

УДК 575.16:577.2:58.036.5:633.11

В. И. ФАЙТ, д. б. н., зам. дир., зав. отд.,
И. А. БАЛАШОВА, к. б. н., вед. науч. сотруд.,
М. В. ГАЛАЕВА, к. б. н., мл. науч. сотруд.
СГІ–НЦСС, Одесса
e-mail: faygen@ukr.net

МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОВ КАЧЕСТВЕННЫХ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ АДАПТИВНОСТИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.)

Обсуждается маркирование главных генов Vrn-1, Ppd-1 и QTL темпов колошения и морозостойкости. Выявлены новые ДНК-маркеры гена Vrn-D1a и микросателлитные локусы, ассоциированные с морозостойкостью растений и продолжительностью периода до колошения. Идентифицировано генотипы около 200 сортов пшеницы мягкой озимой разного эколого-географического происхождения и показаны достоверные различия частот аллелей локусов Ppd-D1, Xgwm182–5D и Xcfd7–5B, что свидетельствует о селекционной или адаптивной ценности конкретных аллелей указанных локусов для определённых условий.

Ключевые слова: пшеница, ДНК-маркеры, гены, микросателлитные локусы, яровизация, фотопериод, морозостойкость.

Введение. Для озимых культур адаптация, в первую очередь связана с факторами перезимовки, в частности с реакцией на низкотемпературный стресс. Генетическое изучение морозостойкости показало, что данный признак относится к разряду количественных [1] и контролируется несколькими аддитивными генами [2], фенотипическое проявление которого зависит от действия многих составляющих. Адаптация растений к конкретным условиям может быть существенно улучшена путем манипулирования генами *Ppd*, *Vrn*, *Vrd* и *Eps*. Указанные системы генов определяют тип и темпы развития и общую продолжительность жизненного цикла, вследствие чего существенно влияют на уровень адаптивности растений к условиям осенне-зимнего, и весенне-летнего периода, а также на формирование реального урожая [3, 4]. В связи с этим возникает необходимость привлечения методов молекулярного маркирования для идентификации и отбора хозяйственно ценных рекомбинантов, несущих определенные аллели генов *Ppd*, *Vrn*, *Vrd* и *Eps* или их сочетания. Эффективность подобного подхода к решению экспериментальных задач была показана ранее на примере получения молекулярных маркеров к определенным генам, ответственным за темпы развития мягкой пшеницы [5, 6].

В то же время темпы колошения, как и морозостойкость, являются классическим количественным признаком, различия которого контролируются полигенными системами, большинство эффектов их отдельных локусов минорные и не идентифицируются по качественным признакам. Вследствие этого для общего генетического анализа темпов колошения, как и морозостойкости, целесообразно применять методы количественной генетики, в частности идентификацию QTL. Развитие методов молекулярно-генетического анализа показало широкие возможности выявления ДНК-маркеров QTL морозостойкости [7, 8] и темпов колошения [9, 10].

В связи с вышеизложенным, цель настоящей работы — выявление молекулярных маркеров сцепленных с генами *Vrn* и *Ppd*, отвечающих за чувствительность к яровизации и фотопериоду, а также QTL продолжительности периода до колошения и морозостойкости пшеницы.

Материалы и методы. Исследования проводили в 2000–2014 гг. В качестве исходного материала для маркирования генов *Vrn-1*, *Ppd-1*, QTL продолжительности периода до колошения и морозостойкости использовали: почти изогенные по *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* линии сортов Мироновская 808, Одесская 16, Скороспелка 36, Triple Dirk C; нулли-тетрасомные (5-я группа хромосом) линии сорта Chinese Spring; замещенные по 2-й группе хромосом линии сорта Mercia и по 2D хромосоме линии сортов Avalon, Norman, Rendezvous, Brigant, Brimstone; расщепляющиеся популяции от скрещивания различающихся по наличию/отсутствию определенного гена темпов развития (F_2 — Мироновская 808 x Мироновская 808/*Vrn-D1*; F_2 и F_3 — Одесская 16 x Avalon/2DCiano-67) или по продолжительности периода до колошения (F_2 — Омская озимая/Nambu-Комуги), или уровню морозостойкости (F_2 — Обрий/Прогресс, Эритроспермум 2917/Одесская 132, Альбидум 114/Одесская 132, Лузановка одесская/Одесская красноколосая) генотипов; рекомбинантно-инбредные линии (Mercia // Mercia/2D Ciano 67 и Лузановка одесская/Одесская красноколосая), а также яровые и озимые сорта разного эколого-географического происхождения.

Анализ молекулярно-генетического полиморфизма проводили с помощью различных модификаций поли- и монолокусной ПЦР: RAPD, ISSR, SSR, STS. Экстрагировали ДНК из проростков или зерен методом СТАВ [11]. Амплификацию осуществляли на приборе Терцик («ДНК-технология», Россия). Продукты амплификации фракционировали в 2 %-м агарозном геле с окрашиванием Et.Br и в 10–12 %-м полиакриламидном геле. Визуализацию продуктов амплификации в ПААГ проводили путем их окрашивания 0,012 М $AgNO_3$. Молекулярную массу продуктов амплификации определяли относительно маркеров pUC18/MspI с помощью компьютерной программы «Image Master 1D Elite» (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

В зависимости от задач эксперимента семена изучаемых генотипов высевали осенью на опытном поле отдела общей и молекулярной генети-

ки СГІ — НЦСС на ділянках 3 м² по 500 всхожих зерен на м² или на одно-рядкових ділянках довжиною 1 м по 20 рослин в ряду з площею живлення 30х5 см², или после пророщування и яровизації определеної продовжителюности проростки висаживали в 5-літрові судини з ґрунтом на вегетационній площадці или в світлих камерах фитотрона. Оценку уровня фотопериодической чутливості образцов осуществляли при сравненні дати колошення изучаемых генотипов в условиях удлиненого и укороченого фотопериода. Для идентификації генотипов сортів, ліній по генам *Vrn* и *Ppd* використовували гібридологічний аналіз [12, 13].

Для определения продовжителюности периода до колошення (ПВК) во время вегетации у отдельных рослин в условиях фитотрона и при высадке проростков на вегетационній площадці отмечали дату колошення с использованием пергаментных етикеток. В поле дату колошення отмечали при наличии на ділянці 75 % выколосившихся рослин. Морозостойкость (75–90 рослин каждого генотипа) оценивали на стадії проростков [14, 15] и рослин в фазе кущения [16]. Статистический аналіз полученных результатов проводили по общепринятым методикам [17].

Метеорологічні умови за період проведення досліджень включали весь спектр лімітуючих факторів середовища, розповсюджені в Степи України. Это позволило об'єктивно оцінити вихідний матеріал по усередненій адаптивності к даним умовам.

Результаты и обсуждение. Ефективність пошуку маркерів, сцеплених з генами, контролюючими якісні або кількісні ознаки, во мно́гому визначається використовуваним вихідним генетичним матеріалом. Наличие рекомбінантно-інбридних, замещених, почти изогенных ліній и модельных F₂ популяцій позволило оцінити можливості молекулярного маркування генів *Vrn-D1a* и *Ppd-D1a*, а також QTL морозостійкості и темпов колошення.

Маркирование гена *Vrn-D1*. Для виявлення маркерів генів *Vrn-1* проводили аналіз ДНК изогенных по *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* ліній чотирьох озимих сортів Triple Dirk, Одеська 16, Мироновська 808, Скоропелка 3б, что позволило на перших етапах пошуку проводити скринінг детектируемых поліморфних ампліконов. Використовуваний вихідний генетичний матеріал відрізняється крайне низким рівнем поліморфізму при практично повному відновленні генофонду рекуррентного родителя у изогенных ліній. Приміняючи різні модифікації полі-и монолокусної ПЦР, в загальній складності, детектировано більше 2 тис. продуктів ампліфікації, из которых только 8 являлись поліморфними [18]. Так, при проведенні RAPD-ПЦР с праймером p.116 [19] поліморфний амплікон 657 п. н. обнаружен у изогенных ліній сортів Triple Dirk, Одеська 16, Мироновська 808, Скоропелка 3б доміантних по *Vrn-D1*. Також у даних ліній обнаружен поліморфний ділянок ДНК при проведенні ISSR-ПЦР с праймером (AGC)₆G. Поліморфізм виражався в відсутності продукту 850 п. н., что обозначается, как null-аллель. Для оцін-

ки локализации потенциальных маркеров в 5D хромосоме использовали нулли-тетрасомные линии сорта Chinese Spring, который моногенно доминантен по гену *Vrn-D1*. Поскольку не исключается возможность преобразования доминантного маркера в более совершенный кодоминантный, RAPD-фрагмент был секвенирован, проведен дизайн праймеров, что позволило предложить кодоминантный ПЦР-тест, при проведении которого детектируются фрагменты, идентифицирующие рецессивный и доминантный аллели указанного гена.

Для установления сцепления доминантного и кодоминантного маркеров с геном проводили анализ растений расщепляющейся популяции F_2 Мироновская 808/Мироновская 808-*Vrn-D1*, сопоставляя фенотип и данные RAPD- и STS-ПЦР (рис. 1). Анализ полученных результатов свидетельствовал, что расстояние между STS-маркером и геном составляет 1 сМ. Применение ISSR-маркера, которым являлся null-аллель 850 п. н., имеет свои особенности и ограничения, что было установлено благодаря наличию разнообразного генетического материала, а также данным по использованию RAPD- и STS-маркеров. Показано, что в гибридной популяции null-аллель детектируется только у доминантных гомозигот, а при проведении анализа сортов различной селекции маркируются только моногенно доминантные генотипы, в данном случае моногенно доминантные по *Vrn-D1a*. В результате проведенных исследований предложено несколько ДНК-маркеров, применение которых способствует объективной оценке аллельного состояния гена *Vrn-D1* [18].

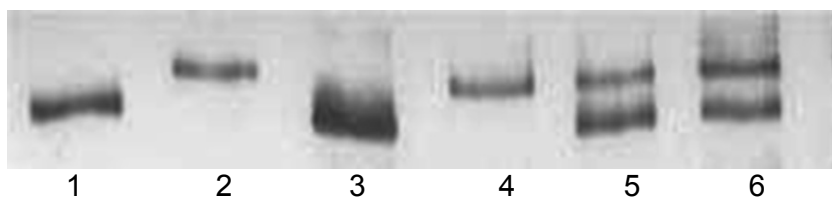


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов STS-ПЦР ДНК растений популяции F_2 Мироновская 808 / Мироновская 808-*Vrn-D1*: 1, 3 — яровые гомозиготы (раннее колошение); 2, 4 — озимые гомозиготы (отсутствие колошения); 5, 6 — гетерозиготы (позднее колошение)

Маркирование гена *Ppd-D1a*. Апробированная схема поиска маркеров, сцепленных с конкретным геном, применялась и при маркировании гена *Ppd-D1a*, расположенного на 2D хромосоме. При проведении ISSR-ПЦР с праймером (AG)9C у замещенных по 2D хромосоме линий сортов Avalon, Brigant, Norman, Rendezvous и сорта Ciano 67 выявлен null-аллель 350 п. н. Такого рода маркер может детектироваться у моногенно доминантных генотипов. Анализ ДНК набора РИЛ Mercia x Mercia/2D Ciano 67, охарактеризованных по фоточувствительности, показал отсутствие продукта 350 п. н. у слабофоточувствительных линий. Тесное сцепление маркера с геном — 1,9 сМ установлено при анали-

зе популяції F_2 Одеськая 16 // Avalon/2D Ciano 67. Об'єктивність отбору із популяції F_2 домінують гомозигот по вказаному маркеру підтверджена при аналізі покоління F_3 [20]. Тем не менше результати ідентифікації *Ppd*-генотипів сортів озимої пшениці путем гібридологічного і ISSR аналізу совпадали тільки в 44 % випадків. Ефективність ідентифікації гена *Ppd-D1a* по ISSR-маркеру обмежена групою сортів, маючих загальне походження. Так, у замещенних по 2D хромосомі ліній, набору РІЛ і гібридної популяції донором гена *Ppd-D1a* являвся мексиканський яровий сорт Ciano 67. У озимих сортах української селекції null-аллель 350 п. н. детектований виключно у сортів, в родословній яких присутствує Red River 68. В свою чергу загальним родителем сортів Red River 68 (США) і Ciano 67 (Мексика) являється мексиканський сорт Sonora 64 (генотип *Ppd-D1a Ppd-B1a*). Швидше за все у ряду мексиканських ярових сортів в зоні локалізації гена *Ppd-D1* існує мутація в одному з ділянок праймування (AG)9C, яка виявляється при проведенні ISSR-ПЦР. Данна мутація успадковалася спільно з ділянкою хромосоми і домінують *Ppd-D1a*, в тому числі при створенні сорту Red River 68 і далі групою українських озимих сортів (рис. 2).

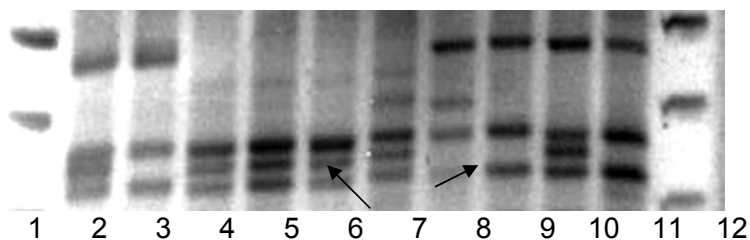


Рис. 2. Электрофореграмма ISSR-ПЦР ДНК сортов озимой мягкой пшеницы с использованием праймера (AG)9C: 2 — Безостая 1; 3 — Обрий; 4 — Скороспелка 3б; 5 — Лада одесская; 6 — Лузановка одесская; 7 — Федоровка; 8 — Тира; 9 — Знахидка; 10 — Mercia 2D; Ciano 67; 1, 12 — маркер мол. веса pUC-19/Msp1

Впоследствии Beales et al. [21] была выявлена делеция в промоторе доминантного гена *Ppd-D1* и разработаны аллель-специфические ПЦР-тесты для идентификации *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* генотипов. При проведении ДНК-анализа озимых и яровых сортов продукт амплификации 288 п. н., характерный для аллеля *Ppd-D1a*, был выявлен у 122 (70,5±3,5 %) из 47 образцов (27,2±3,4 %) — 414 п. н., что свидетельствует о наличии рецессивного аллеля *Ppd-D1b* [22]. В выборке яровых сортов частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* не различались (оба по 50,0±11,2 %). У озимых сортов частота аллеля *Ppd-D1a* (77,5±3,7 %) значительно выше таковой *Ppd-D1b* (22,5±3,7 %). Следовательно, слабая реакция на фотопериод обусловленная присутствием в генотипе гена *Ppd-D1a*, является одним из необходимых условий для реализации потенциала урожайности озимых сортов, которые чаще всего возделывают в более южных районах

с относительно мягкой зимой и укороченным естественным днем. Яровую пшеницу возделывают, как правило, в северных районах с продолжительным естественным летним днем, и генотипы *Ppd-D1a* в данных условиях не обладают преимуществом по урожаю зерна [23].

Превышение частоты генотипа *Ppd-D1a* по сравнению с таковой генотипа *Ppd-D1b* отмечено и в выборках озимых сортов разных регионов (табл. 1), за исключением сортов Востока Украины (Донецк, Луганск, Харьков), где частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* равны ($50,0 \pm 11,8\%$). При этом генотип *Ppd-D1b* на Севере (Белая Церковь, Киев, Мироновка) и Юге (Одесса) Украины идентифицирован только у сортов, районированных до 60–70 годов XX столетия. У сортов более позднего периода селекции выявлен генотип *Ppd-D1a*. Достоверные различия частот *Ppd-D1a* или *Ppd-D1b* генотипов у выборках сортов разных регионов и их отличие от таковых общего набора свидетельствуют о селекционной ценности указанных генотипов для определённых условий выращивания.

Таблица 1

Частоты генотипов *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b* в выборках сортов разных регионов

Регион	Всего		<i>Ppd-D1a</i>		<i>Ppd-D1b</i>	
	n	$p \pm S_p, \%$	n	$p \pm S_p, \%$	n	$p \pm S_p, \%$
Общая выборка	129	100,0	100	$77,5 \pm 3,7$	29	$22,5 \pm 3,7$
Восток Украины	18	100,0	9	$50,0 \pm 11,8$	9	$50,0 \pm 11,8$
Юг Украины	64	100,0	60	$93,7 \pm 3,1$	4	$6,3 \pm 3,1$
Север Украины	7	100,0	6	$85,7 \pm 13,2$	1	$14,3 \pm 13,2$
Западная Сибирь	7	100,0	5	$71,4 \pm 17,1$	2	$28,6 \pm 17,1$
Северный Кавказ	15	100,0	15	$100,0 \pm 5,6$	0	$0,0 \pm 5,6$

Маркирование QTL продолжительности периода до колошения.

Маркирование QTL принципиально не отличается от такового генов качественных признаков. Задача состоит в выявлении различий аллельного состояния микросателлитного локуса, которое ассоциируется с различиями по фенотипическому проявлению признака у исследуемого материала. Для выявления QTL темпов колошения проводили SSR-ПЦР по 25 микросателлитным локусам более рано (Nambu Komugi — 9, Знахидка одесская — 10, Скороспелка 3б — 11, Triple Dirk С — 13 мая) и более поздно колосящихся (Мироновская 808–20, Ульяновка — 21, Л326–25, Омская озимая — 26 мая) сортов из рабочей коллекции отдела генетики СГІ–НЦСС. Первичный скрининг позволил рассматривать в качестве потенциальных маркеров QTL темпов колошения микросателлитные локусы *Xgwm512–2AS*, *Xgwm429–2B* и *Xbarc17–1A*. Сопоставление данных маркерного анализа ДНК растений популяции F_2 Омская озимая/Nambu Komugi (рис. 3) с продолжительностью периода до колошения свидетельствовало, что альтернативные аллели локусов *Xgwm512* и *Xgwm429* обуславливали 10,4 и 8,9 % различий по указанному признаку соответственно. Аналогичный анализ по локусу *Xbarc17* достоверных различий не выявил [24].

В дальнейшем для выявления QTL темпов колошения проводили анализ ДНК по микросателлитным локусам, картированным на хромосомах 5-й гомеологической группы, разным по срокам колошения 53 сортов озимого типа развития. Наиболее интересные результаты получены при проведении SSR-ПЦП по локусу *Xbarc286–5D*. В изученной выборке сортов выявлено два аллеля 290 и 272 п. н. У сортов, колосившихся 9–15 мая, за единичным исключением, детектирован аллель 290 п. н., а колосившихся 21–26 мая — аллель 272 п. н. В группе сортов, колосившихся 16–20 мая, соотношение аллелей 290 и 272 п. н. составляло 8 к 10 соответственно. В среднем за три года изучения сорта-носители аллеля 290 п. н. локуса *Xbarc286* колосились на 14,3, а аллеля 272 п. н. — на 20,1 суток (отсчет от даты 1 мая). Данное соотношение по продолжительности периода до колошения между двумя группами сортов сохранялось все три года изучения.

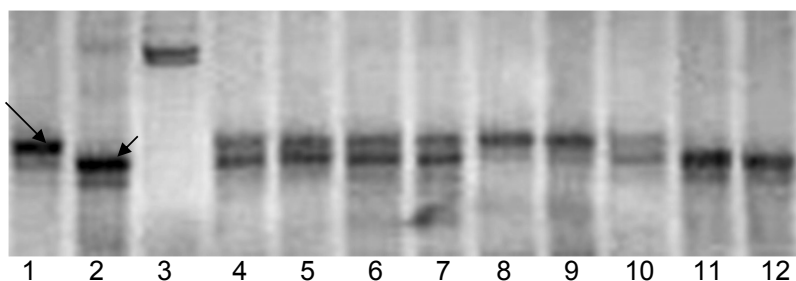


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов SSR-ПЦП по локусу *Xgwm429* ДНК растений популяции F_2 комбинации скрещивания Омская озимая / Nambu-Komugi: 1 — Nambu Komugi; 2 — Омская озимая; 3 — маркер мол. веса рUC-19/Msp1; 4, 5, 6, 7, 10 — гетерозиготы по маркерному локусу; 8, 9 — ДНК рано колосющихся растений F_2 ; 11, 12 — ДНК поздно колосющихся растений F_2

Маркерный анализ по локусу *Xbarc286* следует проводить в комплексе с маркированием гена *Ppd-D1*, поскольку сочетание аллелей *Ppd-D1b/272* п. н. способствует увеличению периода до колошения (позднеспелости), а *Ppd-D1a/290* п. н. сокращению данного показателя (скороспелости). Присутствие в генотипе сорта аллелей *Ppd-D1a/272* п. н. характерно преимущественно для среднеспелых и значительно реже поздно колосющихся сортов [25].

Преимущественное распространение аллеля 290 п. н. у сортов с ранними, а аллеля 272 п. н. с поздними сроками колошения позволяет рекомендовать данный микросателлитный маркер для прогнозирования продолжительности периода до колошения у озимого сортимента. У наиболее рано колосющихся сортов присутствуют «ранние» аллели локусов *Xgwm512* и *Xgwm429*. В частности, у сорта Nambu Komugi, который является наиболее раннеспелым в исследованном наборе, детектированы все три «ранних» аллеля микросателлитных локусов, которые рассматривались в данной работе как маркеры QTL темпов колошения.

Выявление микросателлитных локусов, ассоциированных с морозостойкостью F_2 популяций. Оценивали морозостойкость F_2 популяций Обрий/Прогресс, Эритроспермум 2917/Одесская 132, Альбидум 114/Одесская 132, Лузановка одесская/Одесская красноколосая и их родительские формы. Уровень морозостойкости проростков F_2 популяции определяется уровнем морозостойкости родительских компонентов и продолжительностью закаливания [26]. Морозостойкость проростков при -12°C изученных родительских сортов при закаливании 12 суток варьировала от 22 (Эритроспермум 2917) до 67 % (Лузановка одесская), а при 24 сутках — от 13 (Обрий) до 74 % (Лузановка одесская). При этом из четырех F_2 популяций только у одной Лузановка одесская/Одесская красноколосая выявлены достоверные различия между родительскими формами независимо от продолжительности закаливания (38 и 31 % при 12 и 24 сутках) и отсутствие реакции родительских сортов (67 и 74 % соответственно у сорта Лузановка одесская; 29 и 43 % соответственно у сорта Одесская красноколосая) и растений F_2 (44 и 40 % соответственно) на продолжительность закаливания.

Таблица 2

Морозостойкость групп растений популяции F_2
Лузановка одесская/Одесская красноколосая — носителей альтернативных аллелей локусов *Xbarc 117–5A* и *Xgwm 156–5A* при продолжительности закаливания 12 и 24 суток,
% живых растений

Локус	Гено-тип, п. н.	12 суток			24 суток		
		живых	всего	%	живых	всего	%
<i>Xbarc 117–5A</i>	224	12	36	33	26	47	55
	230	25	45	56	9	29	31
НСР _{0,05}				22			23
<i>Xgwm 156–5A</i>	311	9	29	31	15	39	38
	290	23	39	59	13	39	33
НСР _{0,05}				23			-

При использовании праймеров к 15 МС локусам выявлено полиморфизм ДНК сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая по пяти из них: *Xbarc 117–5A*, *Xbarc 330–5A*, *Xgwm 156–5A*, *Xbarc 319–5A* и *Xgwm 182–5D*. Сопоставление двух групп растений F_2 — носителей альтернативных аллелей по каждому из пяти полиморфных локусов позволило выявить достоверные аллельные различия по морозостойкости для двух локусов *Xbarc 117–5A* и *Xgwm 156–5A* (табл. 2).

Продолжительность первой фазы закаливания 12 суток способствовала формированию достоверно большей морозостойкости растений F_2 -носителей аллеля 230 п. н. локуса *Xbarc 117–5A* или аллеля 290 п. н. локуса *Xgwm 156–5A*, характерных для сорта Одесская красноколосая. Увеличение продолжительности первой фазы закаливания с 12 до 24

суток приводило к смене рангов по морозостойкости генотипов-носителей альтернативных аллелей каждого из локусов. Так, морозостойкость растений с аллелем 224 п. н. локуса *Xbarc 117–5A* от сорта Лузановка одесская в данном варианте была существенно выше (на 24 %) морозостойкости растений с аллелем 230 п. н. сорта Одесская красноколосая. Различия двух групп растений F_2 — носителей альтернативных аллелей локуса *Xgwm 156–5A* при продолжительности закаливания 24 суток оказались недостоверными.

Выявление микросателлитных локусов, ассоциированных с морозостойкостью рекомбинантно-инбредных линий. Вследствие достижения и сохранения гомозиготности РИЛ, испытания можно проводить в разные годы и при разных условиях. Исходя из этого, для выявления новых ассоциированных с морозостойкостью МС-локусов использовали РИЛ F_7 Лузановка одесская/Одесская красноколосая [27, 28]. Анализ по 40 микросателлитным локусам, локализованным на хромосомах пятой гомеологической группы, позволил выявить полиморфизм по 11 из них: *Xbarc319–5A*, *Xbarc330–5A*, *Xgwm156–5A*, *Xwmc415–5B*, *Xbarc4–5B*, *Xbarc88–5B*, *Xbarc89–5B*, *Xcfd7–5B*, *Xgpw3191–5B*, *Xgwm182–5D*, *Xcfd8–5D* между сортами Лузановка одесская и Одесская красноколосая. По указанным полиморфным локусам идентифицирована 101 РИЛ. Соотношение расщепления по аллелям каждого локуса достоверно соответствовало теоретически ожидаемому (χ^2 равен от 0,13 до 4,60, при $\chi^2_{0,05}=5,99$ для $df=2$), что свидетельствует о достаточно полном сохранении генетического разнообразия в процессе создания РИЛ.

Сопоставление двух групп линий-носителей альтернативных аллелей по каждому из полиморфных локусов хромосом пятой группы позволило выявить достоверное влияние аллельных различий локусов *Xbarc330–5A*, *Xcfd7–5B*, *Xwmc415–5B*, *Xgpw3191–5B*, *Xgwm182–5D*, *Xcfd8–5D* на морозостойкость (табл. 3).

Аллельные различия локуса *Xbarc330–5A* определяли 12 % фенотипического разнообразия популяции РИЛ Лузановка одесская/Одесская красноколосая по морозостойкости растений в фазе кущения только в марте. Морозостойкость линий с аллелем 104 п. н. от морозостойкой родительской формы Лузановка одесская была большей таковой линий с аллелем 106 п. н. от сорта Одесская красноколосая.

Линии с присутствием соответствующего аллеля локуса *Xcfd7–5B*, *Xwmc415–5B* и *Xgpw3191–5B* от сорта Лузановка одесская характеризовались большей морозостойкостью проростков в отличие от линий с присутствием аллелей от сорта Одесская красноколосая. При этом аллельные различия по локусам *Xcfd7–5B* и *Xgpw3191–5B* достоверны во всех трех опытах по промораживанию проростков, а различия по морозостойкости сцепленного с ними локуса *Xwmc415–5B* выявлены только в одном из трех вариантов опыта.

Таблица 3

Морозостойкость проростков ($-12\text{ }^{\circ}\text{C}$) и раскутившихся растений ($-16\text{ }^{\circ}\text{C}$) групп РИЛ F_7 Лузановка одесская/Одесская красноколосая, различающихся по аллелям микросателлитных локусов, % живых растений

Локус	Аллель	Проростки			Кущение		
		1	2	3	февраль 2011	март 2011	январь 2012
<i>Xbarc330–5A</i>	104 п. н. Л*	72	80	86	70	72	79
	106 п. н. О*	76	83	88	69	60	78
НСР _{0,05}		–	–	–	–	12	–
<i>Xcfd7–5B</i>	194 п. н. Л	78	86	90	66	60	76
	204 п. н. О	67	74	81	73	73	82
НСР _{0,05}		9	9	8	–	11	–
<i>Xwmc415–5B</i>	174 п. н. Л	77	87	88	63	63	77
	172 п. н. О	70	76	84	75	69	80
НСР _{0,05}		–	9	–	10	–	–
<i>Xgpw3191–5B</i>	178 п. н. Л	79	89	91	64	62	78
	236 п. н. О	67	72	81	75	70	79
НСР _{0,05}		8	9	7	10	–	–
<i>Xgwm182–5D</i>	165 п. н. Л	79	86	92	69	69	77
	162 п. н. О	68	76	82	68	62	80
НСР _{0,05}		9	9	7	–	–	–
<i>Xcfd8–5D</i>	160 п. н. Л	77	86	89	71	67	77
	162 п. н. О	70	76	84	66	65	80
НСР _{0,05}		–	10	–	–	–	–

Примечание. 104 п. н. Л* — аллель размером 104 п. н. от сорта Лузановка одесская; 106 п. н. О* — аллель размером 106 п. н. от сорта Одесская красноколосая и так далее.

В то же время при промораживании раскутившихся растений при $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ большей морозостойкостью по всем трем сцепленным локусам хромосомы 5В характеризовались линии-носители аллелей сорта Одесская красноколосая. Вместе с тем достоверное влияние аллельных различий на морозостойкость в фазе кущения РИЛ в феврале 2011 года отмечено по локусам *Xwmc415–5B* и *Xgpw3191–5B*, а по локусу *Xcfd7–5B* — в марте 2011 года. Смена рангов генотипов-носителей альтернативных аллелей одного локуса при промораживании проростков и растений в фазе кущения была отмечена ранее [29] и, видимо, объяснима изменениями условий закаливания растений.

Аллельные различия по локусу *Xgwm182–5D* обуславливали 10–11 % различий по морозостойкости проростков двух групп РИЛ Лузановка одесская/Одесская красноколосая — носителей альтернативных аллелей данного локуса. Присутствие аллеля 165 п. н. от сорта Лузанов-

ка одесская способствовало достоверному увеличению морозостойкости проростков и, в отличие от локусов хромосомы 5В, рассмотренных выше, не существенному, но увеличению морозостойкости растений в фазе кущения. По локусу *Xcfd8–5D* наблюдали подобную тенденцию, но различия были достоверными только в одном из опытов по промораживанию проростков.

Частоты аллелей локусов *Xcfd7–5B* и *Xgwm182–5D*. Разный уровень морозостойкости линий F_7 Лузановка одесская/Одесская красноколосая свидетельствовал о неодинаковой селекционной ценности конкретных аллелей микросателлитных локусов *Xcfd7–5B*, *Xwmc415–5B*, *Xgpr3191–5B* и *Xgwm182–5D* по морозостойкости. Вместе с тем селекционная ценность конкретных аллелей для определенных условий может быть получена на основе сопоставления частоты встречаемости в выборках сортов разного географического происхождения.

При микросателлитном анализе у сортов изученной выборки (163 образца) по локусу *Xcfd7–5B* выявлено два аллеля: аллель размером 194 п. н. и null-аллель (отсутствие продукта амплификации) [30]. По микросателлитному локусу *Xgwm182–5D* (выборка 180 сортов) идентифицировано 5 аллелей размером 162, 165, 167, 169 и 174 п. н. [31]. Большинство сортов 85,9 и 87,1 % по локусу *Xcfd7–5B* и *Xgwm182–5D*, соответственно, были линейными с присутствием одного из вышеуказанных аллелей каждого из локусов. Вместе с тем 14,1 % сортов по локусу *Xcfd7–5B* и 12,9 % по локусу *Xgwm182–5D* оказались неоднородными. Каждый из них состоял из двух генотипов с разным их соотношением.

Частота аллеля размером 194 п. н. локуса *Xcfd7–5B* в общей выборке сортов составляла 29,3 %, что почти в 2,5 раза меньше таковой null-аллеля (70,7 %). Аналогичное соотношение частот двух указанных аллелей сохранялось и в выборках сортов разных регионов Украины и России. Вместе с тем относительные различия частот в разных регионах несколько изменялись от 35,6±12,73 % в выборке сортов Севера Украины до 66,2±14,71 — Северного Кавказа. Преимущественное распространение null-аллеля локуса *Xcfd7–5B* в выборке сортов пшеницы озимой Украины и России может свидетельствовать о его селекционной и/или адаптивной ценности для условий указанных стран. В то же время у сортов Юга Украины (в основном СГИ–НЦСС), районированных или внесенных в Государственный реестр до 1996 года, различия частот аллелей локуса *Xcfd7–5B* оказались несущественными (49,8±7,6 и 50,2±7,6 %, соответственно 194 п. н. и null-аллеля). В выборке сортов, районированных или внесенных в Реестр после 1996 года и до настоящего времени, частота null-аллеля локуса *Xcfd7–5B* увеличилась на 37,8 % в сравнении с таковой предыдущего периода селекции, а аллеля 194 п. н. соответственно уменьшилась до 12 % (различия достоверны, $P < 0,01$). Следовательно, селекционный процесс на Юге Украины в последние десятилетия направлен на отбор генотипов с присутствием null-аллеля локуса *Xcfd7–5B*.

По локусу *Xgwm 182–5D* в общей выборке сортов и выборках сортов отдельных регионов с большей частотой от 83 до 53,6 % встречался аллель 165 п. н. (рис. 4), что достоверно выше частот всех других аллелей на 38–83 %, за исключением выборки сортов Поволжья и Западной Сибири. В последнем случае частота аллеля 165 п. н. (54 %) достоверно не отличалась от таковой аллеля 169 п. н. (39 %). Вместе с тем частота аллеля 165 п. н. на севере Украины достоверно превышала на 25 % аналогичный показатель на Юге Украины ($P < 0,01$). Различия частот аллеля 165 п. н. в выборках сортов указанных двух регионов с таковой выборки Поволжья и Западной Сибири, Северного Кавказа и двух последних между собой были несущественными. Аллель 165 п. н. выявлен практически у всех сортов Юга Украины (СГИ–НЦСС) I–V сортосмен (1912–1975). У сортов VI–VII сортосмен (1976–2012) идентифицированы новые аллели локуса *Xgwm 182–5D* с молекулярной массой 162, 167 и 174 п. н., что обусловлено привлечением в селекционный процесс сортов США, Мексики, Европы. Частота аллеля 174 п. н. на Юге Украины составляла 18 %, с тенденцией к снижению на Севере Украины и Северном Кавказе. Аллель 162 п. н. с частотой 20 % выявлен исключительно у сортов Юга Украины, что может свидетельствовать о селекционной ценности указанного аллеля для условий данного региона с точки зрения получения потенциально-го урожая. В то же время аллель 162 п. н. или тесно сцепленный с ним ген, видимо, негативно влияет на уровень морозостойкости растений пшеницы. Слабоморозостойкие сорта Обрий, Одесская красноколо-сая, Ольвия и другие унаследовали аллель 162 п. н. от ярового сорта Red River 68 (США).

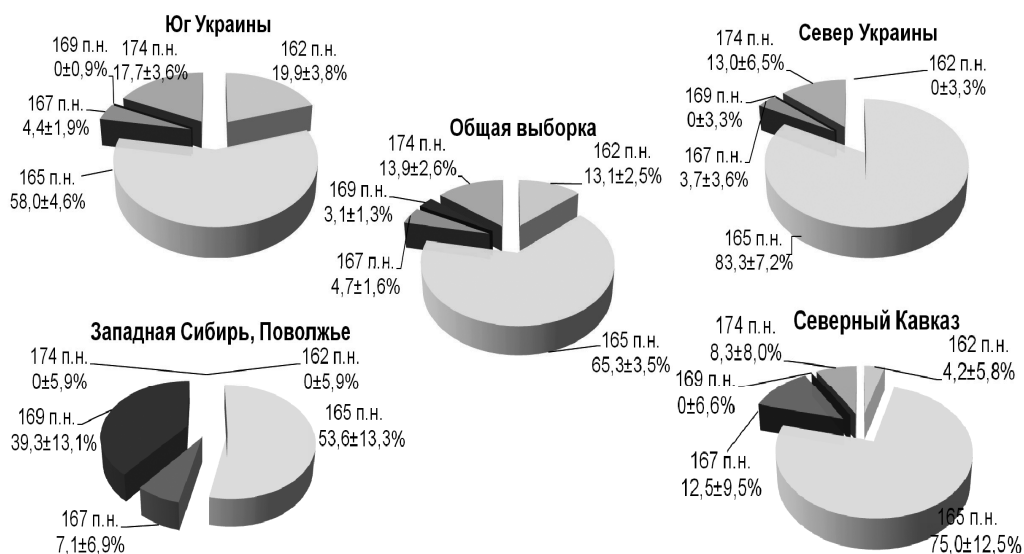


Рис. 4. Частоты аллелей локуса *Xgwm 182–5D* в выборках сортов разных регионов

В отличие от аллеля 162 п. н., аллель 167 п. н. детектирован у сортов разных регионов. Однако его частота оказалась низкой (около 5 % в общей выборке). Аллель 169 п. н. идентифицирован лишь у линейных и неоднородных сортов Западной Сибири и Поволжья. В данной выборке не выявлено ни одного сорта — носителя аллелей 162 или 174 п. н.

Выводы. Использование нескольких методов, основанных на принципах ПЦР, позволило выявить новые ДНК-маркеры к локусу *Vrn-D1a* и микросателлитные локусы *Xbarc 117–5A*, *Xgwm 156–5A*, *Xwmc415–5B*, *Xgprw3191–5B*, *Xcfd7–5B*, *Xgwm182–5D*, ассоциированные с морозостойкостью проростков, *Xwmc415–5B* и *Xgprw3191–5B* — с морозостойкостью раскустившихся растений в середине зимы, *Xbarc330–5A* и *Xcfd7–5B* — с морозостойкостью раскустившихся растений в конце зимы и локусы *Xgwm512*, *Xgwm429* — с продолжительностью периода до колошения.

Идентифицированы генотипы около 200 сортов пшеницы мягкой озимой разного географического происхождения и периодов создания по аллелям локусов *Ppd-D1*, *Xcfd7–5B* и *Xgwm182–5D*. Показаны достоверные различия частот конкретных аллелей. Преимущественное распространение в изученной выборке сортов с присутствием аллеля *Ppd-D1a*, 165 п. н. локуса *Xgwm182–5D* и null-аллеля локуса *Xcfd7–5B* обусловлено селекционной ценностью таких генотипов для условий Юга Украины. Выявленные маркерные локусы рекомендуется использовать вместе с другими методами при отборе из гибридных популяций более морозостойких и скороспелых генотипов на ранних этапах селекции.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sutka J., Galiba G., Veisz O., Snape J. W. Genetic analysis of frost resistance and its contribution to development of frost resistant cereal varieties — A review / J. Sutka, G. Galiba, O. Veisz, J. W. Snape // Plant Breeding and Seed Science. — 1997. — V. 41, № 2. — P. 39–50.
2. Мусич В. Н. Комбинационная способность и типы действия генов у сортов Озимой мягкой пшеницы по признаку морозостойкости / В. Н. Мусич, В. Ф. Герасименко // Генетика. — 1984. — Т. 20, № 12. — С. 2031–2034.
3. Стельмах А. Ф. Эффекты локусов *Vrn* мягкой пшеницы по агрономическим признакам в различных условиях / А. Ф. Стельмах, В. И. Файт // Цитология и генетика. — 1995. — Т. 29, № 4. — С. 54–61.
4. Worland A. J., Börner A., Korzun V., Li W. M., Petrović S., Sayers E. J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats / A. J. Worland, A. Börner, V. Korzun, W. M. Li [et al.] // Euphytica. — 1998. — V. 100, 1–3. — P. 385–394.
5. Хлёткина Е. К. Использование RAPD– и STS–анализа для маркирования генов пятой гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы / Е. К. Хлёткина, Е. А. Салина, И. Н. Леонова // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 10. — С. 1349–1357.
6. Lukman R. Molecular mapping of major genes influencing flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) / R. Lukman Diss. : München, Techn University. — 2003. — 102 p.

7. Toth B. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat / B. Toth, G. Galiba, E. Feher, J. Sutka, J. W. Snape // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — V. 107. — P. 509–514.
8. Vágújfalvi A. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A / A. Vágújfalvi, G. Galiba, L. Cattivelli, J. Dubkovsky // *Mol. Genet. Genomics.* — 2003. — V. 269. — P. 60–67.
9. Kuchel H. Identification of genetic loci associated with ear-emergence in bread wheat / H. Kuchel, G. Hollamby, P. Langridge, H. K. Williams, S. P. Jefferies // *TAG.* — 2006. — V. 111, № 6. — P. 1103–1112.
10. Hanocq E. Detection and mapping of QTL for earliness components in a bread wheat recombinant inbred lines population / E. Hanocq, M. Niarquin, E. Heumez, M. Rousset, J. Le Gouis // *TAG.* — 2004. — V. 110, № 1. — P. 106–115.
11. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / под ред. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграрна наука, 1998. — С. 34–40.
12. Стельмах А. Ф. Каталог сортов яровой мягкой пшеницы по генотипам системы локусов *Vrn* (чувствительность к яровизации) / А. Ф. Стельмах, В. И. Авсенин, А. Н. Воронин. — Изд. 3, доп. — Одесса : ВСГИ, 1987. — 111 с.
13. Файт В. І. Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами Фотоперіодичної чутливості / В. І. Файт, В. Р. Федорова // *Зб. наук. праць СГІ–НАЦ НАІС.* — Одеса, 2007. — Вип. 9(49). — С. 9–21.
14. Мусич В. Н. Об оценке озимых зерновых культур на морозостойкость в зоне Юго-западного селекцентра методом прямого промораживания / В. Н. Мусич // *Экспресс-информация Юго-западного селекцентра.* — Одесса, 1976. — Вып. 1. — С. 157–164.
15. Гаврилов С. В. Підвищення ефективності оцінки озимої пшениці на морозостійкість в умовах штучного клімату / С. В. Гаврилов // *Зб. наук. праць СГІ.* — Одеса, 2006. — Вип. 8(48). — С. 67–73.
16. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах півдня України : метод. рекомендації / [Феоктістов П. О., Гаврилов С. В., Ляшок А. К., І. П. Григорюк, М. Д. Мельничук]. — К. : Видавничий центр НАУ, 2006. — 36 с.
17. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий — М. : Колос, 1973. — 327 с.
18. Балашова И. А., Календарь Р. Н., Файт В. И., Сиволап Ю. М. Создание ДНК маркера к локусу *Vrn-D1* мягкой пшеницы / И. А. Балашова, Р. Н. Календарь, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // *Биотехнология.* — 2002. — № 2. — С. 30–36.
19. Использование *RAPD*-метода для создания ДНК-маркеров к *Vrn* генам / И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап, В. И. Файт, А. Ф. Стельмах // *Цитология и генетика.* — 2001. — Т. 35, № 2. — С. 49–52.
20. Балашова И. А. Маркирование гена *Ppd-D1a* методом *ISSR*–ПЦР / И. А. Балашова, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // *Вісник ОНУ. Біологія.* — 2002. — Т. 7, вип.1. — С. 69–74.
21. Beales J. Pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales, A. Turner, S. Griffiths, J. W. Snape & D. A. Laurie // *Theoretical and Applied Genetics.* — 2007. — V. 115. — P. 721–733.

22. Файт В. И. Идентификация генотипов *Ppd-1* сортов пшеницы мягкой методами генетического и STS — ПЦР анализа / В. И. Файт, И. А. Балашова, В. Р. Федорова, М. С. Бальвинская // Физиология растений и генетика. — 2014. — Т. 46, № 4. — С. 325–336.
23. Dyck J. A., Matus-Cádiz M. A., Hucl P., Talbert L., Hunt T., Dubuc J. P., Nass H., Clayton G., Dobb J., Quick J. Agronomic performance of hard red spring wheat isolines sensitive and insensitive to photoperiod / J. A. Dyck, M. Matus-Cádiz, P. Hucl, L. Talbert, T. Hunt, J. P. Dubuc, H. Nass, G. Clayton, J. Dobb, J. Quick // Crop Sci. — 2004. — V. 44. — P. 1976–1981.
24. Файт В. И. Маркирование QTL продолжительности периода до колошения озимой пшеницы / В. И. Файт, И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 5. — С. 35–40.
25. Файт В. И. Маркирование QTL темпов колошения у доминантных по *Ppd-D1a* генотипов озимой пшеницы / В. И. Файт, И. А. Балашова // Зб. наук. праць СГІ — НЦНС. — Одеса, 2012. — Вип. 19 (59). — С. 26–34.
26. Галаева М. В. Морозоустойчивость F_2 популяций пшеницы мягкой озимой и ее связь с аллелями микросателлитных локусов / М. В. Галаева, В. И. Файт, С. В. Чеботарь, Ю. М. Сиволап // Вісник ХНАУ: Серія Біологія. — 2013. — Вип. 3 (30). — С. 68–75.
27. Галаева М. В. Морозостійкість рекомбінантно-інбредних ліній озимої пшениці, відмінних за алельним складом микросателітних локусів хромосоми 5В / М. В. Галаева, В. І. Файт, С. В. Чеботар, О. В. Галаєв, Ю. М. Сиволап // Вісник ОНУ. — 2011. — Т. 16 (вип. 6). — С. 32–39.
28. Галаева М. В. Зв'язок алелів микросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці / М. В. Галаева, В. І. Файт, С. В. Чеботар, О. В. Галаєв, Ю. М. Сиволап // Цитологія та генетика. — 2013. — Т. 47, № 5. — С. 3–11.
29. Мокану Н. В. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимоморозостойкости и урожаю у озимой пшеницы / Н. В. Мокану, В. И. Файт // Цитология и генетика. — 2008. — Т. 42, № 6. — С. 28–35.
30. Галаева М. В. Ідентифікація генофонду пшениці м'якої озимої за алелями асоційованого з морозостійкістю микросателітного локусу *Xcfd7-5B* / М. В. Галаева, В. І. Файт, Ю. М. Сиволап // Вісник ХНАУ: Серія Біологія. — 2013. — Вип. 1(28). — С. 72–77.
31. Галаева М. В. Генетическое разнообразие генофонда мягкой озимой пшеницы по ллелям связанного с морозоустойчивостью микросателлитного локуса *Xgwm182-5D* / М. В. Галаева, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // Biopolimers and Cell. — 2013. — V. 29, N 6. — P. 487–492.

Надійшла 02.07.2015.

UDC 575.16:577.2:58.036.5:633.11

Fayt V. I., Balashova I. A., Galaeva M. V. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

MARKING OF GENES FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE TRAITS OF ADAPTABILITY FOR BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

The main genes *Vrn-1*, *Ppd-1* and QTL for heading time and frost resistance are being discussed. New DNA markers for gene *Vrn-D1a* and microsatellite loci associated with plant frost resistance and pre-heading period are revealed. Genotypes of 200 bread wheat varieties of different ecological and geographical origin are identified, and significant differences in the frequency of alleles for loci *Ppd-D1*, *Xgwm182–5D* and *Xcfd7–5B* are shown and indicate the adaptive and breeding value of specific alleles of mentioned loci for certain conditions.

УДК 575.16:577.2:58.036.5:633.11

Файт В. І., Балашова І. А., Галаєва М. В.

МАРКУВАННЯ ГЕНІВ ЯКІСНИХ ТА КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК АДАПТИВНОСТІ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.)

Обговорюється маркування головних генів *Vrn-1*, *Ppd-1* і QTL темпів колосіння та морозостійкості. Виявлено нові ДНК-маркери до гена *Vrn-D1a* і мікросателітні локуси, асоційовані з морозостійкістю рослин або тривалістю періоду до колосіння. Ідентифіковано генотипи близько 200 сортів пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження і показані достовірні відмінності частот алелів локусів *Ppd-D1*, *Xgwm182–5D* і *Xcfd7–5B*, що свідчить про селекційну або адаптивну цінність конкретних алелів вказаних локусів для певних умов.