні статистичні показники морозостійкості популяції рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська /Одеська червоноколоса

Дослід	$x \pm Sx$	min	max	σ	CV
1	72 ± 2,7	3	97	22,8	32
2	78 ± 3,0	2	100	25,6	33
3	87 ± 2,2	9	100	19,3	22
Середнє	79 ± 2,3	18	99	19,7	25

Мікросателітним аналізом 74 рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса за локусами *Xbarc88-5BL*, *Xbarc4-5BL*, *Xbarc89-5BL* розподілено лінії на дві окремі групи для кожного з локусів у залежності від алельного складу, а саме лінії, що утримують у геномі алель від морозостійкої батьківської форми Лузанівка одеська, та лінії з алелем, властивим сорту Одеська червоноколоса, та підраховано середній рівень морозостійкості для кожної з груп у трьох досліді (табл. 2). Так, наприклад, середній рівень морозостійкості в першому досліді всіх ліній з алелем сорту Лузанівка одеська за локусом *Xbarc88-5BL* склала 73% , а середня морозостійкість ліній з алелем, властивим сорту Одеська червоноколоса, дорівнювала 70% . Тобто 3% різниці за морозостійкістю в першому досліді пов'язані з алельними відмінностями за локусом *Xbarc88-5BL*. Незначне збільшення рівня морозостійкості ліній, що мали у своєму геномі алелі від морозостійкої батьківської форми Лузанівка одеська, спостерігалось при дослідженні локусів *Xbarc88-5BL*, *Xbarc4-5BL* та *Xbarc89-5BL* у всіх трьох досліді. Разом з тим алельні відмінності вищезазначених локусів за ознакою морозостійкості виявилися не суттєвими.

Таблиця 2

Морозостійкість рекомбінантно-інбредних ліній F7 Лузанівка одеська / Одеська червоноколоса, що розрізняються за алелями мікросателітних локусів у різних дослідах

Алель	<i>Xbarc88-5BL</i>				<i>Xbarc4-5BL</i>				<i>Xbarc89-5BL</i>				<i>Xcfd7-5BL</i>			
	1	2	3	середнє	1	2	3	середнє	1	2	3	середнє	1	2	3	середнє
Л*	73	79	87	80	73	79	87	80	74	81	89	81	78	83	91	84
О**	70	77	86	78	71	76	86	77	69	75	83	75	65	72	81	73
НІР _{0,05}	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	10	11	9	9

Примітки:

1, 2, 3 – номери досліду (пояснення в тексті);

Л* – Лузанівка одеська;

О** – Одеська червоноколоса

Пара праймерів *Cfd7* детектує два мікросателітних локуси *Xcfd7-5BL* та *Xcfd7-5DL*, що розташовані в довгих плечах хромосом 5В та 5D, відповідно. Продуктами ампліфікації ДНК сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса були фрагменти: перший, що мав розмір 240 п.н. та був присутній у обох сортів, другий, розміром 204 п.н., характерний для сорту Одеська червоноколоса, та третій 194 п.н., характерний для Лузанівки одеської. Аналіз популяції рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса за допомогою згаданої пари праймерів виявив розщеплення за фрагментами ампліфікації 204 п.н. та 194 п.н., рослини 40 ліній визначались за фрагментом ампліфікації розміром 194 п.н., властивим сорту Лузанівка одеська, а у рослин 34 ліній виявляли фрагмент розміром 204 п.н., що походив від Одеської червоноколосої. Аналіз косегрегації даних фрагментів ампліфікації з продуктами ампліфікації по локусах *Xbarc88-5BL*, *Xbarc4-5BL*, *Xbarc89-5BL* виявив зчеплення між вказаними мікросателітними локусами та локусом *Xcfd7-5BL*, за яким детектовано фрагменти 204 п.н. та 194 п.н. Більш тісно зчепленим з мікросателітним локусом *Xcfd7-5BL* виявився локус *Xbarc89-5BL* (29сМ за попередніми даними). Отримані результати дозволяють нам стверджувати, що саме алелі 204 п.н. та 194 п.н. належать до локусу *Xcfd7-5BL*.

Алельні відмінності рекомбінантно-інбредних ліній за локусом *Xcfd7-5BL* пов'язані з різним рівнем морозостійкості досліджуваних ліній. Морозостійкість ліній з алелем 194 п.н. від Лузанівки одеської була достовірно вища, ніж морозостійкість ліній з алелем 204 п.н. від Одеської червоноколосої (критерій Фішера $F_{\text{розрахункове}} > F_{\text{табличне}}$, при $df_{\text{фактора}} = 1$ та $df_{\text{залишку}} = 72$). У першому досліді за морозостійкістю лінії відрізнялися

на 13%, при цьому відмінності за вказаною ознакою в популяції склали 94%. Отже 13,8% різниці за морозостійкістю популяції рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса в першому досліді пов'язані з алельними відмінностями за локусом *Xcfd7-5BL*. У другому та третьому досліді наявність алелю від Лузанівки одеської в генотипах досліджених рекомбінантно-інбредних ліній сприяла достовірному зростанню рівня морозостійкості цих ліній на 11,2% та 11,0%, відповідно, порівняно з лініями, що утримують алель від Одеської червоноколосої. У середньому за три досліді алель 194 п.н. від морозостійкого сорту Лузанівка одеська асоціювався з достовірним збільшенням морозостійкості ліній на 11%. Тобто при 81% відмінностей в популяції 13,6% різниці за рівнем морозостійкості пов'язані з алельними відмінностями за локусом *Xcfd7-5BL*.

Висновки

Мікросателітним аналізом 5В хромосоми батьківських сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса виявлено поліморфізм по локусах *Xbarc88-5BL*, *Xbarc4-5BL*, *Xbarc89-5BL* та *Xcfd7-5BL*.

Алельні відмінності рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса за локусом *Xcfd7-5BL* істотно пов'язані з рівнем морозостійкості. Збільшення рівня морозостійкості ліній на 11,0% – 13,8% пов'язані з мікросателітним алелем розміром у 194 п.н., характерним для морозостійкого сорту Лузанівка одеська.

Література

1. *Лыфенко С. Ф.* О некоторых закономерностях наследования морозостойкости у гибридов озимой мягкой пшеницы // Пути создания исходного материала для селекции зерновых культур. – О. : ВСГИ, 1976. – Вып. 14. – С. 71–86.
2. *Литвиненко М. А.* Теоретичні основи та методи селекції озимої м'якої пшениці на підвищення адаптивного потенціалу для умов степу України: Автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук. – К., 2001. – 46 с.
3. *Никифоров О. А.* Длина стадии яровизации и морозостойкость пшеницы // Сб. работ молодых ученых. – О., 1969. – С. 113–115.
4. *Литвиненко Н. А., Козлов В. В.* Связь темпов осеннего и ранневесеннего роста и развития растений с продуктивностью и морозостойкостью у озимой пшеницы // Технологии возделывания зерновых колосовых культур и проблемы их селекции. – Мироновка, 1990. – С. 24–31.
5. *Prasil I. T., Prasilova P., Pankova K.* Relationships among vernalization shoot apex development and frost tolerance in wheat // *Ann. Bot.* – 2004. – V. 94. – P. 413–418.
6. *Prasil I. T., Prasilova P., Pankova K.* The relationship between vernalization requirement and frost tolerance in substitution lines of wheat // *Biol. Plant.* – 2005. – V. 49 (2). – P. 195–200.
7. *Мусич В. Н.* Фотопериодическая чувствительность и морозостойкость современных сортов озимой пшеницы // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. – 1983. – Т. 48, № 2. – С. 21–24.
8. *Файт В. И., Федорова В. Р., Нагуляк О. И. и др.* Связь фенотипических и генотипических различий по продолжительности яровизации и фотопериодической чувствительности с морозостойкостью озимой пшеницы: Зб. наук. пр. Уманськ. держ. агр. ун-ту. – Умань, 2003. – Спец. вип. – С. 359–364.

9. Мокану Н. В., Файт В. И. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимо-морозостойкости и урожаю у озимой пшеницы // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 6. – С. 26–33.

10. Лыфенко С. Ф., Ериняк Н. И., Федченко В. П. Связь признака высоты стебля озимой пшеницы с морозостойкостью // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. – 1980. – Т. 35, № 1. – С. 6–9.

11. Попереля Ф. А. Полиморфизм глиадина и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивными свойствами сортов мягкой озимой пшеницы // Селекция, семеноводство и интенсивная технология возделывания озимой пшеницы. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 138–150.

12. Дорофеев Н. В. Влияние накопления сахаров на формирование морозостойкости озимой пшеницы в Восточной Сибири в зависимости от возраста растений // Зерновые культуры. – 1998. – № 1. – С. 17–19.

13. Калоша О. И., Литвинчук Н. К., Карасев Г. С. Липидный и жирнокислотный состав мембран в связи с морозостойкостью сортов озимой пшеницы и применение веществ криопротекторного действия // Устойчивость растений к действию отрицательных температур. – К.: Наук. думка, 1984. – С. 5–20.

14. Sutka J., Galiba G., Veisz O., Snape J. V. Genetic analysis of frost resistance and its contribution to development of frost resistant cereal varieties: a review // Plant Breed. and Seed Sci. – 1997. – Т. 41, № 2. – P. 39–50.

15. Мусич В. Н., Бондарь Г. П. Изучение морозостойкости озимой пшеницы Одесская 16 в системе моносомного анализа // Биологические аспекты изучения и рационального использования животного и растительного мира. – Рига, 1981. – С. 70–71.

16. Ригин Б. В., Барашкова Э. А. Генетический анализ устойчивости к морозу сорта Мироновская 808 с использованием анеуплоидов // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. – Т. 85, № 1. – С. 23–29.

17. Бессараб К. С., Ефремов А. А., Жиров Е. Г. Морозостойкость замещенных линий Безостой 1 (Альбидум 114) // Селекция и генетика пшеницы. – Краснодар, 1985. – С. 103–109.

18. Sutka J., Kovacs G., Veisz O. Substitution analysis of the frost resistance and winter hardiness of wheat under natural and artificial conditions // Cereal Res. Commun. – 1986. – V. 14 (1) – P. 49–53.

19. Galiba G., Quarrie S. A., Sutka J., Morgounov A., Snape J. W. RFLP mapping of the vernalisation *Vrn 1* and frost resistance *Fr 1* genes on chromosome 5A of wheat // Theor. Appl. Genet. – 1995. – V. 90. – P. 1174–1179.

20. Snape J. W., Semikhodskii A., Fish L., Sharma L. N., Quarrie S. A., Galiba G., Sutka J. Mapping frost tolerance loci in wheat and comparative mapping with other cereals // Acta Agron. Hung. – 1997. – V. 45. – P. 265–270.

21. Toth B., Galiba G., Feher E., Sutka J., Snape J. W. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V. 107. – P. 509–514.

22. Vagujfalri A., Galiba G., Cattivelli L., Dubkovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // Mol. Genet. Genomics. – 2003. – V. 269. – P. 60–67.

23. Peleman J. D., Rouppe van der Voort J. The challenges in marker assisted breeding // Eucarpia leafy Vegetables. – 2003. – V. 21 (1). – P. 125–130.

24. Pilipenco M. V., Chebotar S. V., Fayt V. I., Sivolap Yu. M. Microsatellite marker analysis of winter hardiness in wheat // Eur. Wheat Neuploid Co-operative Newsletter. – Prague, 2006. – P. 117–120.

25. Файт В. І. Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці // Вісник аграрної науки. – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 18–26.

26. Феоктістов П. О., Гаврилов С. В., Ляшок А. К. та ін. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах півдня України: Метод. рекомендації. – К.: Видавничий центр НАУ, 2006. – 36 с.

27. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под ред. Ю. М. Сиволапа. – К.: Аграрна наука, 1998. – С. 34–40.

28. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.

М. В. Галаєва¹, В. І. Файт², С. В. Чеботар¹, А. В. Галаєв¹,
Ю. М. Сиволап¹

¹Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, тел.+38 (0482) 39 52 27, e-mail: genome2006@mail.ru

²Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения (СГИ – НЦСС) НААН Украины, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, e-mail: faygen@ukr.net

МОРОЗОСТОЙКОСТЬ РЕКОМБИНАНТНО-ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО АЛЛЕЛЬНОМУ СОСТАВУ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ХРОМОСОМЫ 5В

Резюме

Исследована морозостойкость и проанализированы по микросателлитным локусам длинного плеча хромосомы 5В родительские формы и рекомбинантно-инбредные линии F₇ комбинации скрещивания Лузановка одесская/Одесская красноколосая. Изучена связь аллельных различий микросателлитных локусов с уровнем морозостойкости линий. Показано, что 11–13,8% различий по уровню морозостойкости линий связаны с аллельными различиями по локусу Xcfd7-5ВL.

Ключевые слова: озимая пшеница, морозостойкость, микросателлитные локусы.

M. V. Galaeva¹, V. I. Fayt², S. V. Chebotar¹, A. V. Galaev¹, Yu. M. Sivolap¹

¹South Plant Biotechnology Centre, Ovidiopolska dor., 3,
Odesa, 65036, Ukraine, e-mail: genome2006@mail.ru

²Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed
and Cultivar Investigations, Ovidiopolska dor., 3,
Odesa, 65036, Ukraine, e-mail: faygen@ukr.net

**FROST RESISTANCE OF WINTER WHEAT RECOMBINANT-INBRED LINES
DIFFERING TO MICROSATELLITE LOCI ALLELES OF 5B CHROMOSOME**

Summary

The analysis of frost resistance and microsatellite locus analysis of 5B chromosome long arm were performed on parental varieties and recombinant-inbred lines F₇ derived from a cross between Luzanovka odesskaya and Odesskaya krasnokolosaya. Association of allelic differences of microsatellite loci with the level of frost resistance was studied. Allelic differences for *Xcfd7-5BL* locus were associated with 11–13,8% of frost resistance differences.

Key words: winter wheat, frost resistance, microsatellite loci.