

УДК 577.2:58.036.5:633.11

М. В. ГАЛАЄВА, к. б. н., мол. наук. співроб.,

В. І. ФАЙТ, д. б. н., заст. дир., зав. від.

СГІ–НЦНС, Одеса

E-mail: faygen@ukr.net

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА АСОЦІАЦІЇ АЛЕЛІВ ЛОКУСУ *XCFD7–5B* З ГОСПОДАРСЬКО ЦІННИМИ ОЗНАКАМИ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

*Генотипи 164 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження ідентифіковано за алелями локусу *Xcfd7–5B*. Виявлено два алельних варіанти локусу: алель розміром 194 п. н. та null-алель (відсутність продукту ампліфікації). У загальній виборці та в вибірках сортів окремих регіонів частота null-алеля істотно перевищувала частоту алеля 194 п.н. Перевага null-алеля серед сортів усіх регіонів свідчить про його селекційну та адаптивну цінність. Алельні відмінності локусу *Xcfd7–5B* істотно впливають на формування ряду агрономічних ознак. Null-алель локусу *Xcfd7–5B* сприяв суттєвому скороченню тривалості періоду до колосіння, зниженню висоти рослин, збільшенню маси зерна колоса і недостовірному підвищенню врожаю зерна.*

Ключові слова: *Triticum aestivum L.*, мікросателітні локуси, врожай, морозостійкість.

Вступ. У наш час у зв'язку з розвитком ДНК-технологій молекулярні маркери набувають у науковців дедалі більшого значення. ДНК-маркери широко застосовуються для вирішення багатьох завдань генетики і селекції рослин, а саме для генетичного картування, аналізу філогенетичних взаємин серед видів і сортів сільськогосподарських культур, диференціації та ідентифікації сортів рослин, а також для маркування генів, що мають важливе господарське значення [1]. Впровадження ДНК-маркерів дозволить значно збільшити ефективність селекції шляхом цілеспрямованого маніпулювання конкретними генами.

Одним з найбільш перспективних типів ДНК-маркерів є мікросателітні маркери. У наших попередніх дослідженнях пшениці м'якої озимої показано, що локалізований на 5В хромосомі мікросателітний локус *Xcfd7–5B* асоціюється з морозостійкістю [2]. Разом із тим продуктивні можливості генотипу обумовлені не тільки кількістю рослин, що вижили після дії морозу, але і здатністю зберігати рівень врожаю та його складових [3]. Окрім того, між морозостійкістю і комплексом основних господарсько важливих ознак, що забезпечують необхід-

ний рівень продуктивності, відзначено наявність зворотної кореляційної залежності [4]. В той же час продуктивність і стійкість сортів до низьких негативних температур певною мірою пов'язані зі скоростиглістю та висотою рослин [5]. Виходячи з цього, доцільним було оцінити зв'язок алельних відмінностей локусу *Xcfd7–5B* не тільки з морозостійкістю, а й з біологічними та агрономічними ознаками.

Мета дослідження — ідентифікувати сорти озимої м'якої пшениці різних регіонів і вивчити ефекти алелів локусу *Xcfd7–5B* за комплексом господарсько цінних ознак в умовах степу Причорномор'я.

Матеріали і методи. В якості вихідного матеріалу використовували 164 сорти озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. різного географічного походження, повний перелік яких подано в таблицях з експериментальними даними. Серед вивчених генотипів 96 сортів селекції Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ–НЦНС), 41 сорт різних (крім СГІ–НЦНС) селекційних центрів України та 27 сортів Росії.

ДНК виділяли з зеленого листя та 3–5-денних проростків за допомогою СТАВ-буфера [6]. Аналізували ДНК 10 зерен або проростків кожного сорту. ПЛР зі спрямованими праймерами до мікросателітного локусу *Xcfd7–5B* проводили на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила буфер (67 мМтрис-НCl рН 8,8; 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5 мМ MgCl_2 ; 0,01 % Tween-20); 0,2 мМ кожного dNTP; 0,25 мкМпраймера; 20 нг ДНК; 1 од. Таq-полімерази. Поверх реакційного розчину нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Умови реакції: денатурація при 94 °С протягом 30 с (початкова — 2 хв), відпалювання при 60 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 1 хв (заклучна елонгація — 4 хв).

Продукти ампліфікації (10 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 12 % поліакриламідному гелі в 1хТВЕ. Електрофорез в поліакриламідному гелі проводили в апараті для вертикального гель-електрофорезу VE-3 «Helicon» (РФ). Візуалізацію продуктів електрофоретичного розподілу проводили імпрегуванням гелів нітратом срібла. Відеозображення ампліфікованих фрагментів отримували за допомогою відеосистеми «ImageMaster VDS» («AmershamPharmaciaBiotech», США) згідно з інструкцією користувача устаткування. Калібрування молекулярної маси отриманих ампліконів здійснювали з використанням стандарту рUC 19/MspI та 100 bp DNA Ladder.

Для виявлення асоціацій алельних відмінностей локусу *Xcfd7–5B* з проявом господарсько цінних ознак використовували вибірку з 89 сортів, вивчених нами раніше [7]. Посів проводили восени на ділянках 3 м² по 500 схожих зерен на 1 м² на дослідній ділянці відділу загальної та молекулярної генетики СГІ протягом трьох років. При цьому кожен сорт розглядався як окрема повторність. Морозостійкість

оцінювали на стадії проростків при -11°C і рослин у фазі кущіння (метод «пучків») при температурі від -14 до -16°C [8]. Для цього, якщо дозволяли умови року вирощування в I декаді грудня, II декаді січня і I декаді березня відбирали з поля по 75–100 рослин кожного сорту. Температуру проморожування встановлювали, виходячи в кожному конкретному випадку зі сформованих напередодні погодних умов і попередньої візуальної оцінки стану посівів. Зимостійкість визначали в полі шляхом обліку рослин восени в кінці жовтня і навесні тих, що перезимували. Під час вегетації відзначали дату колосіння візуально за наявності на ділянці 75 % рослин, що виколосилася, яку потім перераховували в тривалість періоду до колосіння (ТПК), а також кількість продуктивних пагонів на одиниці площі (КПП). Під час збирання врожаю виконували облік урожаю зерна (УЗ) з ділянки. Після збирання врожаю у 15 рослин кожного сорту враховували висоту рослини (ВР) і масу зерна колоса (МЗК).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методиками [9].

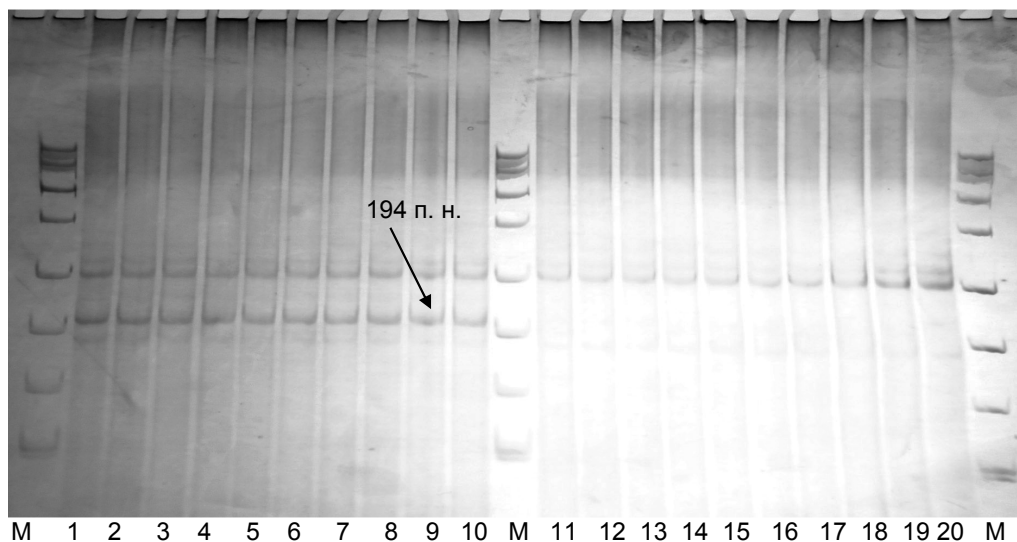


Рис. 1. Електрофореграма в 12 % неденатуруючому ПААГ продуктів ампліфікації ДНК ряду сортів пшениці озимої Одеська 16 та Ульянівка з використанням спрямованих праймерів Cfd7: М — маркер молекулярної маси GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1–10 — індивідуальні рослини сорту Одеська 16; 11–20 — індивідуальні рослини сорту Ульянівка

Результати та обговорення.

Мікросателітний аналіз з використанням спрямованих праймерів до локусу *Xcfd7–5B* дозволив виявити поліморфізм сортів озимої пшениці за вказаним локусом. У вивченій вибірці виявлено два алельних варіанти (рис. 1): алель розміром 194 пн і так званий null-алель (відсутність продукту ампліфікації).

Більшість сортів були однолінійними (141 сорт або 86 %) з присутністю в їхньому генотипі одного з вищевказаних алелів локусу *Xcfd7–5B* (табл. 1). Разом з тим у 23 сортів, або 14 % відзначали наявність поліморфізму за зазначеним локусом. Кожен з таких сортів включав два генотипи (лінії) за алелями локусу *Xcfd7–5B*.

Таблиця 1

Генотипи сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження за алелями локусу *Xcfd7–5B*

Генотип	Сорти
194 пн	Альбідум 114, Безоста 1, Білоцерківська 198, Богдана, Бриз, Буревісник одеський, Вимпел одеський, Гостіанум 237, Диканька, Донецька 48, Елегія, Застава одеська, Зірка, Золотава, Іванівська остиста, Коператорка, Лузанівка одеська, Литанівка, Миронівська 264, Одеська 16, Одеська 26, Одеська 66, Одеська 117, Одеська 120, Одеська 162, Одом, Омська 4, Повага, Прогрес, Спартанка, Українка, Фаворитка, Федорівка, Хуртовина, Ерітроспермум 15, Ерітроспермум 127, Червона
null	Аврора, Альбатрос одеський, Антонівка, Апогей Луганський, Банку, Білоцерківська напівкарликова, Білосніжка, Білява, Бригантина, Бунчук, Ватажок, Вдала, Веснянка, Вікторія одеська, Вихованка одеська, Володарка, Дарунок, Донецька напівкарликова, Донсімба, Донський сюрприз, Заможність, Землячка одеська, Злагода, Знахідка одеська, Золотоколоса, Жайвір, Іллічівка, Кавказ, Казанська 237, Казанська 285, Київська 8, Краснодарська 99, Красуня одеська, Куяльник, Косовиця, Лада одеська, Лан, Лановий, Леля, Лесостепка 75, Либідь, Ліона, Любава одеська, Лютесценс 17, Миронівська 27, Миронівська 65, Миронівська 808, Миронівська остиста, Миронівська ювілейна, Мірхард, Нагорода одеська, Наснага, Небокрай, Ніконія, Обрій, Одеська 265, Одеська 266, Одеська 267, Одеська красноколоса, Одеська остиста напівінтенсивна, Одеська напівкарликова, Оксана, Ольвія, Омська 2, Омська 3, Омська 5, Отаман, Панна, Перемога 50, Подяка, Польовик, Порада, Пошана, Прима одеська, Прометей, Северна заря, Селянка, Сибірська нива, Символ одеський, Сирена одеська, Скіфянка, Скороспелка 36, Служниця одеська, Смуглянка, Станична, Струмок, Супутниця, Тіра, Турунчук, Ульяновка, Фантазія одеська, Фрегат одеський, Харківська 96, Харківська 105, Хвиля, Чайка, Шестопалівка, Експромт, Епоха одеська, Ера, Юна, Юннат одеський, Якір одеський, Ятрань 60
194 пн + null	Альбідум 12, Багратіонівська, Батько, Благодарка одеська, Віген, Дюк, Земка, Кірія, Киянка, Кримка місцева, Міріч, Місія одеська, Одеська 130, Одеська 51, Омська озима, Пересвіт, Південна зоря, Писанка, Подольянка, Прибій, Прокоф'євка, Степова, Ювілейна 75

Переважає поширення будь-якого генотипу конкретного локусу може свідчити про його селекційну і / або адаптивну перевагу для конкретних екологічних умов. Частота лінійних сортів, в генотипі яких присутній null-алель локусу *Xcfd7–5B* (104 сорти або $73,8 \pm 3,70$ %), істотно перевищувала таку генотипу 194 пн в 2,8 раза (37 сортів або

26,2 ± 3,70 %). Дане співвідношення генотипів зберігалося у вибірці сортів СГІ — НЦНС і зменшувалося до 2,2 у сортів України та збільшувалося до 4,8 раза у сортів Росії (рис. 2). Більше поширення генотипу з присутністю null-алеля локуса *Xcfd7–5B* у вибірках сортів озимої пшениці СГІ — НЦНС, України і Росії може свідчити про його селекційну і / або адаптивну цінність для умов зазначених регіонів або країн.

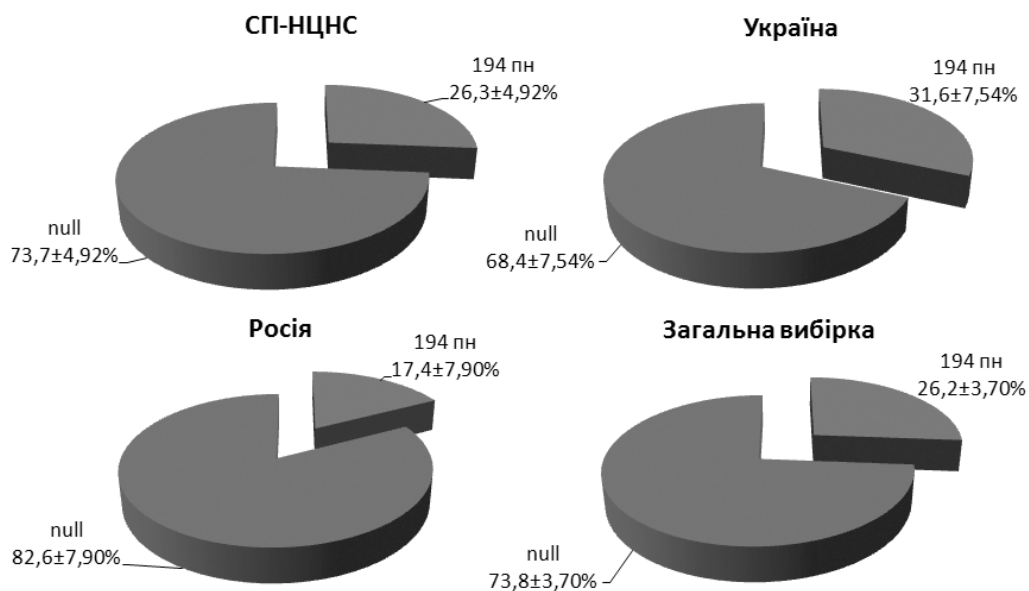


Рис. 2. Частоти генотипів за локусом *Xcfd7–5B* в загальній вибірці сортів і вибірках сортів СГІ — НЦНС, України та Росії

Однак, незважаючи на зміну співвідношення частот генотипів в різних вибірках, частоти генотипів з присутністю null-алеля або алеля 194 пн в різних вибірках сортів істотно не розрізняються ($d < S_{d,xt_{0,05}}$). Разом з тим відзначали тенденцію до збільшення частки сортів-носіїв null-алеля (і, відповідно, зменшення частки сортів генотипу 194 пн) у вибірці сортів Росії і зменшення (відповідно збільшення частки сортів генотипу 194 пн) у вибірці сортів України щодо вибірки сортів СГІ — НЦНС. У той же час у вибірці сортів СГІ — НЦНС відзначені достовірні зміни у співвідношенні частот альтернативних алелів локусу *Xcfd7–5B* в залежності від періоду селекції. У сортів, що районовані або внесені до Реєстру до 1996 року, відмінності частот алелів локусу *Xcfd7–5B* виявилися несуттєвими. Частота алеля 194 пн становила $49,8 \pm 7,6$ %, а null-алеля — $50,2 \pm 7,6$ %. Одночасно у вибірці сортів, занесених до Реєстру після 1996 року і по теперішній час, частота null-алеля локусу *Xcfd7–5B* збільшилася до 87,6 і, відповідно, зменшилася частота алеля 194 пн до 12,4 % в порівнянні з попереднім періодом селекції. Таким чином, селекційний процес на Півдні України в останні десятиліття був спрямований на відбір генотипів з

присутністю null-алеля локусу *Xcfd7–5B*. Яким чином виявлені алельні відмінності за локусом *Xcfd7–5B* позначаються на стійкості рослин до дії морозу, скоростиглості, висоті рослин і формуванні врожаю і його компонентів? Алельні відмінності сортів за локусом *Xcfd7–5B* істотно пов'язані з трьома ознаками: тривалістю періоду до колосіння, висотою рослин і масою зерна колоса (табл. 2).

Таблиця 2

Середні значення досліджених ознак груп сортів, що розрізняються за алелями локусу *Xcfd7–5B*

Ознака	Генотип			НІР _{0,05}	
	194 пн	null	F _{факт.}		
Зимостійкість, %	40	44	0,64	–	
Морозостійкість, %	грудень, –15 °С	82	80	0,20	–
	січень, –16 °С	77	73	0,47	–
	березень, –14 °С	57	61	0,38	–
	проростки, –11 °С	42	48	2,06	–
ТПК, діб	18,2	16,3	7,97	1,3	
ВР, см	82	73	7,58	7	
КПП, шт./м ²	397	392	0,140	–	
МЗК, г	0,85	0,99	10,64	0,11	
УЗ, кг/м ²	0,363	0,382	2,63	–	

Примітка: ТПК — тривалість періоду до колосіння (відлік від дати 1 травня), ВР — висота рослини, КПП — кількість продуктивних пагонів, МЗК — маса зерна колоса, УЗ — урожай зерна; $F_{0,05} = 4,03$.

За іншими вивченими ознаками суттєвих відмінностей двох груп сортів з альтернативними алелями локусу *Xcfd7–5B* не виявлено ($F_{\text{факт.}} < F_{0,05} = 4,03$). Разом з тим відзначали тенденцію до збільшення зимостійкості, морозостійкості проростків і рослин у фазі кушіння в грудні і березні, а також врожаю зерна у сортів з присутністю в генотипі null-алеля незалежно від року вивчення.

Висновки.

Ідентифіковано генотипи 164 сортів озимої м'якої пшениці різного географічного походження за алелями локусу *Xcfd7–5B*. Виявлено два алеля: алель розміром 194 пн і так званий null-алель (відсутність продукту ампліфікації).

На Півдні України (СГІ — НЦНС, Одеса) в 70-ті роки минулого століття виявлено достовірне збільшення до 88 % частоти null-алеля локусу *Xcfd7–5B* у виборці сортів, занесених до Реєстру після 1996 року, при відсутності подібної переваги в виборці сортів, створених в 1912–1996 роки.

Частота генотипу з присутністю null-алеля локусу *Xcfd7–5B* істотно вища за таку генотипу 194 пн як в загальній виборці, так і в вибірках окремих регіонів (СГІ — НЦНС, Україна (без СГІ — НЦНС) і Росія)

при відсутності достовірних відмінностей частот кожного з алелів між вибірками. Вказані відмінності частот алелів обумовлені селекційною і адаптивною цінністю зазначених алелів для умов певних регіонів.

Алельні відмінності локусу *Xcfd7–5B* істотно пов'язані в умовах Степу України з формуванням ряду господарсько-цінних ознак. Null-алель локуса *Xcfd7–5B* асоціюється з суттєвим скороченням тривалості періоду до колосіння (1,9 доби), зниженням висоти рослин (9 см), збільшенням маси зерна колоса (0,14 г) і, в кінцевому результаті, з не достовірним підвищенням врожаю зерна (0,019 кг / м²) в порівнянні з групою сортів-носіїв алеля 194 пн.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Jiang G.-L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants / G.-L. Jiang // Sven B. Andersen (ed.), Plant Breeding from Laboratories to Fields, In-Tech. — Croatia, 2013. — P. 45–83.
2. Галаєва М. В. Зв'язок алелів мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці / М. В. Галаєва, В. І. Файт, С. В. Чеботар, О. В. Галаєв, Ю. М. Сиволап // Цитологія та генетика. — 2013. — Т. 47, № 5. — С. 3–11.
3. Горя В. С. Влияние зимостойкости на гомеостаз урожайности сорта / В. С. Горя, М. З. Горя // Повышение зимостойкости озимых зерновых. — М.: Колос, 1993. — С. 90–95.
4. Литвиненко Н. А. Морозо-зимостойкость сортов озимой мягкой пшеницы различного географического происхождения в условиях Юга Украины / Н. А. Литвиненко, Н. Г. Максимов, С. А. Рубаха // Збірник наукових праць СГІ. — 2007. — Т. 48, № 9. — С. 150–163.
5. Лыфенко С. Ф. Связь признака высоты стебля озимой пшеницы с морозостойкостью / С. Ф. Лыфенко, Н. И. Ериняк, В. П. Федченко // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. — 1980. — Т. 35, № 1. — С. 6–9.
6. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: науч.-метод. руководство. — К.: Аграр. наука, 1998. — 156 с.
7. Файт В. І. Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці / В. І. Файт // Вісник аграрної науки. — 2005. — № 11. — С. 25–29.
8. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах Півдня України / Феоктістов П. О., Гаврилов С. В., Ляшок А. К. [та ін.]. — К.: Видавничий центр НАУ, 2006. — 36 с. — (Методичні рекомендації).
9. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий — М.: Колос, 1973. — 327 с.

Надійшла 13.06.2016

UDC 577.2:58.036.5:633.11

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

IDENTIFICATION AND ASSOCIATION OF LOCUS *XCFD7–5B* ALLELES WITH COMMERCIALY VALUABLE TRAITS OF WINTER BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Genotypes of 164 winter bread wheat varieties from different geographical origin were identified by the locus *Xcfd7–5B*. There were detected two allelic variants of the locus: allele 194 bp and null-allele (no amplification product). In the general set of varieties and in the sets of individual regions varieties the frequency of null-allele was much higher than the frequency of allele 194 bp. The advantage of null-allele among varieties in all regions is the evidence of its breeding and adaptive value. Allelic differences of *Xcfd7–5B* locus affect significantly on the formation of a number of agronomic traits. Null-allele of locus *Xcfd7–5B* contributed to a significant reduction of duration of period before heading, decreasing of plant height and increasing of kernel weight per ear and unreliable increase in grain yield.

УДК 577.2:58.036.5:633.11

Галаева М. В., Файт В. И.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АССОЦИИ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА *XCFD7–5B* С ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Генотипы 164 сортов пшеницы мягкой озимой различного географического происхождения идентифицированы по аллелям локуса *Xcfd7–5B*. Обнаружены два аллельных варианта локуса: аллель размером 194 п. н. и null-аллель (отсутствие продукта амплификации). В общем наборе и в наборах сортов отдельных регионов частота null-аллеля существенно превышала частоту аллеля 194 п. н. Преимущество null-аллеля среди сортов всех регионов свидетельствует о его селекционной и адаптивной ценности. Аллельные различия локуса *Xcfd7–5B* оказывают достоверное влияние на формирование ряда агрономических признаков. Null-аллель локуса *Xcfd7–5B* способствовал существенному сокращению продолжительности периода до колошения, снижению высоты растений, увеличению массы зерна колоса и недостоверному повышению урожая зерна.